

# Cuantificación mediante HPLC del contenido en flavonoides de *Hypericum balearicum* L. (Guttiferae)

Aziza TARMIDI, Catalina CABOT, John V. SIBOLE, Maria ALORDA, Antoni BENNÀSSAR y Leonard LLORENS

## SHNB



SOCIETAT D'HISTÒRIA  
NATURAL DE LES BALEARS

Tarmidi, A., Cabot, C. Sibole, J.V., Alorda, M., Bennàssar, A. y Llorens, Ll. 2005. Cuantificación mediante HPLC del contenido en flavonoides de *Hypericum balearicum* L. (Guttiferae). *Boll. Soc. Hist. Nat. Balears*, 48: 95-101. ISSN 0212-260X. Palma de Mallorca.

La familia Guttiferae y en particular el género *Hypericum* incluyen numerosos taxones reconocidos por sus propiedades medicinales. *Hypericum balearicum* L. es una especie endémica del archipiélago de las Islas Baleares, de la que se dispone de muy poca información sobre su contenido en productos naturales. En este trabajo se ha estudiado mediante HPLC-PDA, el contenido en hipericina y flavonoides de esta especie, en plantas de distintas poblaciones de Mallorca y Eivissa. Los flavonoides y la hipericina se separaron y cuantificaron en extractos metanólicos mediante HPLC-PDA. No se detectó en ninguna de las muestras la presencia de hipericina lo cual estaría de acuerdo con el carácter filogenéticamente primitivo de esta especie, ya que la hipericina únicamente aparece en las especies de *Hypericum* más evolucionadas. Los flavonoides mayoritarios identificados en *H. balearicum* fueron rutina, hiperósido+isoquercitrina y quercitrina, mientras que la forma aglicona, quercetina, fue significativamente más baja. Las concentraciones de rutina y hiperósido+isoquercitrina fueron las que presentaron menor variabilidad entre las poblaciones muestreadas y en ambos casos mostraron una relación positiva con la altitud, mientras que la quercetina presentó una relación negativa. La concentración de quercitrina mostró una alta variabilidad no pudiendo ser confirmada su presencia en la mayoría de poblaciones estudiadas. Nuestros resultados muestran que *H. balearicum* es una fuente importante de flavonoides, especialmente rutina y hiperósido+isoquercitrina, compuestos de alto interés farmacológico por sus propiedades antioxidantes.

**Palabras clave:** *endemismos, flavonoides, Hypericum balearicum, Islas Baleares.*

QUANTIFICACIÓ MITJANÇANT HPLC DEL CONTINGUT EN FLAVONOIDES DE *Hypericum balearicum* L. (GUTTIFERAE). La família Guttiferae i en particular el gènere *Hypericum* inclouen nombrosos tàxons reconeguts per les seves propietats medicinals. *Hypericum balearicum* L. és una espècie endèmica de l'arxipèlag de les Illes Balears, de la que es disposa de molt poca informació sobre el seu contingut en productes naturals. En aquest treball s'ha estudiat el contingut en hipericina i flavonoides, mitjançant HPLC-PDA, en plantes de distintes poblacions d'aquesta espècie de Mallorca i Eivissa. Els flavonoides i la hipericina se separaren i quantificaren en extractes metanòlics mitjançant HPLC-PDA. No es va detectar a cap de les mostres la presència d'hipericina el que estaria d'acord amb el caràcter filogenèticament primitiu d'aquesta espècie, ja que la hipericina únicament apareix en les espècies d'*Hypericum* més evolucionades. Els flavonoides majoritaris identificats a *H. balearicum* foren rutina, hiperòsid+isoquercitrina i quercitrina, mentre que la forma aglicona, quercetina, va ser significativament més baixa. Les concentracions de rutina i hiperòsid+isoquercitrina foren les que presentaren menor variabilitat entre les poblacions mostrejades i en ambdós casos mostraren una relació positiva amb l'altitud, mentre que la quercetina va pre-

sentar una relació negativa. La concentració de quercitrina va mostrar una alta variabilitat no sent detectada la seva presència a la majoria de poblacions estudiades. Els resultats mostren que *H. balearicum* és una font important de flavonoides, especialment rutin i hiperòsid+isoquercitrina, composts d'alt interès farmacològic per les seves propietats antioxidants.

**Paraules clau:** *endemismes, flavonoides, Hypericum balearicum, Illes Balears.*

QUANTIFICATION BY HPLC OF THE FLAVINOID CONTENT OF *Hypericum balearicum* L. (GUTTIFERAE). The Guttiferae family and the genus *Hypericum* in particular, have many taxon reknown for their medicinal properties. *Hypericum balearicum* L. is an endemic to the Balearic Archipelago Islands and very little information is known about the contents of its natural products. This work studies the hypericine and flavonoid content by HPLC-PDA in different populations of *H. balearicum* from Mallorca and Eivissa. The hypericine and flavonoid contents were determined from methanolic extracts by HPLC-PDA and identified by comparison with the peaks of pure standards. Hypericine was not found in any of *H. balearicum* plant sample extracts. This would be in accord with the phylogenetically primitive character of this species, as hypericine is only present in the more evolved *Hypericum* species. The main flavonoid concentrations of *H. balearicum* were rutin, hyperoside+isoquercitrin and quercitrin, while the aglycone form, quercetin, was significantly much lower. The rutin and hyperoside+isoquercetrin contents showed the lowest variability amongst all of the populations sampled; and both of these compounds were positive correlated with altitude, while quercetin was negatively correlated. Quercitrin had the highest variability as it was not detectable in the majority of the populations studied. This study shows that *H. balearicum* is an important source of flavonoids, especially rutin and isoquercitrin, compounds of great pharmacological interest for their anti-oxidative properties.

**Keywords:** *endemisms, flavonoids, Hypericum balearicum, Balearic Islands.*

Aziza TARMIDI, Catalina CABOT, John V. SIBOLE, Maria ALORDA, Antoni BENNÀSSAR y Lleonard LLORENS. Laboratori de Fisiologia Vegetal y laboratori de Botànica. Departament de Biologia. Facultat de Ciències. Universitat de les Illes Balears.

Recepció del manuscrit: 25-oct-05; revisió acceptada: 30-des-05.

## Introducción

*H. balearicum* es una especie endémica de las islas Baleares (Bolòs y Vigo, 1996; Pla *et al.*, 1992) conocida por el nombre común de *estepa joana*. Su presencia es frecuente en áreas de montaña de Mallorca (p.e. sierras de Tramuntana y Llevant), y es considerada especie característica de los matorrales de sustitución que prosperan sobre sustratos pedregosos o rocosos propios de estas zonas (Bolòs, 1996; Tébar *et al.*, 2004). En forma de poblaciones más reducidas y fragmentadas, también se

encuentra en Menorca y en Eivissa. En esta última isla, prospera en zonas de bioclima seco o semiárido (Rivas-Martínez, 1995), pero generalmente formando parte de la orla de bosques o en situaciones algo compensadas (p.e. álveo de torrentes) o más áridas compensadas.

*H. balearicum* es un arbusto que crece hasta 1.5 m (Wollenweber *et al.*, 1994), en el que son características una abundante presencia de glándulas, estructuras secretoras inusuales (Curtis y Lersten, 1990), distribuidas por las partes verdes de la misma, especialmente en sus hojas, que desprenden un olor aromático. Las

flores son vistosas, expuestas, con pétalos amarillos. En las zonas más térmicas, la floración empieza en el mes de abril y termina durante el verano, aunque pueden encontrarse esporádicamente individuos con alguna flor en otros periodos del año; en las zonas de montaña este periodo de floración muestra un claro retraso (Tébar, 1992).

En diversas especies del género *Hypericum* se han reconocido principios químicos con actividad farmacéutica, en particular diantronas, florglucinoles, aceites esenciales y flavonoides. Sin embargo, sobre este aspecto existe poca información referente a *H. balearicum*. De modo que sólo Kartnig *et al.* (1996) indican la existencia de altas concentraciones de flavonoides y bajas concentraciones de hipericina en cultivos celulares de esta especie. El objetivo de este trabajo es estudiar el contenido de hipericina y flavonoides en *H. balearicum* en poblaciones silvestres que prosperan en diferentes condiciones edáficas y bioclimáticas de Mallorca e Eivissa.

## Material y métodos

Las plantas utilizadas para el estudio procedían de cuatro poblaciones de Mallorca y tres de Eivissa (Tabla 1).

El material analizado fueron porciones terminales de ramas verdes con botones florales de unos 7-10 cm. Las muestras se recolectaron, en cada localidad, en el mes de abril del 2004, en tres plantas de similar tamaño y edad.

Las muestras se liofilizaron y molieron, y el polvo obtenido se guardó en un envase cerrado herméticamente, deshumidificado con silicagel, que se conservó en oscuridad, en condiciones normales de laboratorio, hasta su posterior análisis.

Los flavonoides fueron extraídos a partir de 0.33 g de tejido seco y pulverizado con 10 ml de metanol, utilizando un aparato soxhlet durante 10 minutos y centrifugados durante 15 minutos a 1521xg. Los extractos metanólicos fueron filtrados usando un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) para la hipericina y un filtro de nylon para los flavonoides, ambos de (0.45 $\mu$ m) de diámetro.

La cuantificación de los flavonoides y de la hipericina se hizo mediante un HPLC (Waters 600E) equipado con un detector PDA a 245 nm. Los compuestos fueron separados utilizando una columna LiChrosorb RP18 (Merck) (4.6 x 250 mm) protegida con una precolumna a temperatura ambiente. Para la separación de los flavonoides se siguió el método de Hansen *et al.* (1999) modificado como sigue: componente A: 0.1% ácido acético: agua y B: acetonitrilo 100%. Se utilizó un gradiente lineal de: 84% A y 16% B desde el minuto 0 al 29, a un flujo de 0.6 ml/min; 84% A y 16% B desde el 29 al 30, a un flujo de 1 ml/min; el 95% A y el 5% B desde el 30 al 45 y 84% A y 16% B desde el 45 al 60; a un flujo de 0.6ml/min. El volumen de inyección fue 10  $\mu$ l.

La hipericina se determinó a 590 nm. Los componentes de la fase móvil utilizados fueron: A: ácido acético a 30% y B: acetonitrilo

Localidad	Coordenadas UTM	Altitud (m)
Nu de la Corbata (Ma)	31S DE 8409	730
Formentor (Ma)	31S EE 1019	375
Monnáber (Ma)	31S DE 8005	760
Puig Major (Ma)	31S DE 8308	940
Coll de Vila (Ei)	31S CD 6712	160
Camí de Ca'n Furnet	31S CD 6712	100
Torrent de Sa Granada	31S CD 6812	70

**Tabla 1.** Ubicación de las localidades de muestreo (coordenadas UTM, cuadrícula 1 km<sup>2</sup> y altitud).

**Table 1.** Location of the sampling (Sites coordinates UTM, square kilometer and altitude).

a 100% con un gradiente lineal a partir de 100% A 100% B durante 20 minutos. El volumen de inyección fue 10  $\mu$ l.

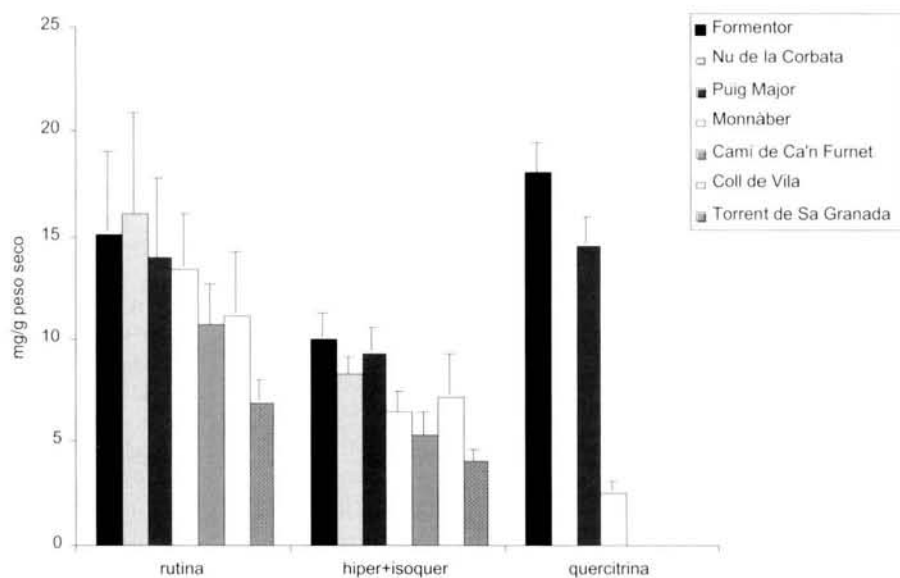
Los flavonoides y la hipericina fueron identificados según el tiempo de retención de los picos y su espectro de absorción en comparación con el que presentaron los estándares puros. La cuantificación se llevó a cabo a partir de las curvas de calibración realizadas mediante concentraciones conocidas de patrones puros.

Todos los estándares, productos químicos y solventes usados fueron del grado de HPLC. Los estándares de hipericina y de quercitrina fueron obtenidos de Extrasynthese S.A. (Genay, Francia). Rutina, hiperósido, isoquercitrina y quercetina fueron obtenidos de CARLROTH GmbH+Co (Karlsruhe, Alemania).

## Resultados y discusión

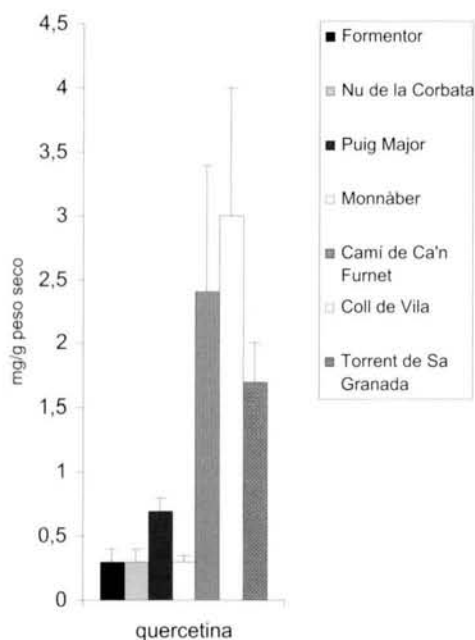
El género *Hypericum* incluye algunas de las especies más interesantes en la fitoterapia y medicina natural actuales. La más popular es *H.*

*perforatum* L., hierba de San Juan, especie con una distribución natural muy amplia, utilizada ya durante la Grecia clásica, y que, actualmente, se ha aclimatado a muchas zonas templadas y mediterráneas de todo el mundo, siendo la especie medicinal con más volumen de negocio a nivel mundial. Entre otras aplicaciones, se utiliza para el tratamiento de distintas enfermedades del sistema nervioso central (Bombardelli y Morazzoni, 1995). Por su contenido en diantronas y floroglucinoles, como la hipericina y la hiperforina, se ha venido utilizando, desde antes del siglo XV, para el tratamiento de la depresión, siendo en la actualidad, en algunos países como Alemania, el tratamiento más recetado para tratar este problema (Barnes *et al.*, 2001). Otro grupo de compuestos muy valorado en fitoterapia, y presentes en este género, son los flavonoides, con una gran capacidad para regular la permeabilidad de las paredes de vasos sanguíneos y capilares, por lo que se utilizan en el tratamiento de una amplia gama de problemas circulatorios. También presentan una importante función



**Fig. 1.** Concentración de rutina, hiperósido+isoquercitrina y quercitrina en *H. balearicum* en plantas de Mallorca y Eivissa recolectadas durante el mes de abril del 2004.

**Fig. 1.** Concentration of rutin, hiperoside+isoquercitrin and quercitrin in *H. balearicum* of Mallorca and Eivissa collected during April of 2004.



**Fig. 2.** Concentración de quercetina en *H. balearicum* en plantas de Mallorca y Eivissa recolectadas durante el mes de abril del 2004.

**Fig. 2.** Concentration of quercetin in *H. balearicum* of Mallorca and Eivissa collected during April of 2004.

antioxidante que favorece entre otros procesos el metabolismo de la vitamina C.

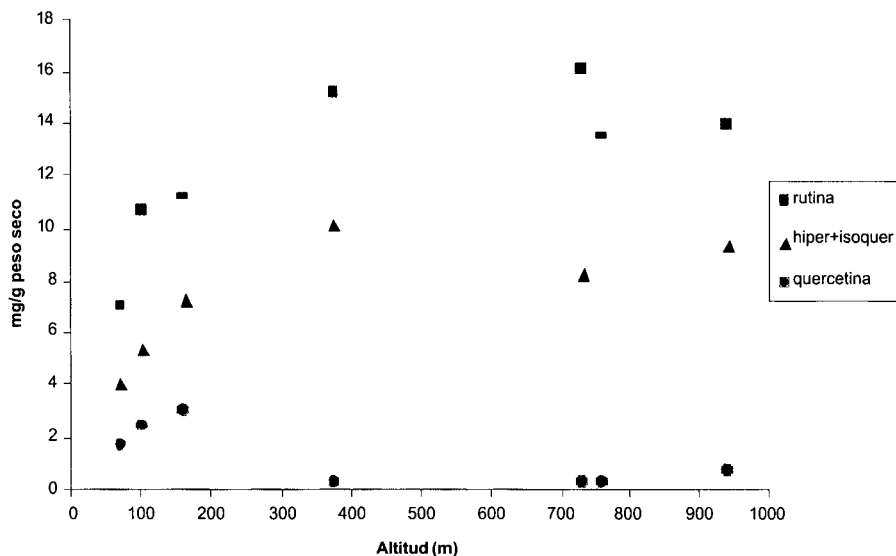
En este estudio no se ha encontrado presencia de hipericina en ninguna de las poblaciones de *H. balearicum* estudiadas. Aunque Kartnig *et al.* (1996) detectaron pequeñas cantidades de este compuesto en cultivos celulares de esta especie, este compuesto no fue detectado en este estudio con plantas crecidas en condiciones de campo. Nuestro resultado concuerda con el hecho bien documentado de que la presencia de glándulas negras en los órganos vegetativos es un indicador fiable de la presencia de hipericina en este género (Kitanov, 2001), sin embargo, estas glándulas no se encuentran en *H. balearicum*. Por otro lado, esta especie pertenece a una de las secciones más primitivas del género *Hypericum*, la *Psorophytum*, y la hipericina junto con la hiperforina son específicas de las

secciones filogenéticamente más evolucionadas y se las considera ausentes en las secciones primitivas del género (Robson, 1981).

Los flavonoides mayoritarios identificados en *H. balearicum* fueron rutina, hiperósido, isoquercitrina, quercitrina y quercetina (Fig. 1). Las condiciones cromatográficas usadas no permitieron la separación de hiperósido y isoquercitrina, por lo que los valores para estos flavonoides se presentan juntos en este trabajo. Sin embargo, resultados anteriores en cultivos celulares (Kartnig *et al.*, 1996) mostraron que en *H. balearicum* la concentración de isoquercitrina era más alta que la de hiperósido.

En todas las poblaciones muestreadas, los flavonoides mayoritarios que presentaron una mayor concentración fueron rutina, hiperósido+isoquercitrina y quercitrina, mientras que la quercetina presentó concentraciones entre 10 y 100 veces más bajas (figs. 1 y 2). Este resultado puede ser debido al hecho de que la quercetina es la única forma aglicona entre los flavonoides cuantificados, o a su posible conversión en formas glicosiladas. En este sentido, Miao *et al.* (2003) consideraron que la disminución que encontraron del contenido de quercetina en las hojas de *Apocynum venetum* y de *Poacynum hendersonii*, era debida a una conversión de la quercetina en otros flavonoides que aumentaron su concentración.

La concentración de flavonoides en *H. balearicum* es elevada en comparación con la encontrada en otras especies de este género, especialmente en el caso de la rutina. El rango de concentraciones en *H. balearicum* osciló entre 8,4 y 25,8 mg/g peso seco para la rutina, 4,7 y 12,6 mg/g peso seco para el hiperósido+isoquercitrina y 0,03 y 0,4 mg/g peso seco para la quercetina. Mullinacci *et al.* (1999) no detectaron presencia de rutina en muestras de *H. perforatum* recolectadas en distintas localidades de Italia. Umeck *et al.* (1999) encontraron valores entre 0 y 9,68 mg/g peso seco para la rutina, 2,1 y 28,9 mg/g peso seco para el hiperósido+isoquercitrina y 0 y 0,68 mg/g peso seco para la quercetina en *H. perforatum*, mientras que en *H. maculatum*, *H. tetraprimum*, *H. montanum*, *H. humifuzum* y *H. hir-*



**Fig. 3.** Relación entre la concentración de rutina, hiperósido+isoquercitrina y quercetina y la altitud en *H. balearicum* en plantas de Mallorca y Eivissa recolectadas durante el mes de abril del 2004.

*Fig. 3. Relation between the concentration of rutin, hyperoside-isohydroxyquercetin and quercetin and the altitude in H. balearicum of Mallorca and Eivissa collected during April of 2004.*

*sutum* el rango valores osciló entre 0 y 2 mg/g peso seco para la rutina, 0 y 26,3 mg/g peso seco para el hiperósido+isoquercitrina y 0 y 2 mg/g peso seco para la quercetina. La rutina y el hiperósido+isoquercitrina presentaron la menor variación encontrada entre poblaciones y su presencia se vio favorecida por la altitud, siendo inferior su concentración en las poblaciones de Eivissa (fig. 1). En contraste, la quercetina presentó concentraciones más elevadas en las poblaciones localizadas a menor altitud (fig. 2). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Umeck *et al.* (1999) en poblaciones de *H. perforatum* localizadas a distinta altitud en Eslovenia, en las que la concentración de rutina se incrementó con la altitud, mientras que la de hiperósido disminuyó. El incremento de algunos flavonoides con la altitud podría estar relacionado con una respuesta de la planta al aumento en UV-B (Kreft *et al.*, 2002). Aunque no siempre comprobado (Martonfi *et al.*, 2002), se ha observado que los flavonoides pueden filtrar la luz del

UV-B (Rozema *et al.*, 2000), protegiendo el tejido de la planta contra esta forma dañina de radiación.

Estos resultados muestran que *H. balearicum* es una buena fuente de flavonoides, sobre todo rutina, que presenta en esta especie una variación interpoblacional inferior a la observada en otras especies de este género. Este hecho podría estar relacionado con el carácter paleoendémico y con la reducida área de esta especie.

### Agradecimientos

Quisiéramos expresar nuestro agradecimiento por la ayuda prestada a J. Sastre en los trabajos de campo y muestreo y a J.P. Cánovas, del *Servei Científicotècnic* de la *Universitat de les Illes Balears*, en los análisis con HPLC.

Un especial recuerdo y agradecimiento al Dr. E. Chornet por su consejo y sugerencias en la programación de las tareas experimentales.

## Bibliografía

- Barnes, J., Anderson, L.A. y Phillipson J.D. 2001. St John's *Hypericum perforatum* L.: a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Phar. Pharmacol.*, 53: 583-600.
- Bolòs, O. 1996. La vegetació de les Illes Balears. Comunitats de plantes. Arxius de la Secció de Ciències CXIV. Institut d'Estudis Catalans. Barcelona
- Bolòs, O. y Vigo, J. 1996. Flora dels Països Catalans. Vol. 3. Barcelona. Barcelona
- Bombardelli, E. y Morazzoni, P. 1995. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 46: 43-58.
- Curtis, J.D. y Lersten, N.R. 1990. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. *Ann. Bot.*, 114: 571-580.
- Hansen, S.H., Jensen, A.G., Cornett, C., Bjornsdottir, I., Taylor, S., Wright, B. y Wilson, I.D. 1999. High-performance liquid chromatography on-line coupled to high field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum*. *Anal. Chem.*, 71: 5235-5241.
- Kartnig, Th., Göbel, I. y Heydel B. 1996. Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. *Planta Med.*, 62: 51-53.
- Kitanov, G.M. 2001. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem. System. Ecol.*, 29: 171-178.
- Kreft, S., Strukelj, B., Gaberscik, A. y Kreft, I. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and a HPLC method. *J. Exp. Bot.*, 53: 1801-1804.
- Mártonfi, P., Repcák, M., Ciccarelli, D. y Garbari, F. 2001. *Hypericum perforatum* L. chemotype without rutin from Italy. *Biochem. System. Ecol.*, 29: 659-661.
- Miao, M., Cheng-Lin, H., Shu-Qin, A. y Bo, L. 2003. Seasonal, spacial, and interspecific variation in quercetin in *Apocynum venetum* and *Poacynum*. *J. Agricul. Food Chem.*, 51, 2390-2393.
- Mulinacci, N., Bardazzi, C., Romani, A., Pinelli, P., Vincieri, F.F. y Costantini, A. 1999. HPLC-DAD and TLC-densimetry for quantification of hypericin on *Hypericum perforatum* L. extracts. *Chromatographia*, 49:197-201.
- Pla, V., Sastre, B. y Llorens, L. 1992. Aproximació al catàleg de la flora vascular de les Illes Balears. Universitat de les Illes Balears. Palma de Mallorca.
- Rivas-Martínez, S. 1995. Clasificación bioclimática de la Tierra. *Folia Botanica Matritensis*, 16: 1-32.
- Robson, N.K.B. 2003. *Hypericum* botany. In: Ernst, E. (ed.). *Hypericum*. The genus *Hypericum*. 1-22. Taylor and Francis group. London and New Cork.
- Rozema, J., Björn, L.O., Bornean, J.F., Gaberscik, A., Häder, D.P. y Trost T. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems. An experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *Phytochem. Photobiol.*, 66: 2-12.
- Tébar, F.J. 1992. Biología reproductiva del matorral de la montaña mallorquina. Tesis Doctoral. Universitat de les Illes Balears.
- Tébar, F.J., Gil, L. y Llorens, L. 2004. Flowering and fruiting phenology of a xerochomaphytic shrub community from de the mountain of Majorca (Balearic island. Spain). *Plant Ecol.* 174: 295-306
- Umeck, A., Kreft, S., Karting, T. y Heydel, B. 1998. Quantitative phytochemical analyses of six *Hypericum* species growing in Slovenia. *Planta Med.*, 65:388-390.
- Wollenweber, E., Dörr, M., Roitman, J.N. y Arriaga-Giner F.J. 1994. Triterpenes and a novel natural xanthone as lipophilic glandular products in *Hypericum balearicum*. *Z. Naturforsch.*, 49: 393-394.