

Essais de stabilisation de la couleur rouge de boisson d'*Hibiscus sabdariffa*-L par incorporation de tanins d'*Acacia nilotica* et de *Casuarina equisetifolia*

Papa Guedel FAYE^{1,2*}, Mouhamed NDOYE¹, Ibrahima DIOUF¹, Awa Latir SENE²,
Oumar Ibn Khatab CISSE^{2,3} et Mady CISSE^{1,2}

¹ Université Cheikh Anta Diop, BP 5080 Dakar Fann, Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar, Département Génie Chimique et Biologie Appliquée, Laboratoire Eau, Energie, Environnement et Procédés Industriels (LE3PI), Sénégal

² Centre d'Etudes sur la Sécurité Alimentaire et les Molécules Fonctionnelles (CESAM), Dakar, Sénégal

³ Université Iba Der THIAM, Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture, BP A296 Thiès, Sénégal

(Reçu le 04 Octobre 2022 ; Accepté le 19 Décembre 2022)

* Correspondance, courriel : papaguedel.faye@ucad.edu.sn

Résumé

Les essais de stabilisation de la couleur rouge ont été réalisés sur une durée de deux (2) mois à 4, 20 et 37 °C sur quatre (4) lots d'échantillons de boissons d'*H. sabdariffa*. Un lot contenant 4,5 g de tanins d'*Acacia nilotica*, un lot contenant 4,5 g de tanin de *Casuarina equisetifolia*, un lot contenant 4,5 g de tanin gallique standard et un lot témoin. Une caractérisation des différents lots de boissons a été réalisée dès le premier jour avant le stockage. Un suivi de la teneur en anthocyanes résiduelles et de l'intensité de la coloration rouge due à la présence d'anthocyanes a été réalisé sur huit semaines. La concentration en anthocyanes a été déterminée par la méthode pH-différentiel. L'indice de dégradation de la couleur rouge est déterminé par le rapport des absorbances à 420 nm et à λ_{max} 520 nm. Le logiciel R et Minitab 18 ont été utilisés pour le traitement des données. Les résultats des suivis ont montré un retard de la dégradation de la couleur rouge lors du stockage à 20 et 37 °C sur les lots de boissons avec ajout de tanin gallique et d'*acacia nilotica*. Au bout de 60 jours de stockage à 37 °C sur les lots de boissons ajoutées de tanins de *Casuarina equisetifolia*, on observe une disparition totale de la couleur rouge. La meilleure conservation de la couleur rouge des boissons est obtenue avec les tanins *galliques* d'*acacia* sur 60 jours.

Mots-clés : *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanes, *acacia nilotica*, *Casuarina equisetifolia*, tanin, stabilisation, boisson, stockage.

Abstract

Stabilization tests of the red color of *Hibiscus sabdariffa*-L drink by incorporating tannins from *Acacia nilotica* and *Casuarina equisetifolia*

The red color stabilization tests were carried out over a period of two (2) months at 4, 20 and 37°C on four (4) batches of beverage samples of *H. sabdariffa*. A batch containing 4.5 g of *acacia nilotica* tannins, a batch containing 4.5 g of *Casuarina equisetifolia* tannin, a batch containing 4.5 g of standard *gallic* tannin and a

control batch. A characterization of the different beverage batches was carried out from the first day before storage. Monitoring of the residual anthocyanin content and the intensity of the red coloring due to the presence of anthocyanins was carried out over eight weeks. The anthocyanin concentration was determined by the pH-differential method. The red color degradation index is determined by the ratio of the absorbances at 420 nm and at λ_{max} 520 nm. R software and Minitab 17 were used for data processing. The results of the monitoring showed a delay in the degradation of the red color during storage at 20 and 37 °C on the batches of beverages with the addition of gallic tannin and *acacia nilotica*. After 60 days of storage at 37 °C. on the batches of beverages added with *Casuarina equisetifolia* tannins, a total disappearance of the red color is observed. The best preservation of the red color of drinks is obtained with *acacia gallic* tannins over 60 days.

Keywords : *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanin, *acacia nilotica*, *Casuarina equisetifolia*, tannin, stabilization, beverage, storage.

1. Introduction

Les calices rouges d'*Hibiscus sabdariffa* sont très riches en anthocyanes et en agents antioxydants [1]. La teneur en anthocyanes dans les calices peut atteindre 1,5 g/100 g de matière sèche. Les anthocyanes sont les colorants universels du monde végétal. Leur structure de base est constituée par un système tricyclique aromatique à quinze atomes de carbone. Quatre anthocyanes ont été identifiés [2 - 5]. Il s'agit de la *delphinidine-3-sambubioside* ou l'*hibiscine* de la *cyanine-3-sambubioside* ou *gossypicyanin*, de la *delphinidine-3-glucoside* et de la *cyanine-3-glucoside*. La *delphinidine-3-sambubioside* est l'anthocyane majoritaire responsable de la couleur rouge-violette [6, 7]. Il représenterait 71 % de la teneur en anthocyanes totale [2]. Les anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* sont thermolabiles et très instables [8 - 12]. Esselen a été le premier à faire des essais de stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* dans la formulation de produits alimentaires [8]. Dans les produits alimentaires conditionnés après séchage, Clydesdale a étudié la stabilité des anthocyanines, alors que Pouget Lejeune étudie les réactions entre différents composés chimiques (acide ascorbique, gallate propylique, EDTA, sulfite de sodium) sur leur stabilité [9, 10]. Le phénomène de co-pigmentation est l'une des mécanismes les plus importants de stabilisation des couleurs naturelles exprimées par les anthocyanes [7, 13, 14]. Elle intensifie et stabilise la couleur dans les conditions de pH où l'anthocyane est quasiment incolore. La co-pigmentation c'est l'interaction entre les anthocyanes et des polyphénols qui entraîne une modification de la stabilité des anthocyanes. La co-pigmentation a déjà été rapportée comme pouvant affecter la coloration rouge dans le jus du raisin [15]. La stabilité de ces colorants à pH faible est en grande partie attribuée à la concentration élevée en cation flavylium. L'utilisation de différentes matrices comme les tanins en associant avec l'extrait aqueux de bissap permettrait d'augmenter la stabilité des anthocyanes [16]. L'objectif de ses travaux est d'essayer de stabiliser la couleur rouge due aux anthocyanes dans les boissons à bases d'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*-L par incorporation de tanins gallique, d'*Acacia nilotica* et de *Casuarina equisetifolia*.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Les essais ont été réalisés avec des tanins de *Casuarina equisetifolia* **Figure 1**, d'*Acacia nilotica* **Figure 1'**, d'acide gallique et les calices rouges de la variété horticoles d'*Hibiscus sabdariffa* dite «Vimto ». Cette variété a été récoltée durant la campagne 2020 - 2021 et proviennent de la région de Diourbel, dans le village de Bambey du Sénégal (**Figure 2**).



Figure 1 : Fruits *Casuarina equisetifolia* **Figure 1'** : Fruits *Acacia Nilotica* **Figure 2** : Calices rouge

2-2. Méthodes

2-2-1. Production des boissons

Un extrait aqueux de calices d'*H. sabdariffa* est obtenu après quatre (4) heures de macération à la température ambiante (34 °C) avec un ratio calices-eau de 1/25 (kg.kg⁻¹). L'extrait final récupéré et filtré puis divisé en quatre lots : un lot auquel est rajouté de tanins de gousse d'*Acacia nilotica* à raison de 4,5 g.L⁻¹, un lot contenant de tanins de fruits de *Casuarina equisetifolia* à raison de 4,5 g.L⁻¹, un lot témoin et un lot avec 4,5 g.L⁻¹ de tanin gallique. Les boissons à 15 °Brix sont préparées avec rajout de saccharose à froid sur chaque extrait, puis mélangés à froid jusqu'à dissolution complète au bout de 20 minutes.

2-2-2. Pasteurisation et stockage des boissons

Pour chaque lot constitué, les boissons sont caractérisées (**Tableau 1**), remplies dans des bouteilles de 100 mL ambrées propres, désinfectées à l'eau de javel diluée à 100 ppm pendant trente minutes et séchées à l'étuve. Après remplissage et capsulage à froid, la pasteurisation est effectuée en bain-marie à la valeur pasteurisatrice (VP 50) de 75 °C / 30 min. Une bouteille témoin est utilisée avec une sonde de température placée au centre géométrique. Après pasteurisation, les échantillons de boissons sont stockés à différentes températures (4, 20 et 37 °C). Des analyses sont effectuées toutes les semaines sur une période de deux (2) mois afin de suivre l'évolution des paramètres physico-chimiques et biochimiques. Les réactifs et les solvants organiques utilisés dans ces travaux de recherche sont de pureté analytique. La pureté de l'eau distillée a été vérifiée en mesurant la conductivité à 25 °C.

2-2-3. Dosage des anthocyanes

Le principe du dosage est basé sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH (méthode pH-différentiel) selon les prescriptions de [3]. Après dilution dans deux solutions tampons (pH 1,0 et pH 4,5), l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV (*Specord 200 plus, Germany*) à 510 et à 700 nm.

2-2-4. Détermination de la couleur, la turbidité et la conductivité

L'indice de dégradation de la couleur se détermine par le rapport des absorbances à 420 nm et à λ_{max} 520 nm suivant la méthodologie utilisée par [17]. C'est un indicateur de la stabilité de l'extrait pendant sa conservation. Dans ces conditions, la détermination est effectuée. Les caractéristiques chromatiques sont déterminées par spectrophotométrie. La turbidité et les conductivités ont été mesurées respectivement avec un turbidimètre (HE9 série 61076, Roumanie) et un conductimètre intégrant la mesure du pH (*Hanna instruments, Germany*) à 25 °C.

2-2-5. Détermination de la matière sèche soluble (Brix)

Le Brix est défini comme la concentration en matières sèches solubles de 100 g solution aqueuse. Cette concentration mesurée à 25 °C par l'indice de réfraction est ensuite exprimée par le pourcentage en masse (g/100 g d'extrait), est mesurée selon une méthode normalisée (NA 5669) au moyen d'un réfractomètre universel. Réfractomètre type Abbe ATAGO avec lecteur digital et correction de température.

2-2-6. Extraction des tanins

Les tanins sont obtenus selon le procédé de Seigler [18]. Une masse de 100 g de fibres est introduite dans une solution constituée de 100 mL d'éthanol et de 100 mL d'eau distillée. Le tout est chauffé à ébullition durant une heure sous réfrigérant. Après refroidissement et filtration, le filtrat est centrifugé à 3000 trs.min⁻¹ pendant 15 minutes. Le culot de tanin est récupéré et séché à l'étuve à 70 °C pendant cinq (5) heures.

2-2-7. Analyses statistiques

Utilisation de l'ANOVA à un facteur avec le logiciel R version 3.2.4 -2018 et le logiciel Minitab18. La valeur X de chaque échantillon est assignée d'une lettre en exposant (X⁽ⁱ⁾ où i = a, b, c). Les valeurs portant la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de signification de 5 %.

3. Résultats et discussion

3-1. Caractérisation des boissons

Les analyses des différents paramètres des boissons sont consignées dans le **Tableau 1**. Les analyses montrent des résultats assez homogènes pour l'ensemble des boissons au premier jour avant le stockage à différentes températures (4, 20 et 37 °C).

Tableau 1 : Quelques caractéristiques physico-chimiques des échantillons de boissons utilisées

Paramètres	Boisson Témoin	Boisson avec 4,5 g.L ⁻¹ de tanin Gallique	Boisson avec 4,5 g.L ⁻¹ de tanin <i>Acacia nilotica</i>	Boisson avec 4,5 g.L ⁻¹ de tanin <i>Casuarina equisetifolia</i>
Conductivité (ms.cm ⁻¹)	2,99 ^a ± 0,04	2,98 ^a ± 0,02	3,03 ^b ± 0,04	3,05 ^b ± 0,06
pH à 20 °C	2,45 ^a ± 0,005	2,43 ^a ± 0,005	2,47 ^a ± 0,011	2,48 ^a ± 0,000
Turbidité (NTU)	14,33 ^a ± 0,57	15,33 ^b ± 0,57	45,00 ^c ± 2,00	45,67 ^d ± 3,06
Brix à 20 °C avant ajout sucre	1,70 ^a ± 0,00	2,23 ^d ± 0,09	1,96 ^c ± 0,04	1,76 ^b ± 0,05
Sucre (saccharose) ajouté (g)	150,3 ^d ± 0,1	144,0 ^a ± 0,1	143,2 ^c ± 0,1	144,0 ^a ± 0,1
Brix à 20 °C après ajout sucre	15,3 ^c ± 0,00	15,13 ^a ± 0,05	15,20 ^b ± 0,00	15,23 ^b ± 0,05
Caractéristique Couleur rouge	63,04 ^b ± 1,07	62,39 ^a ± 0,54	62,53 ^a ± 0,61	61,47 ^a ± 0,83
Acidité Titrable (meq. L ⁻¹)	81 ^b ± 1,0	108,5 ^d ± 0,5	83,0 ^c ± 0,0	78,0 ^a ± 0,0
Concentration en anthocyanes (mg.L ⁻¹)	226 ^a ± 5	217 ^a ± 5	224 ^a ± 7	208 ^a ± 11

3-2. Suivi de la concentration en anthocyane et l'intensité colorante

Les **Figures 3, 4 et 5** montrent l'évolution de la concentration des anthocyanes au cours du stockage à différentes températures (8 semaines). L'analyse des résultats montre une tendance homogène des pertes aux différentes températures de stockage. Il a été noté une dégradation en moyenne de 30 % des anthocyanes dans les lots de boissons stockées à 4 °C (**Figures 3**). Les lots de boissons stockées à 20 °C affichent en moyenne un taux de dégradation de 50 % (**Figure 4**). Les pertes en anthocyane dans les lots d'échantillons sont proportionnelles aux températures de stockage et le sont plus significativement à 37 °C (**Figure 5**).

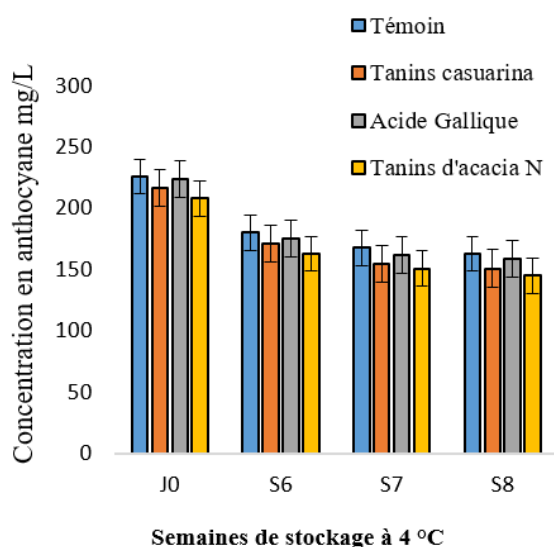


Figure 3 : Anthocyanes résiduelles dans les lots de boissons stockage à 4 °C

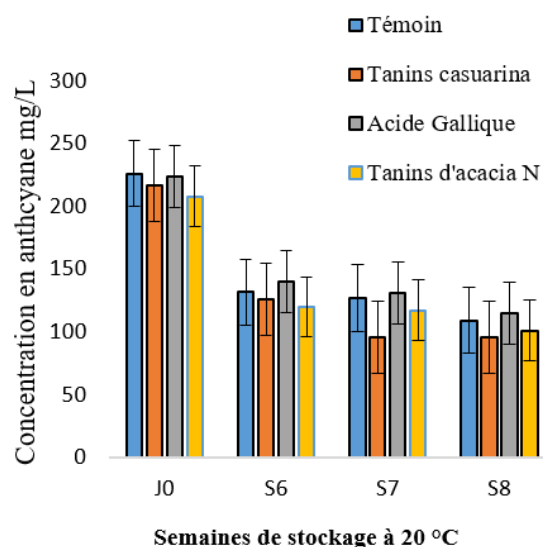


Figure 4 : Anthocyanes résiduelles dans les lots de boissons stockage à 20 °C

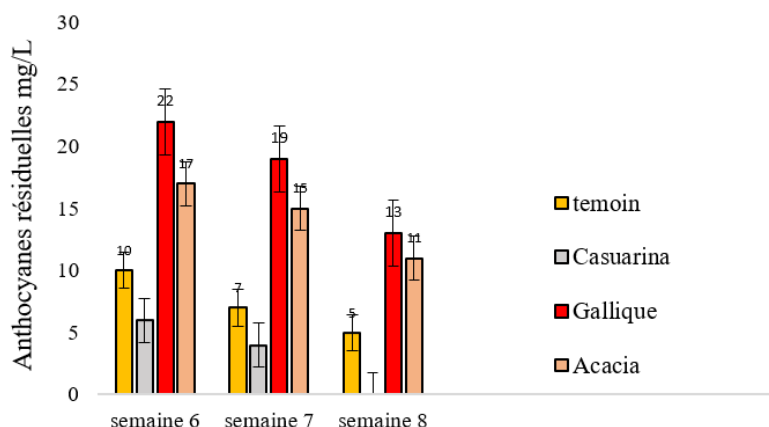


Figure 5 : Comparaison des quantités d'anthocyanes résiduelles dans les lots de boissons stockés à 37 °C

Les anthocyanes à l'état libre se dégradent très vite. Leur teneur dans les boissons chute plus rapidement durant le stockage à 37 °C. Une perte de 97 % de la concentration en anthocyanes initiale est observée après huit semaines de stockage à 37 °C pour les lots témoins. Les résultats montrent une disparition totale des anthocyanes sur les lots avec ajout de tanins de *casuarina*. Un retard de la dégradation des anthocyanes est observé sur les lots de boisson avec ajout de 4,5 g d'acide gallique et 4,5 de tanins d'acacia par rapport au témoin. Les tanins galliques et d'*acacia* réagissent avec les anthocyanes pour former des complexes tanins-anthocyanes assurant la diminution de la dégradation des anthocyanes durant le stockage à 37 °C

(Figure 5). Selon les travaux de Maccarone et Francis, les anthocyanes et les tanins formeraient de co-pigmentations intermoléculaire qui contribuent à la stabilité de la coloration rouge des anthocyanes [19, 20]. Le phénomène s'explique par une réduction de la production de pseudo base *carbinol* et une stabilisation de la base *quinonoidale* [21, 22]. Cet effet de co-pigmentation a été recherché pour les tests de stabilité de la couleur rouge des anthocyanes dans la boisson à base de calices rouge.

Les Figures 6, 7, 8 et 9 montrent l'évolution de l'intensité colorante au cours du stockage.

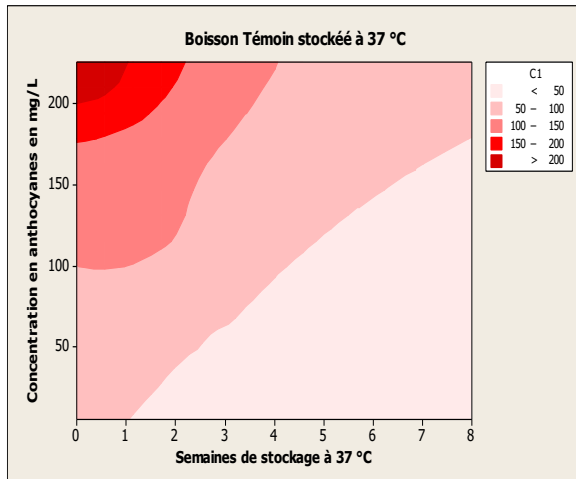


Figure 6 : Évolution de l'intensité de la couleur (témoin)

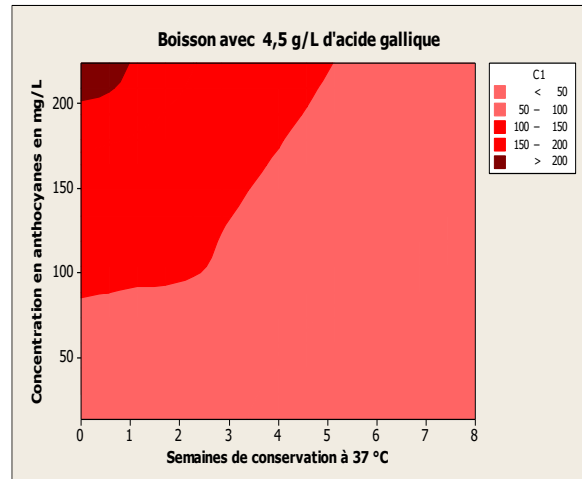


Figure 7 : Évolution de l'intensité de la couleur (acide gallique)

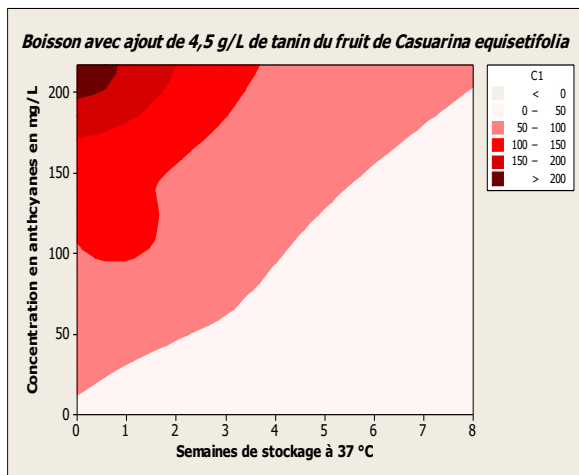


Figure 8 : Évolution de l'intensité de la couleur (*C. equisetifolia*)

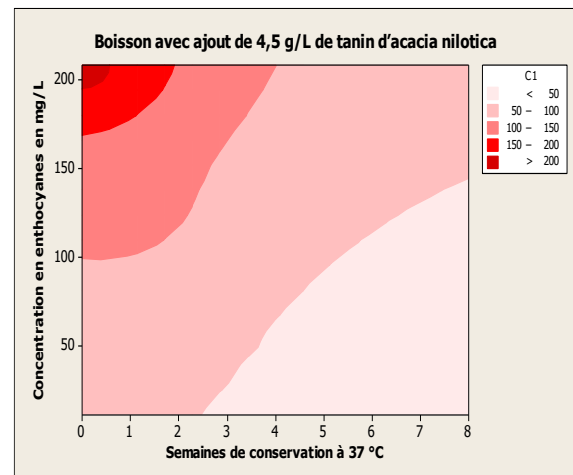


Figure 9 : Évolution de l'intensité de la couleur (*A. nilotica*)

Au cours du stockage à 37 °C, l'intensité de la couleur rouge disparaît au bout 8 semaines pour le lot de boissons ajoutées de tannin de *Casuarina equisetifolia* (Figure 8). Cette disparition serait due à une perte totale des anthocyanes (0 mg.L^{-1}) au cours du stockage sous l'effet de la chaleur et à une oxydation des composés phénoliques. Les anthocyanes, responsables de la coloration des calices rouges sont des molécules très réactives qui, dès leur extraction dans un milieu liquide, vont subir plusieurs réactions donnant naissance aux pigments bruns après dégradation progressive de la couleur rouge [23]. La coloration rouge est mieux conservée dans les lots de boissons traitées avec les tanins galliques par rapport au lot témoin. Le phénomène

de co-pigmentation et la polymérisation ont aussi été rapportés comme pouvant affecter la coloration rouge dans le jus du raisin [24]. Cependant, des réactions de condensation peuvent être à l'origine de la décoloration des anthocyanes (**Figures 8, 9**). D'après Hrazdina, certains acides aminés, catéchines ou autres nucléophiles, en se condensant en présence de sels de flavylum, génèrent des produits moins colorés lesquels sont réactifs et subissent des changements supplémentaires [25].

4. Conclusion

Dans cette étude, les interactions entre tanins et anthocyanes par utilisation de tanins d'*acacia nilotica*, de tanins de *Casuarina equisetifolia* et de l'acide gallique ont été évaluées afin de retarder la dégradation de la coloration rouge et de prolonger la durée de conservation des boissons à bases d'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa*. Les résultats obtenus montrent qu'il est bien possible de ralentir la dégradation des anthocyanes par l'ajout d'acide gallique ou d'*acacia nilotica* lors de la conservation à 20 °C et à 37 °C mais pour une durée limitée. Cependant, les tanins de *Casuarina equisetifolia* n'ont aucun effet significatif sur la stabilité de la couleur rouge des lots de boissons traitées. Les sciences alimentaires considèrent la co-pigmentation comme une interaction importante dans la conservation de la couleur. Les réactions de co-pigmentation des anthocyanes les plus complexes ont longtemps été étudiées dans les fleurs et dans le vin. Cependant, les réactions de co-pigmentations avec les anthocyanes les plus simples qui se produisent dans les extraits anthocyaniques d'*hibiscus Sabdariffa* sont encore à étudier.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire Eau, Energie, Environnement et Procédés Industriels (LE3PI) et au Centre d'Etudes sur la Sécurité alimentaire et le Développement des Molécules fonctionnelles (CESAM) de l'Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar Université Cheikh Anta Diop (Sénégal). Les auteurs remercient vivement les responsables de laboratoire, ainsi que tout le personnel.

Références

- [1] - BH. ALI, HM MOUSA, S. MOUGY, The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L on paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.*, 17 (1) (2003) 56 - 59
- [2] - P. BRIDLE, A simple technique for the detection of redwine adulteration with elder berry pigments. *J. Food Chem*, 55 (1996) 111 - 113
- [3] - RE. WROLSTAD, G. SKREDE, PER LEA et G. ENERSEN, Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J. Food Sciences*, 55 (4) (1990) 1064 - 1072
- [4] - PF. GUEDEL, M. CISSE, A. SOW, N. AYOSSOU, CM. GUEYE DIOP, M. SAKHO, Effet des bétalaïnes et tanins du moringa sur la stabilité des anthocyanes de boissons à base d'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* L. *Afrique Sciences*, 13 (3) (2017) 43 - 52
- [5] - L. VERBEYST, KV. CROMBRUGGEN, VAN DER PLANCKEN, M. HENDRICK, A. VAN LOEY, Anthocyanin degradation kinetics during thermal and high pressure treatments of raspberries. *J. Food Engineering*, 105 (3) (2011) 513 - 521
- [6] - WB. ESSELEN and GM. SAMMY, Roselle a natural red colorant for foods. *Food Prod. Dev.*, 7 (1) (1973) 80 - 86

- [7] - MB. PALE, M. KOUDA, M. NACRO, Caractérisation et mesure des activités anti-radicalaires d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso. *C. R. Chimie*, (2004) 7973 - 980
- [8] - PM. NGOM, Essai de stabilisation de la couleur rouge de la boisson de Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.). Thèse de 3ème cycle de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, (2001) 97 p.
- [9] - FM. CLYDESDAL, JH. MAIN, FJ. FRANCIS, Roselle (*Hibiscus subdunflu* L.) anthocyanins as colorants for beverages and gelatin desserts. *J. Food Protect.*, 42 (1979) 204 - 207
- [10] - WD. WANG and XU SY, Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82 (3) (2007) 271 - 275
- [11] - D. K. MISHRA, K. D. DOLAN et L. YANG, Confidence intervals for modeling anthocyanin retention in grape pomace during non-isothermal heating. *J. Food Sciences*, 73 (1) (2008) 9 - 15
- [12] - W. B. ESSELEN, G. M. SAMMY, Applications for roselle as a red food colorant. *Food Prod. Dev.*, 9 (8) (1975) 37 - 40
- [13] - M. P. POUGET, B. VENNAT, B. LEJEUNE, A. POURRAT, Extraction analysis and study of the stability of *Hibiscus* anthocyanins. *Le bensmiss.u.Technol.*, 23 (1990) 103 - 105
- [14] - G. M. ROBINSON and R. ROBINSON, A survey of anthocyanins. *I. Biochemical Journal*, 25 (5) (1931) 1687
- [15] - V. MOINE et D. DUBOURDIEUX, Une mannoprotéine à ancre GPI responsable de la stabilisation tartrique des vins - Derniers développements industriels. *Revue Française d'Œnologie*, N° 193 (2002) 32 - 35
- [16] - P. F. GUEDEL, M. CISSE, N. AYEISSOU, M. SAKHO, C. M. DIOP, Effet de la gomme arabique et les tanins du tamarin sur la stabilité des anthocyanes de sirop d' *Hibiscus sabdariffa* L. *Afri. Sci.*, 12 (5) (2016) 51 - 58
- [17] - B. A. CEVALLOS, L. CISNEROS-ZEVALLOS, Stability of anthocyanin based aqueous extracts of Andean purple corn and red fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem.*, 86 (2004) 69 - 77
- [18] - D. S. SEIGLER, S. SEILHEIMER, J. KEESY, H. F. HUANG, Tannins from Four Common Acacia species of Texas *Economic Botany*, 40 (2) (1986) 220 - 232
- [19] - E. MACCARONE, A. MACCARONE, P. RAPISARDA, Acylated anthocyanins from oranges. *Annali Di Chemical*, 75 (1-2) (1985) 79 - 86
- [20] - J. FRANCIS, Food colorants : Anthocyanins. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 28 (1989) 273 - 274
- [21] - R. BROUILLARD, In "Anthocyanins as Food Colors", Ed. Academic press, New York, (1982) 1 - 40
- [22] - R. BROUILLARD, G. MAZZA, Z. SAAD, A. M. ALBRECHT-GARY, *J. AM. Chem. Soc.*, (1989) 2604
- [23] - P. G. FAYE, O. B. K. CISSE, M. CISSE, N. AYEISSOU, Effets comparatifs des acides gallique, tanique et malique sur la stabilité des anthocyanes de boissons à base d'extrait aqueux d' *Hibiscus sabdariffa* L. *Afr. Sci.*, 14 (1) (2018) 367 - 374
- [24] - J. F. HARBERTSON, J. A. KENNEDY, D. O. ADAMS, Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir Berries during Ripening. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53 (1) (2002) 54 - 59
- [25] - G. HRAZDINA, Reactions of the anthocyanidin-3, 5-diglucosides : formation of 3, 5-di-(O-β-D-glucosyl)-hydroxyl-7-hydroxycoumarin. *Phytochem*, 10 (1971) 1125 - 1130