

CARACTERIZACIÓN DE ISOQUERCITRINA EN EL EXTRACTO ETANÓLICO DE LOS PÉTALOS DE *TALIPARITI ELATUM* S.W.

José González^{1*}, Armando Cuéllar¹, Lionel Massi², Enmanuel Nossin³, Max Monan³, Frantz François-Haugrin³

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Cuba.

² Facultad de Ciencias, Universidad de Niza Sophia-Antipolis, Francia.

³ ARVARNAM, Martinica, Francia.

*email: jgyaque@ifal.uh.cu

Resumen

La cromatografía líquida (CL) acoplada con un detector ultravioleta la ionización con electroespray (IES) a un tándem de espectroscopia de masas (EM/EM) se utilizó para la generación de huellas dactilares químicas y la identificación de compuestos fenólicos en cuatro muestras sólidas extraídas y aisladas de los pétalos rojos de *Talipariti elatum* utilizando la extracción por Soxhlet con etanol al 95 % durante 20 horas. Se detectaron tres compuestos, y dos de ellos fueron identificados como glicósidos flavonoides, mientras que el otro, se supone que sea un alcaloide con masa molecular impar. El compuesto con masa carga m/z 464 después de ser analizado por EM/EM en ion modo positivo y negativo se sugiere que sea la Isoquercitrina. El mencionado compuesto ha sido identificado por vez primera en las flores de *T. elatum* de Cuba y Martinica.

Palabras clave: flavonoides; CLAR; EM; pétalos; composición química.

Characterization of Isoquercetrin in ethanolic extract from the petals of *Talipariti elatum* S.w.

Abstract

Liquid chromatography (LC) coupled with UV detection and electrospray ionization (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS) was used for the generation of chemical fingerprints and the identification of phenolic compounds in four solid samples extracted and isolated from the red petals of *Talipariti elatum* utilizing Soxhlet extraction with ethanol at 95 % during 20 hours. Three compounds were detected, and two of them were identified as flavonoid glycosides while another one, is supposed to be and alkaloid with impair molecular weight. The compound with m/z of 464 after MS/MS analyses in both positive and negative ion mode is suggested to be Isoquercitrin. The mentioned compound has been identified in *T. elatum* for the first time in Cuban and Martinican flowers.

Keywords: flavonoids; HPLC; MS; petals; chemical composition.

Introducción

Existe un creciente interés en los efectos biológicos de los bioflavonoides, miembros de un amplio grupo de polifenoles en las plantas. Debido al carácter aromático de estos compuestos, los mismos han sido analizados por diferentes métodos cromatográficos. En el caso de la cromatografía líquida de alta resolución o alta eficiencia, ellos han sido realmente detectados por sus propiedades electromagnéticas y su absorbancia ultravioleta. Existen evidencias de que los bioflavonoides conllevan a un metabolismo extensivo durante su ingestión a partir de la dieta hacia todo el organismo y son almacenados en tejidos específicos. Sumado a esto, los radicales libres producidos en los sitios donde existen procesos inflamatorios reaccionan con los bioflavonoides y sus metabolitos, generando nuevos compuestos importantes con propiedades desconocidas hasta ahora. Por estas razones, se requiere el examen cuidadoso de los bioflavonoides y sus metabolitos en los sistemas biológicos. La combinación de la espectroscopia de masas con varios métodos cromatográficos ha demostrado ser altamente exitosa en este sentido (Prasain y col., 2004). Numerosas técnicas analíticas han sido utilizadas para evaluar el metabolismo y la biodisponibilidad de los bioflavonoides "*in vitro e in vivo*" (Kulling y col., 2002; Heinonen y col., 1999). Estos métodos incluyen la cromatografía gaseosa (CG), la cromatografía líquida de alta presión de fase reversa (CLAR), y la electroforesis capilar (EC) combinadas con la absorción ultravioleta (UV), la fluorescencia, la detección electroquímica y la espectrometría de masas.

En los últimos años, varias muestras biológicas tales como, extractos de plantas y de frutos conteniendo mezclas de compuestos fenólicos han sido analizadas con el uso de técnicas tales como, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores con arreglo de diodo (DAD o PAD), o con espectrómetros de masa con ionización por electroespray (ESI) y tiempo de vuelo (ToF) (He, 2000; Zhou y col., 2009). En este contexto, se analizaron varias muestras sólidas de flores caribeñas de *Talipariti elatum* S.w. utilizando estas herramientas. Las estructuras de dos glucósidos flavonoides (Fig.1) fueron elucidadas por experimentos extensivos de CLAR-EM después de su aislamiento.

Talipariti elatum (S.w) Fryxell (Malvaceae) es una planta con amplia distribución en Cuba y Jamaica que crece en diferentes tipos de suelos, particularmente en suelos cenagosos, con un amplio rango de propiedades medicinales reportadas, tales como, aperitiva, emoliente, sudorífica, antiasmática, y excelente expectorante (Roig, 1974; Acosta y Rodríguez, 2006). En Cuba, la especie se conoce como Majagua. En Jamaica esta es conocida como Majó, Blue Mahoe, Cuba Bark y Mountain Mahoe. Mezclada con flores de *Hibiscus rosa-sinensis* es muy utilizada como expectorante y antiasmática en la medicina tradicional cubana. Las actividades antiasmáticas y antioxidante de la gossypitrina,

glucósido flavonoide que se encuentra en mayor proporción en los pétalos de las flores de la planta se incrementa considerablemente por la formación de complejos con metales de transición (González y Cuéllar, 2010; Cuéllar y González, 2010). El objetivo del presente estudio fue evaluar la cantidad de componentes químicos de varios extractos elaborados a partir de los pétalos de las flores de *Talipariti elatum* procedentes de Cuba y Martinica.

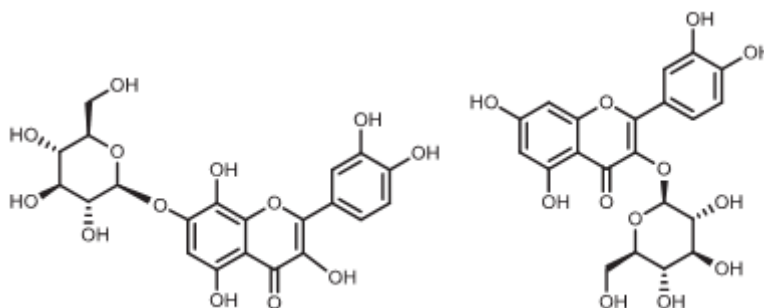


Fig. 1. Estructuras de los compuestos 2 y 3 identificados en *T. elatum*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Tres muestras de pétalos de flores procedentes de Cuba y Martinica se recolectaron en el periodo de floración de las plantas y se utilizan para ello, flores que caen espontáneamente de las plantas después de su maduración. Todas las muestras están debidamente registradas e identificadas con número de herbario **HAJB 82587**, en el Jardín Botánico Nacional de La Habana, Cuba, y en la Farmacopea Francesa como **Fournet 1752 (4232 Guad)**, y tienen registradas como sinónimo *Hibiscus elatus* S.w.

Las muestras de pétalos se sometieron a un proceso de secado que consiste en secado en estufa a 40 °C, durante cinco días (muestra procedente de Cuba #1), una muestra secada en estufa a 45 °C, durante cinco días (procedente de Martinica #2), y una muestra secada a la sombra a temperatura ambiente durante una semana (procedente de Martinica #3).

Disolventes y reactivos

Para la investigación se utilizaron los reactivos y disolventes siguientes: agua para analisis cromatográfico, acetonitrilo (ACN) para analisis cromatográfico, etanol de grado analítico, ácido acético de grado analítico, n-butanol de grado analítico y metanol para analisis cromatográfico de la Merck. Todos los reactivos o disolventes fueron previamente desgasificados en baño ultrasónico antes de su utilización.

Preparación de extractos y muestras

60 g de pétalos de *Talipariti elatum* S.w., secos y molidos, se colocan en un cartucho de un equipo Soxhlet y se extraen durante 20 h con 675 mL (en el balón del equipo) de etanol al 95 %. Se filtra en caliente. Los líquidos orgánicos de extracción se concentran por destilación en evaporador rotatorio hasta un volumen aproximado de 200 mL, a 120 rpm, a una temperatura de 70 °C y una presión de 500 mbar. Los extractos concentrados se refrigeraron hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3 (González y Cuéllar, 2010).

Procedimientos, instrumentos y parámetros en CLAR-UV-IES-EM/EM

El sistema de cromatografía líquida (CL) consistió en un sistema Agilent 1100 HPLC system (Agilent, Palo Alto, CA), incluyendo un Desgasificador (G1322A), Bomba cuaternaria (G1311A), Automuestreador (G1313A), Calentador de columna (G1316A) y Detector con Arreglo de Diodo (DAD) (G1315B). La columna cromatográfica fue Waters Atlantis C18, 150mm x 2.1 mm x 3µm. La elución se realizó con un flujo de 3 mL/min., utilizando como eluente (A) H₂O 0.1% y como eluente (B) ACN 0.1%. Todos los disolventes fueron desgasificados previamente antes de su utilización en un baño ultrasónico sin filtración. Un gradiente de A = 90.0% y B = 10.0% durante 3 min, seguido por sostenimiento del gradiente durante 37 min, entonces se cambió el gradiente de A = 0,0% y B = 100.0% durante 5 min y revirtiéndose hacia A = 90.0% y B = 10.0% durante 5 min.

Los análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (CL-EM) fueron realizados en un espectrómetro de masa ThermoFinnigan (Thermo Electron, San José, CA) 3D con trampa iónica equipado con una fuente de Electro spray. El análisis por cromatografía líquida se realizó con las condiciones descritas anteriormente, excepto que los datos UV se registraron desde 190 hasta 400 nm (PDA). Para la espectrometría de masas se utilizaron ambos modos de escaneo con la ionización por electro spray: positivo y negativo, con un rango de escaneo desde 50 hasta 1500 uma. La temperatura del capilar fue de 275, 00 °C, flujo del gas 50,00 ua, gas auxiliar limpiador 10,00 ua, IES Polaridad positiva: Voltaje de la fuente 4,50 kV, Voltaje del capilar: 37,00 V, Salida del tubo lente: 30,00 V, Amplificador multipolar RF (Vp-p): 400,00, Multipolar 1: 4,00 V, Multipolar 2: -6,00, Voltaje del lente intermultipolar: -30,00 V. IES Polaridad negativa: Voltaje de la fuente 4,50 kV, Voltaje del capilar: -10,00 V, Salida del tubo lente: -50,00 V, Amplificador multipolar RF (Vp-p): 400,00, Multipolar 1: 3,00 V, Multipolar 2: 7,00, Voltaje del lente intermultipolar: 16,00 V. Los experimentos MS² de las tres muestras se registraron entre 130,0 y 650,0 m/z en ión modo negativo.

Resultados

Análisis por CLAR-DAD y EM de los Compuestos Fenólicos

Las figuras 2 y 3 muestran los cromatogramas totales de los tres compuestos naturales investigados por CL-EM (1, 2 y 3). Las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron una buena separación de estos compuestos y fueron optimizadas para separaciones posteriores de los extractos crudos de la planta que contienen agliconas o derivados glicosilados de flavonoides en 50 minutos. Las tres muestras sólidas son comparables, y exhibieron dos picos mayoritarios a 14.68 y 16.70 minutos, respectivamente. En la figura 2, se registró un pico adicional a los 11.38 minutos que correspondió a un producto natural con masa molecular de 479 u.m.a.

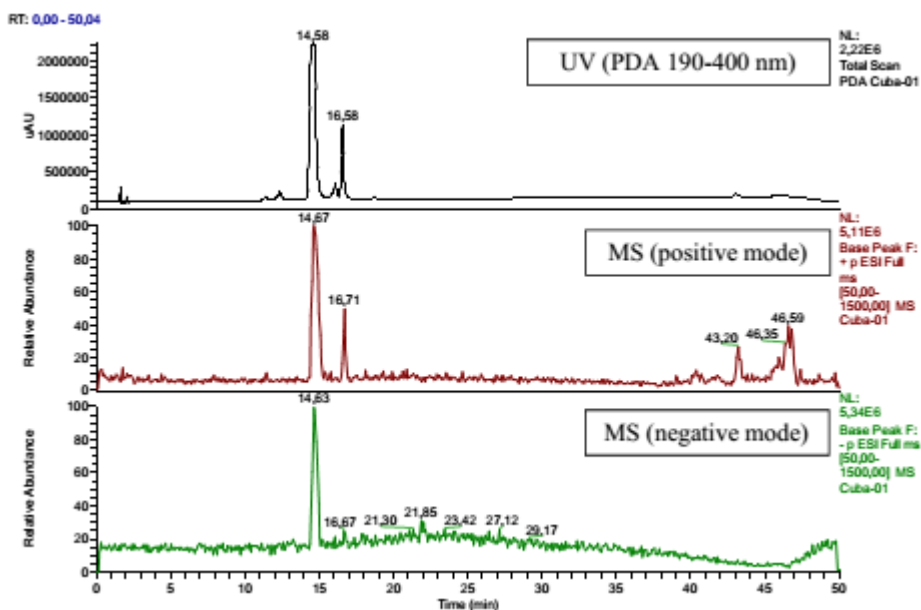


Fig. 2. Cromatograma general del extracto etanólico total de *T. elatum*.

En este trabajo, se sugiere tentativamente la existencia de un alcaloide (pico 1) y de dos flavonas O-glicosiladas. En este caso, las tres muestras son comparables. Solamente la muestra procedente de Martinica #3 mostro una señal suplementaria de 480 u.m.a en espectrometría de masa en ión modo positivo, que debe corresponder con un producto con masa molecular de 479 u.m.a (pico 1). En productos naturales masas impares implican la presencia de nitrógeno. Los tiempos de retención correspondientes para cada compuesto fueron de 11.38 min. (1), 14.68 min. (2) y 16.70 min (3), respectivamente (Fig. 3).

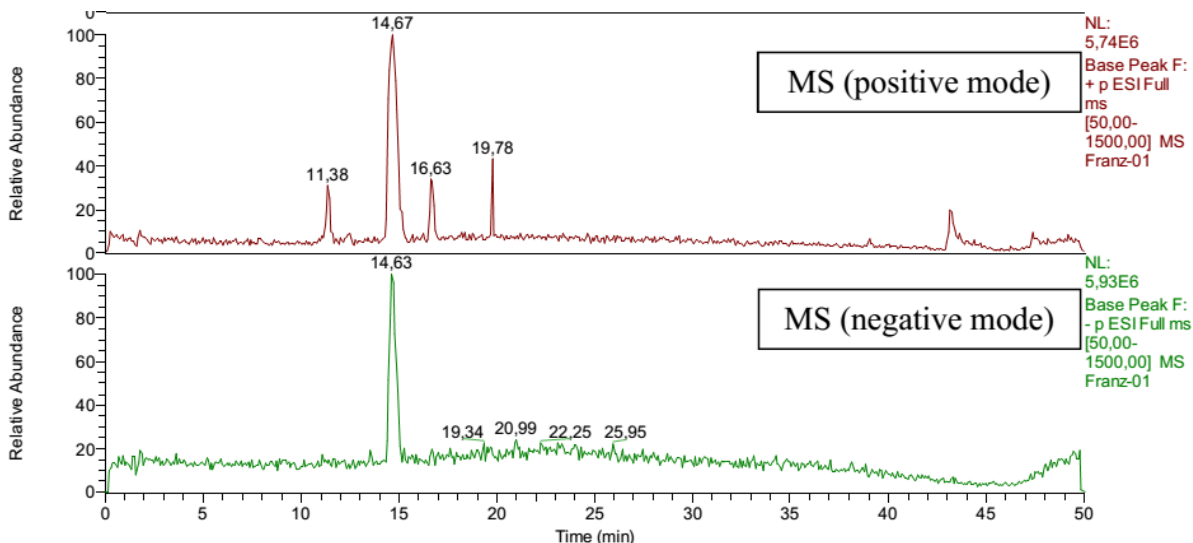


Fig. 3. Cromatograma en ion modo positivo y negativo de la muestra #3 de Martinica.

Discusión

En espectrometría de masa, las flavonas C-glicosiladas experimentan fragmentaciones cruzadas dentro del anillo del azúcar produciendo señales importantes de iones producidos por la pérdida de 60, 90 y 120 u.m.a (Cuyckens & Claeys, 2002; Figueirinha y col., 2008) que permiten la diferenciación con flavonas O-glicosiladas, las cuales presentan pérdidas de 162 u.m.a para las moléculas de hexosas, de 146 para la molécula de rhamnosa y de 132 para las moléculas de pentosa (Simirgiotis y col., 2012).

El pico 2 con una masa molecular de 481 u.m.a en ión modo positivo y de 479 u.m.a en ión modo negativo, es el glucósido flavonoide que fue previamente reportado en *T. elatum* como gossypitrina (Cuéllar y González, 2010). En ion modo negativo el compuesto mostró un pico molecular (pico padre) en m/z 479, el cual produce un ión con m/z 317 por la pérdida de parte de una hexosa (-162), que en este caso es la glucosa.

En el caso del pico 3, los datos UV registrados corresponden a un derivado glicosilado de la quercetina, el cual mostró un ión $[M-H]^-$ con m/z 463, y el mismo produce un ión con m/z 301, lo que permite inferir que en este caso también se produce la pérdida de parte de una hexosa (-162), caracterizado como isoquercitrina (quercetina 3-O-glucosa), la cual fue previamente identificada en las hojas de varias especies de *Crataegus* (*Crataegus monogyna*, *Crataegus pentagyna* y *Crataegus laevigata* (Rosaceae) por comparación con compuestos auténticos (Ding y col., 2010; Prinza y col., 2007).

Dos iones adicionales están presentes en la fragmentación del compuesto 3, los iones con m/z 151.1 y m/z 179.1, que corresponden a los iones fragmentos $[^{1,2}A - CO]$ y $[^{1,2}A^-]$ de la quercetina,

respectivamente (Fig. 4). Ambos iones están reportados en la literatura y ambos constituyen iones diagnósticos para describir las fragmentaciones de los flavonoides.

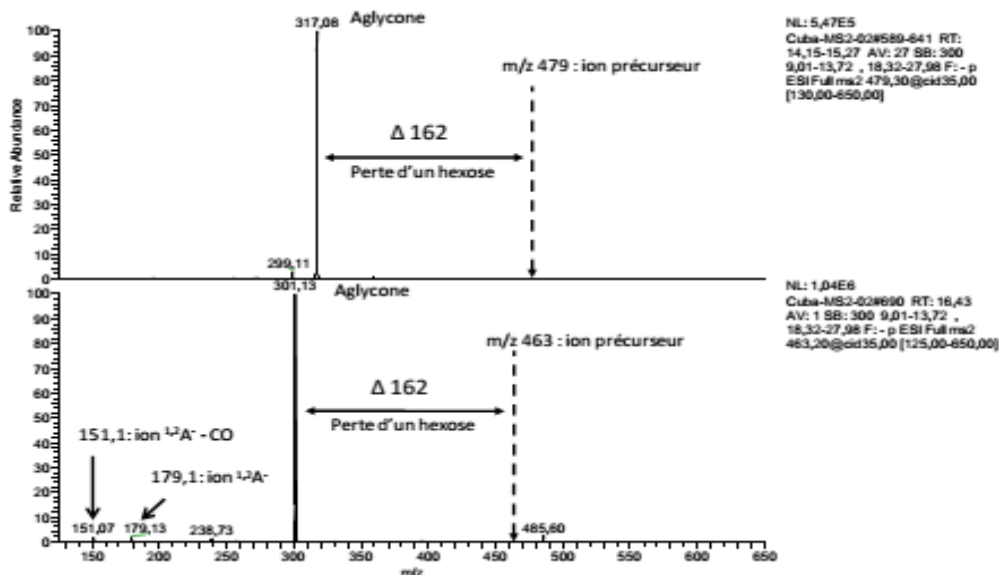


Fig. 4. Espectros de masa de los compuestos 2 y 3 en ion modo negativo.

El compuesto 3 (Figura 5) con datos de bandas registradas en el espectro UV de 252 y 370 nm, un ión pseudomolecular a m/z 463, iones EM/EMa 301, 179 y 151u.m.a fue identificado como Isoquercitrina. Se propone tentativamente la identificación de este glucósido flavonoide, en vez del hiperósido (quercetina 3-O-galactosa), como ha sido publicado por otros autores (Simirgiotis, 2013; 2012) debido a que hasta el momento, en esta planta medicinal, los glucósidos flavonoides reportados presentan en su estructura molecular la molécula de glucosa y no de otra hexosa.

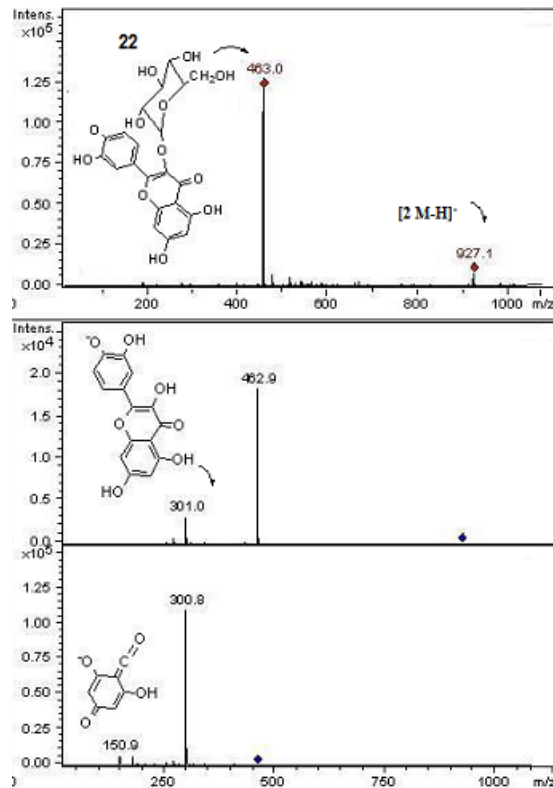


Fig. 5. Estructuras, fragmentaciones, espectro completo por IES-EM y de EM² del compuesto 3.

Conclusiones

Los resultados obtenidos por CLAR mostrados en esta investigación pueden ser utilizados para autenticar y diferenciar las flores de estas dos especies conocidas popularmente como *majagua* o *blue mahoe* procedentes de Cuba y Martinica, las cuales son similares en apariencia, pero crecen en diferentes locaciones y son utilizadas para propósitos medicinales similares. Posteriormente, basados en experimentos de CL/DAD y CL/EM, ha sido analizada la distribución de diferentes compuestos fenólicos y dos de ellos fueron detectados y caracterizados o tentativamente identificados por vez primera en ambas especies de los dos países. Los compuestos identificados pueden ser utilizados también como biomarcadores especialmente para *T. elatum*, debido a la escasa información publicada para esta especie. Los perfiles fenólicos de esta parte de la planta revelan alto predominio de flavonoides, los cuales modulan una gran variedad de eventos biológicos beneficiosos. Más aún, las flores de *T. elatum* pueden ser consideradas una fuente importante de fitoquímicos (principalmente flavonoides y ácidos fenólicos) con propiedades bioactivas para ser exploradas en aplicaciones farmacéuticas.

Referencias

1. Prasain, J. K.; Joones, K.; Kirk, M.; Wilson, L.; Smith-Johnson, M.; Weaver, C.; Barnes, S. Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2004; **51**: 4213-4218.
2. Kulling, S. E.; Honig, D. M.; Simat, T. J.; Metzler, M. Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J. Agric. Food. Chem.* 2002; **48**:4963-4972.
3. Heinonen, S.; Wahala, K.; Adlercreutz, H. Identification of isoflavone metabolites dihydrodaidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-DMA, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Anal. Biochem.* 1999; **274**: 211-219.
4. He, X.G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr. A.* 2000; **880**: 203-232.
5. Zhou, J.-L.; Qi, L.-W.; Li, P. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2009; **1216**: 7582-7594.
6. Roig, J. T. *Plantas Medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba*. Editorial Científico Técnica. La Habana, 1974.
7. Acosta de la Luz, L. L.; Rodríguez Ferradá, C. A. *Plantas medicinales. Bases para una producción sostenible*. Agrinfor, Impresiones MINAG. 2006: 124-125.
8. González, J.; Cuéllar, A. Biological activities of Gossypitrin isolated from the flowers of *Talipariti elatum* S.W. *NCSI Magazine. Biological Sciences. Special Edition.* 2010; **41**. ISSN: 0253-568.
9. Cuéllar, A.; González Yaque J. Obtención del glucósido flavonoide gossypitrina de los pétalos de flores de *Talipariti elatum* S.w y evaluación de su posible efecto antioxidante. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 2010; **2** (2): 338-348.
10. Cuyckens, F.; Claeys, M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; **16**: 2341-2348.
11. Figueirinha, A.; Paranhos, A.; Pérez-Alonso, J.J.; Santos-Buelga, C.; Batista, M.T. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem.* 2008; **110**: 718-728.
12. Ding, X.P.; Wang, X.T.; Chen, L.L.; Qi, J.; Xu, T.; Yu, B.-Y. Quality and antioxidant activity detection of *Crataegus* leaves using on-line high-performance liquid chromatography with diode array detector coupled to chemiluminescence detection. *Food Chem.* 2010; **120**: 929-933.

13. Prinza, S.; Ringla, A.; Huefnerb, A.; Pempa, E.; Kopp, B. 4''-Acetylvitexin-2''-O-rhamnoside, isoorientin, orientin, and 8-methoxykaempferol-3-O-glucoside as markers for the differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae). *Chem. Biodivers.* 2007; 4: 2920–2931.
14. Simirgiotis, M.J.; Silva, M.; Becerra, J.; Schmeda-Hirschmann, G. Direct characterization of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food Chem.* 2012; 131: 318–327.
15. Simirgiotis, M.J. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules.* 2013; 18: 2061-2080.