

ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Petroselinum sativum* HOFFM "PEREJIL" SOBRE RATAS TRATADAS CON L-NAME

Antihypertensive activity of ethanolic extract of *Petroselinum sativum* Hoffm "parsley" on L-NAME treated rats

Julian Villarreal¹, Jorge Arroyo A.^{1,2}, Juan Rojas^{1,3}, José Valencia¹, Julio Chenguayén¹,
Pablo Bonilla R.²

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antihipertensiva del extracto etanólico de *Petroselinum sativum* "perejil" en ratas hipertensas. Se emplearon ratas Holtzmann, distribuidas al azar en 4 grupos (n = 6). La hipertensión arterial fue inducida en 3 grupos mediante la administración de L-NAME 50 mg/kg/día v.o. durante 11 días; de éstos, un grupo recibió el vehículo, los otros dos recibieron tratamiento con perejil en dosis de 200 y 600 mg/kg/día, respectivamente; el cuarto grupo fue blanco y sólo recibió agua destilada. El tratamiento con el extracto etanólico seco de perejil se inició 2 días después de la administración de L-NAME y se continuó diariamente. La presión arterial se midió al inicio del experimento y en los días 2, 3, 4, 7 y 11. Los resultados demuestran que en el primer día de tratamiento con perejil en dosis de 600 mg/kg/día, la PAS disminuyó significativamente de $167,5 \pm 1,5$ mmHg a $148,5 \pm 2,9$ mmHg ($p < 0,001$), la PAD disminuyó de $117,0 \pm 3,7$ mmHg hasta $97,3 \pm 3,9$ mmHg ($p < 0,01$). En el segundo día de tratamiento se observó disminución significativa de la PAS y PAD con la dosis de 200 mg/kg/día. Este efecto continuó en ambos grupos y al final del experimento, con 200 mg/kg/día se registró el valor de PAS de $142,0 \pm 1,37$ mmHg, mientras que con 600 mg/kg/día fue $143,5 \pm 2,6$ mmHg. Se concluye que en las condiciones experimentales del estudio, el extracto etanólico de *Petroselinum sativum* "perejil" tiene efecto antihipertensivo en ratas hipertensas por L-NAME.

Palabras clave: Perejil, *Petroselinum sativum*, antihipertensivo, L-NAME.

SUMMARY

The purpose of the present investigation was to determinate the antihypertensive activity of the ethanolic extract from *Petroselinum sativum* "perejil" parsley in hypertensive rats. Four groups (n = 6), Holtzmann rats was used. The arterial hypertension in three groups was induced by administration of L-NAME 50 mg/kg/day orally for 11 days; of them, one group was administrated vehicle only, the others groups were administrated parsley at dose of 200 and 600 mg/kg/day, respectively; the fourth one was the white and was administrated distilled water. The treatment with parsley started two days after administration L-NAME and was daily. The arterial pressure was measured starting the experiment and at days 2, 3, 4, 7 and 11. The SBP decreased significantly from first day of treatment with parsley at dose of 600 mg/kg/day from $167,5 \pm 1,5$ mmHg up to $148,5 \pm 2,9$ mmHg ($p < 0,001$), the DBP decreased too from $117,0 \pm 3,7$ mmHg up to $97,3 \pm 3,9$ mmHg ($p < 0,01$). The SBP and DBP decreased too on the second day of treatment at dose of 200 mg/kg/día. This effect was continued in both groups and at end of experiment, with 200 mg/kg/día the SBP was $142,0 \pm 1,37$ mmHg, as long as with 600 mg/kg/día was $143,5 \pm 2,6$ mmHg. In conclusion, in experimental conditions of study, the ethanolic extract of *Petroselinum sativum* "perejil" parsley has antihypertensive effect in hypertensive rats for L-NAME.

Key words: Parsley, *Petroselinum sativum*, antihypertensive, L-NAME.

¹ Sección de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. pbonillar@unmsm.edu.pe

³ Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos siglos se ha usado plantas con propiedades medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la hipertensión. A través de los años se han estudiado y ensayado algunos agentes antihipertensivos obtenidos de fuentes vegetales, tal es el caso de los extractos de la hoja de olivo (*Olea europaea*)¹, así como el ajo (*Alium sativum*) que ha demostrado clínicamente su eficacia en hipertensiones leves y moderadas^{2,3}.

Petroselinum sativum "perejil" es una planta herbácea que alcanza una altura de 15,80 cm de altura, cultivada es bianual y si es espontánea, perenne. Es originaria de los países que rodean el Mediterráneo oriental y se cultiva en casi todo el mundo. Esta planta en su composición química presenta sustancias nutritivas como lisina, ácido fólico, oleico, palmítico, beta-caroteno, vitamina C y vitamina E en cantidades apreciables, así como determinados minerales, principalmente fósforo, hierro, calcio y azufre. Asimismo, contiene otras sustancias no nutritivas tales como los flavonoides: apiina, rutina, apigenina, luteolina, crisoeriol, kaempferol, quercetina e isorhamnetina; alcaloides (miristicina), aceite esencial rico en apiol (en hojas y especialmente semillas), furocumarinas: bergapteno y xantotoxina (sobre todo en los brotes tiernos), alpha-pineno, beta-pineno, beta-cariofileno, beta-felandreno, mirceno (semilla)^{4,5}.

De *Petroselinum sativum* se utiliza la raíz, las hojas y los tallos. Se le atribuye efecto aperitivo, estimulante estomacal, antianémico, antiescorbútico, carminativo, antiséptico, estimulante uterino, para aliviar los cólicos menstruales, controlar la halitosis, diurético⁶ y también como hipotensor^{7,8,9}.

En diferentes estudios se ha demostrado que el perejil posee diversas propiedades, entre ellas: antimicrobianas, *in vitro* inhibe cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*¹⁰, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*¹¹; antiulcerosas, inhibe la secreción gástrica y ejerce un efecto protector frente a diversos agentes que causan injurias gástricas¹²; antihepatotóxicas, reduce los cambios degenerativos originados por la diabetes mellitus tipo II^{13,14}; hipoglucemiantes, reduce los niveles de glucosa en ratas diabéticas inducidas por *estreptozotocina*^{15,16}; antioxidante¹⁷; el extracto metanólico de las partes aéreas mostró potente actividad estrogénica semejante a las isoflavonas de la soya¹⁸; y, cuando se administró jugo de perejil a ratones dos horas antes

de su decapitación causó una significativa disminución de citocromo P450 hepática¹⁹.

Con respecto a la propiedad antihipertensiva de *Petroselinum sativum*, existe sólo información etnofarmacológica. Esto nos motivó a evaluar la actividad antihipertensiva del extracto etanólico de hojas y tallos frescos de *Petroselinum sativum* Hoffm. en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y obtención del extracto

La planta fresca utilizada en este estudio fue comprada en el mercado de La Victoria en la ciudad de Lima, e identificada en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo clasificada taxonómicamente como *Petroselinum sativum* Hoffm.

Las hojas y tallos frescos fueron lavados y limpiados, para luego ser licuados, utilizando etanol al 70%, dejándose en maceración por ocho días para posterior filtrado y evaporación del solvente a una temperatura de 38 °C en un horno con aire circulante. El residuo seco fue reunido y guardado en un frasco color ámbar a 2 °C hasta realizar los ensayos.

Animales

Se emplearon ratas albinas de raza Holtzmann, machos, de 220-250 g de peso corporal, adquiridas del Instituto Nacional de Salud y mantenidas en un ambiente tranquilo, con alimento y agua *ad libitum*.

Determinación de la actividad antihipertensiva

Las ratas fueron distribuidas al azar en cuatro grupos de seis animales cada uno. Después de una semana de aclimatación, se procedió a medir la presión arterial en la cola de los animales con el aparato LE 5002® (Letica), el cual está equipado con un microprocesador específicamente diseñado para realizar mediciones indirectas de la presión sanguínea en animales de experimentación y que permite obtener valores de frecuencia cardíaca, presión sistólica, diastólica y media. Luego de la medición basal (D0) se indujo hipertensión arterial en tres grupos mediante la administración de L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster) 50 mg/kg/día v.o. durante 11 días (método de Pereira L y col. 2004)²⁰, mientras que

el cuarto grupo fue blanco. El grupo A sólo recibió el vehículo, los grupos B y C recibieron tratamiento con extracto etanólico de *Petroselinum sativum* (perejil) en dosis de 200 y 600 mg/kg/día, respectivamente; el grupo D (blanco) no recibió L-NAME y sólo agua destilada.

El tratamiento con perejil se inició dos días después de la administración de L-NAME (D2) y se continuó diariamente hasta el final del experimento. La presión arterial se continuó midiendo en el día 1 (D3), 2 (D4), 5 (D7) y 9 (D11) después de iniciado el tratamiento con perejil.

Para la medición de la presión arterial fue necesario el establecimiento de condiciones estrictas: el ambiente se mantuvo libre de ruidos que pudieran perturbar la tranquilidad del animal, el animal fue tratado y colocado en el cepo sin traumas, las mediciones se realizaron diariamente siempre en el mismo horario, los animales fueron sometidos a un proceso previo de vasodilatación mediante calentamiento a 32 °C durante 30 minutos, y cada medición diaria fue el resultado del promedio de cinco lecturas realizadas a cada animal.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos de las mediciones de presión arterial fueron expresados como media arit-

mética \pm error estándar y fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA); las diferencias entre los grupos se determinaron por el test de Tukey, con un nivel de $P < 0.05$. Los datos fueron procesados con el software estadístico SPSS 11.0.

RESULTADOS

Después de dos días de administración de L-NAME, la presión arterial sistólica (PAS) se incrementó desde 129,3 mmHg (promedio del basal) hasta 158,9 mmHg; a su vez, la presión arterial diastólica (PAD) también se incrementó, lo cual marcó el inicio del tratamiento con perejil. En el primer día de tratamiento con el extracto etanólico de hojas y tallos frescos de *Petroselinum sativum* Hoffm "perejil" en dosis de 600 mg/kg/día, la PAS disminuyó significativamente de $167,5 \pm 1,5$ mmHg a $148,5 \pm 2,9$ mmHg ($p < 0,001$), la PAD también disminuyó de $117,0 \pm 3,7$ mmHg hasta $97,3 \pm 3,9$ mmHg ($p < 0,01$). En el segundo día se observó disminución significativa de la PAS y PAD con la dosis de 200 mg/kg/día. Este efecto continuó en ambos grupos y en el noveno día de tratamiento con 200 mg/kg/día se registró el valor de PAS de $142,0 \pm 1,37$ mmHg, mientras que con 600 mg/kg/día fue $143,5 \pm 2,6$ mmHg. Por otra parte, la presión arterial continuó incrementándose en el grupo que sólo recibió L-NAME, alcanzando el valor de $179,3 \pm 1,2/134,7 \pm 6,3$ mmHg al final del experimento (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Presión arterial sistólica (mmHg) en ratas hipertensas por L-NAME tratadas con el extracto etanólico de hojas y tallos frescos de *Petroselinum sativum* Hoffm "perejil"

Grupo	D0 (basal)	D2 (HTA)	D3 (día 1 tto)	D4 (día 2 tto)	D7 (día 5 tto)	D11 (día 9 tto)
L-NAME	131,3 \pm 1,4	162,2 \pm 1,8	167,5 \pm 1,5	168,2 \pm 2,5	173,8 \pm 3,3	179,3 \pm 1,2
Perejil 200	130,5 \pm 1,3	156,8 \pm 1,6	159,2 \pm 0,6	139,7 \pm 2,4a	142,7 \pm 2,3a	142,0 \pm 1,4a
Perejil 600	127,2 \pm 4,8	157,7 \pm 2,2	148,5 \pm 2,9a	142,5 \pm 3,8a	148,0 \pm 2,2a	143,5 \pm 2,6a
Blanco	128,0 \pm 1,0	123,2 \pm 3,2	125,3 \pm 2,6	123,3 \pm 2,7	121,3 \pm 2,6	119,0 \pm 3,6

Valores expresados como media aritmética \pm error estándar. a) $p < 0,001$ comparado con grupo L-NAME.

Tabla 2. Presión arterial diastólica (mmHg) en ratas hipertensas por L-NAME tratadas con el extracto etanólico de hojas y tallos frescos de *Petroselinum sativum* Hoffm "perejil".

Grupo	D0 (basal)	D2 (HTA)	D3 (día 1 tto)	D4 (día 2 tto)	D7 (día 5 tto)	D11 (día 9 tto)
L-NAME	79,3 \pm 1,9	102,8 \pm 1,9	117,0 \pm 3,7	124,0 \pm 5,8	117,7 \pm 4,9	134,7 \pm 6,3
Perejil 200	78,2 \pm 3,1	96,0 \pm 1,9	93,5 \pm 1,9a	87,2 \pm 2,6a	90,0 \pm 3,5a	91,0 \pm 3,4a
Perejil 600	72,3 \pm 4,8	110,2 \pm 2,4	97,3 \pm 3,9b	89,0 \pm 4,3a	94,2 \pm 4,7a	102,7 \pm 2,0a
Blanco	76,2 \pm 5,4	76,8 \pm 3,7	74,0 \pm 3,3	77,2 \pm 3,5	75,7 \pm 2,4	76,7 \pm 1,7

Valores expresados como media aritmética \pm error estándar. a) $p < 0,001$ comparado con grupo L-NAME. b) $p < 0,01$

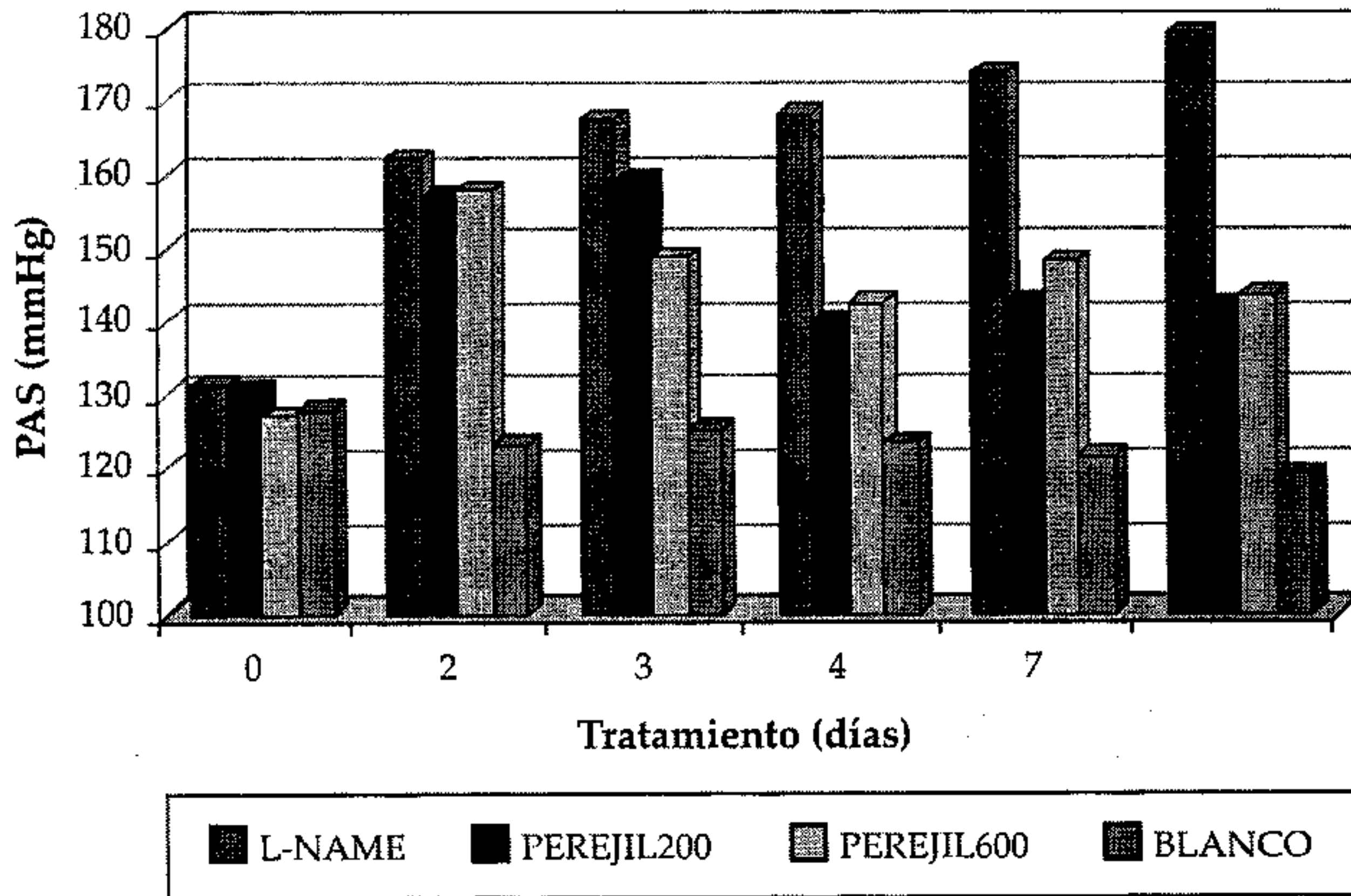


Figura 1. Variación de la PAS por efecto del extracto etanólico de hojas y tallos frescos de *Petroselinum sativum* Hoffm "perejil" en ratas hipertensas.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se observó que el extracto etanólico de hojas y tallos frescos de *Petroselinum sativum* Hoffm "perejil" disminuyó significativamente la presión arterial tanto sistólica como diastólica, evidenciando desde el segundo día de tratamiento con la dosis de 200 mg/kg/día, tendencia que se mantuvo hasta el final del experimento. No obstante, a lo largo del tratamiento se observó que con la dosis de 600 mg/kg/día no se produjo mayor incremento de la actividad reductora de la presión arterial, respecto de la dosis de 200 mg/kg/día, lo cual indicaría que es un efecto no dependiente de la dosis, incluso mejor perfil se observa con esta última (Fig. 1).

Los estudios realizados han demostrado que los metabolitos secundarios de las plantas pueden ejercer un efecto antihipertensivo por diversos mecanismos. Los flavonoides inhibiendo la proteincinasa C, la fosfodiesterasa y ocasionando una disminución en los niveles de calcio lo cual genera un efecto vasodilatador²¹⁻²⁴. También se ha informado que los flavonoides producen un aumento de óxido nítrico²⁵, el mismo que cumple un rol fundamental en el proceso vasodilatador ya que es el principal factor relajante derivado del endotelio²⁶.

El estrés oxidativo aparece como una de varias anomalías metabólicas que juegan un rol en la hipertensión, incrementando los valores de presión

y conduciendo a complicaciones²⁷, por lo que la terapia antioxidante podría ser útil para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo sobre los vasos sanguíneos, la presión arterial y las lipoproteínas de baja densidad²⁸. En este sentido, se ha reportado que los flavonoides tienen efecto antioxidante²⁹ y vasorrelajante³⁰.

Se ha reportado que el perejil tiene efecto antioxidante, con incremento significativo de enzimas antioxidantes, glutatión reductasa y superóxido dismutasa en sujetos humanos¹⁷, actividad sequestradora del radical libre hidroxilo³¹, encontrándose además una alta correlación entre las muestras ricas en flavonoides y el efecto antioxidante³².

Por otra parte, también se ha demostrado que el extracto acuoso de perejil redujo la actividad de la Na⁺-K⁺ ATPasa en el homogenizado de corteza y médula renal de rata, lo que conduciría a una reducción en la reabsorción de Na⁺ y K⁺ que provocaría un flujo osmótico de agua en el lumen y diuresis³³.

Es probable que el efecto reductor de la presión arterial producido por perejil se lleve a cabo por diferentes mecanismos de acción, lo cual podría deberse a su contenido de flavonoides, ya que se ha reportado que esta planta tiene grandes cantidades de la flavona apigenina³⁴, y por sus propiedades antioxidante y diurética.

Se concluye que en estas condiciones experimentales, el extracto etanólico de *Petroselinum sativum* Hoffm (perejil) tiene actividad antihipertensiva cuando se administra por vía oral a ratas hipertensas por L-NAME.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Zarzuelo A, Duarte J, Jimenez J, González M, Utrilla M. Vasodilatador effect of olive leaf. *Planta Med.* 1991; 57: 417-419.
- Reuter H. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2 Pharmacology and medical applications. *Phytomedicine.* 1995; 2: 73-91.
- Paunero I, Curioni A. Perejil (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A.W. Hill) para deshidratado: rendimientos de fitomasa en siembra otoñal, en el noreste de Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 2005.
- Font Quer, P. *Plantas medicinales. El Dioscórides Renovado.* 7ª edición. Barcelona: Labor S.A. 1981, p. 489-490.
- Hempel J, Pforte H, Raab B, Engst W, Böhm H, Jacobasch G. Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. *Nahrung.* 1999; 43(3):201-204.
- Essalud. *Formulario Nacional de Recursos Naturales y Afines. Plantas Medicinales.* 2005. p. 246-248.
- Cueva A. *Enciclopedia de plantas medicinales. Propiedades y usos.* 1ª ed. Lima: AFA. 2003, p. 230.
- Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A. *Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco.* *J Ethnopharmacol.* 1997; 58(1): 45-54.
- Hernández J, Valero H. 23 especies vegetales medicinales de uso frecuente en la población de Tabay. *Revista de la Facultad de Farmacia* 2002. 44: 51-58.
- Yin M, Cheng W. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. *J Food Prot.* 1998; 61(1): 123-125.
- Michelle M, Schafer W, Davidson M, Edmund Z. Isolation and Identification of Antimicrobial Furocoumarins from Parsley. *Journal of Food Protection.* 1997; 60(1):72-77.
- Al-Howiriny T, Al-Sohaibani M, El-Tahir K, Rafatullah S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of "Parsley" *Petroselinum crispum*. *Am J Chin Med.* 2003; 31(5): 699-711.
- Bolkent S, Yanardag R. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) on the liver of diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Phytotherapy Research.* 2005; 18(12): 996-999.
- Ozsoy-Sacan O, Yanardag R, Orak H, Ozgey Y, Yarat A, Tunalı T. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;104(1-2):175-81.
- Yanardag R, Bolkent S, Tabakoglu A, Osoy O. Effects of *Petroselinum crispum* extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull.* 2003; 16(8): 1206-1210.
- Sener G, Saçan O, Yanardag R, Ayanoglu-Dülger G. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) on the aorta and heart of Stz induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2003; 58(3):1-7.
- Nielsen S, Young E, Daneshvar B. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British Journal of Nutrition.* 1999; 81: 447-455.
- Yoshikawa M, Uemura T, Shimoda H, Kishi A, Kawahara Y, Matsuda H. Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of *Petroselinum crispum* Mill. (Parsley) and structures of 6"-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside. *Chem Pharm Bull.* 2000; 48(7):1039-44.
- Jakovljevic V, Raskovic A, Popovic M, Sabo J. The effect of celery and parsley juices on pharmacodynamic activity of drugs involving cytochrome P450 in their metabolism. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2002; 27(3): 153-156.
- Pereira L, Bezerra D, Mandarin-de-Lacerda C. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathology Research and Practice;* 2004; 200: 211-217.
- Gamet L, Manenti S, Gratacap M. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology* 1999; 32(3): 279-286.
- Dolores M, Zarzuelo A, Jiménez J. Effects of flavonoids on rats aortic smooth muscle contractili-

- ty: structure-activity relationships. *General Pharmacology*. 1996; 27 (2): 273-277.
23. **Revuelta M, Cantabrana B, Hidalgo A.** *Depolarization-dependent effect of flavonoids in rats uterine smooth muscle contractions elicited by CaCl₂*. *General Pharmacology*. 1997; 29 (5): 847-857.
24. **Ko F, Huang T, Teng C.** *Vasodilatory action mechanisms of apigenin from apium in rat thoracic aorta*. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1115(1): 69-74.
25. **Freedman J, Parker C, Li L, Perlman J, Ivanov V, Deak L.** *Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release*. *Circulation*. 2001; 103:2792-2798.
26. **Achike F, Kwan Ch.** *Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2003; 30: 605-615.
27. **Fortepiani L, Reckelhoff J.** *Role of oxidative stress in the sex differences in blood pressure in spontaneously hypertensive rats*. *Journal of Hypertension*. 2005; 23:801-805.
28. **Digiesi V, Lenuzza M, Digiesi G.** *Prospects for the use of antioxidant therapy in hypertension*. *Ann Ital Med Int*. 2001; 16(2):93-100.
29. **Nijveldt R, Nood E, Hoorn D, Boelens P, Noren K, Leeuwen P.** *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. *Am J Clin Nutr*. 2001; 74:418-425.
30. **Woodman O, Chan E.** *Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2004; 31:786-790.
31. **Fejes S, Blázovics A, Lemberkovics E, Petri G, Szöke E, Kéry A.** *Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from Anthriscus cerefolium L. (Hoffm.) and Petroselinum crispum (Mill.) nym. ex A.W. Hill*. *Phytother Res*. 2000; 14(5):362-5.
32. **Fejes S, Kéry A, Blázovics A, Lugasi A, Lemberkovics E, Petri G, Szöke E.** *Investigation of the in vitro antioxidant effect of Petroselinum crispum (Mill.) Nym. ex A. W. Hill*. *Acta Pharm Hung*. 1998; 68(3):150-6.
33. **Kreydiyeh S, Usta J.** *Diuretic effect and mechanism of action of parsley*. *J Ethnopharmacol*. 2002; 79(3): 353-357.
34. **Justesen U, Knuthsen P, Leth T.** *Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection*. *J. Chromatogr. A*. 1998; 799:101-110.