

Nº Reg: 740.297

Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS POLIFENÓLES  
DE ESPECIES DEL GÉNERO **SALVIA** L.

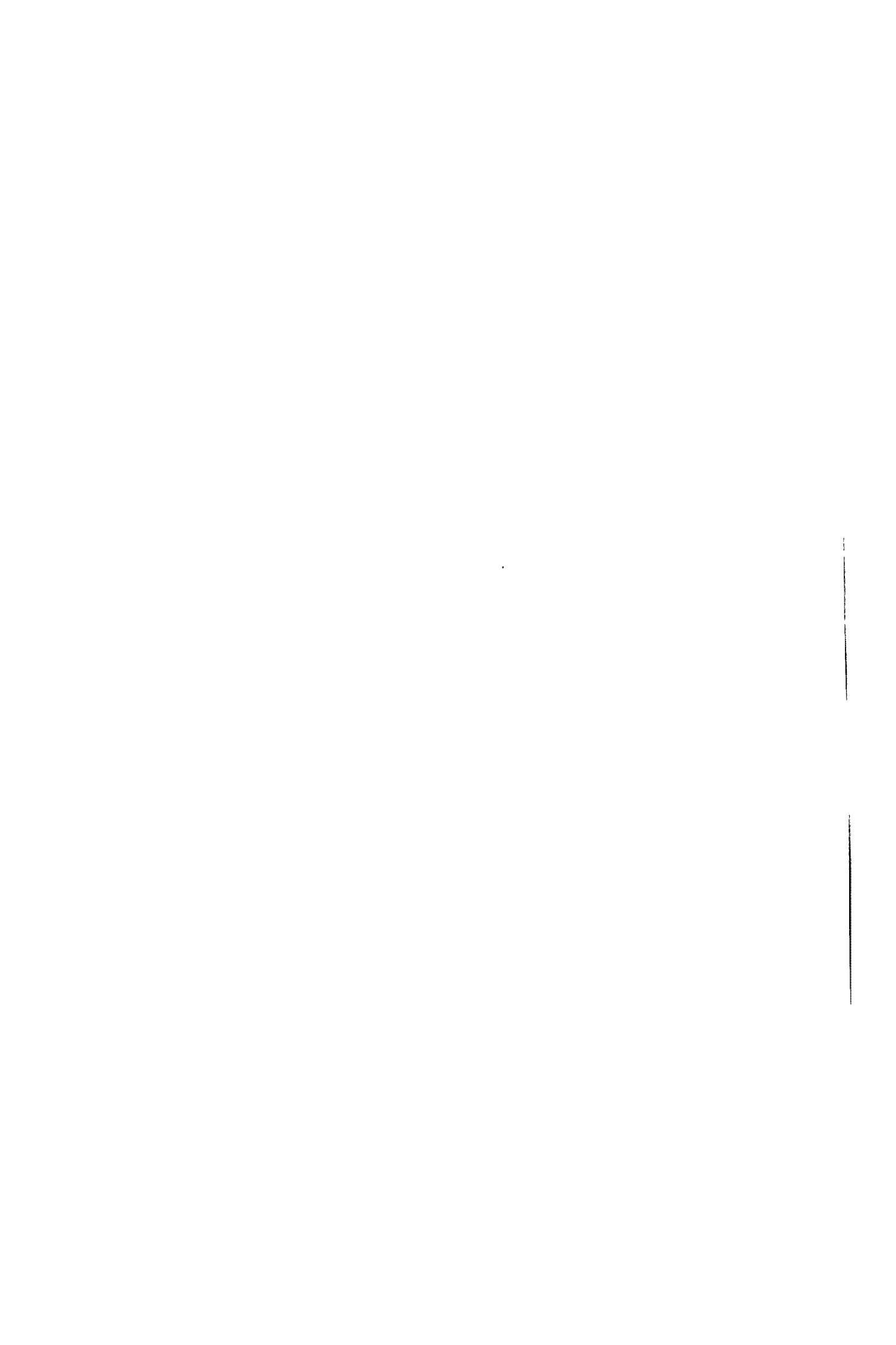
*Memoria presentada por D.  
**SALVADOR CAÑIGUERAL FOLCARÀ,**  
dirigida por el Dr. José  
Iglesias Inglés, para optar  
al Grado de Doctor en Farma-  
cia.*

*Barcelona, Septiembre de 1986.*

## Capítulo V:

### INVESTIGACION DE SALVIA LAVANDULIFOLIA VAHL SUBSP. LAVANDULIFOLIA.

1. *Extracción.*
2. *Estudio del extracto "eter de petroleo".*
3. *Estudio del extracto clorofórmico.*
4. *Estudio del extracto metanólico.*
5. *Determinación estructural de las substancias aisladas.*



V.1.- EXTRACCIÓN.

El material de partida han sido las hojas desecadas de *Salvia lavandulifolia* Vahl subsp. *lavandulifolia* (muestra nº20 en la tabla III-1) recolectada en Bujaraloz (Z) en junio de 1983, constituyendo ejemplares de herbario testigo los depositados en los pliegos BCF 30780 y M 4267.

La extracción ha sido efectuada a partir de 100 g de las mismas, con disolventes de polaridad creciente (éter de petróleo, cloroformo y metanol) según se indica en la figura V-1, con el rendimiento siguiente:

- Extracto "éter de petróleo" ..... 6,4 g
- Extracto clorofórmico ..... 10,5 g
- Extracto metanólico ..... 14,0 g

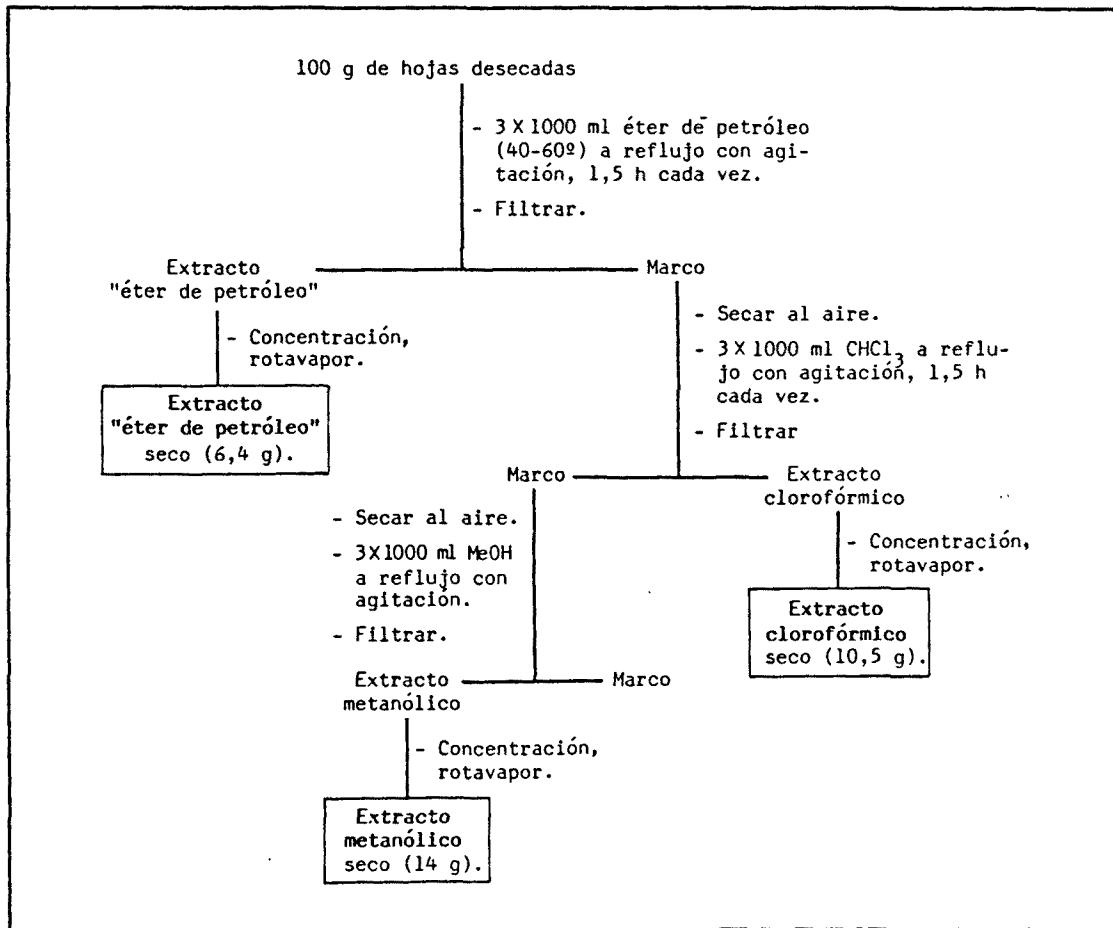


FIGURA V-1: Proceso extractivo seguido para las hojas de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*.

Seguidamente, se estudiaron separadamente los extractos obtenidos, en la forma que se indica en los apartados que siguen.

### V.2.- ESTUDIO DEL EXTRACTO "ÉTER DE PETRÓLEO".

El análisis por TLC de este extracto muestra la existencia de dos flavonoides, uno mayoritario y un segundo en pequeña cantidad. El proceso seguido para aislarlos se esquematiza en la figura V-2. En primer lugar, el "extracto éter de petróleo" seco se trató con metanol. La fracción soluble en metanol, mediante "flash chromatography" y sucesivas purificaciones por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y cromatografía en papel Whatman-3, proporcionó 30 mg de la sustancia A, que se cristalizó en metanol y fue posteriormente identificada como salvigenina, y una cantidad inferior a 1 mg de la sustancia G, identificada más tarde como 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona.

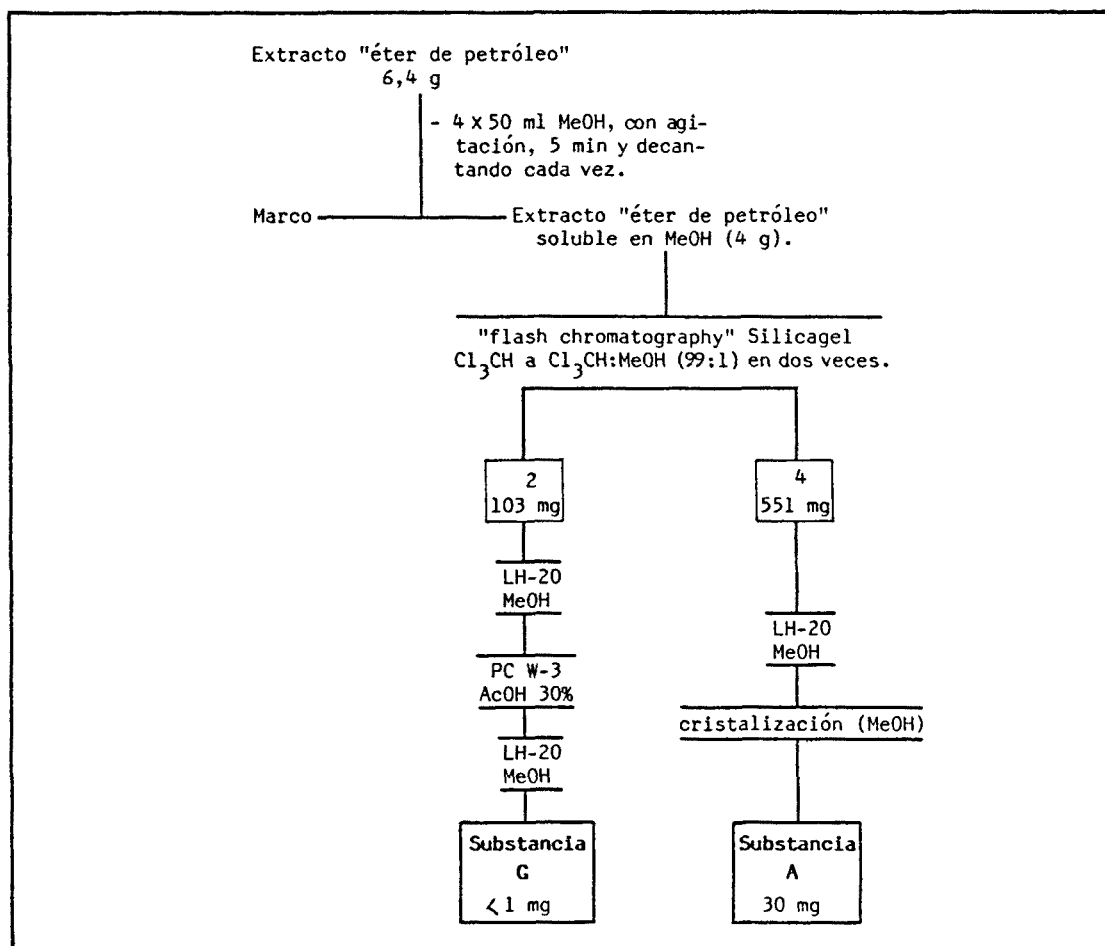


FIGURA V-2: Proceso seguido en el tratamiento del extracto "éter de petróleo" de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. LH-20: Columna de Sephadex LH-20. PC W-3: Cromatografía en papel Whatman 3.

V.3.- ESTUDIO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO.

El análisis del extracto clorofórmico por TLC mostró que contenía, al menos, cuatro flavonoides. Fue fraccionado por "flash chromatography" en once fracciones, las cuales, mediante purificaciones por cromatografía en columna de poliamida, silicagel o Sephadex LH-20, cromatografía en capa fina centrífuga y cromatografía en papel (en la forma en que se indica en la figura V-3), proporcionaron cinco aglicones flavónicos. Las cantidades obtenidas y el resultado de la identificación posterior, fueron los siguientes:

- Substancia A (5 mg): Salvigenina
- Substancia B (26 mg): Eupatorina
- Substancia C (30 mg): Cirsimaritina
- Substancia D (2 mg): Hispidulina
- Substancia E (2,5 mg): Genkwanina

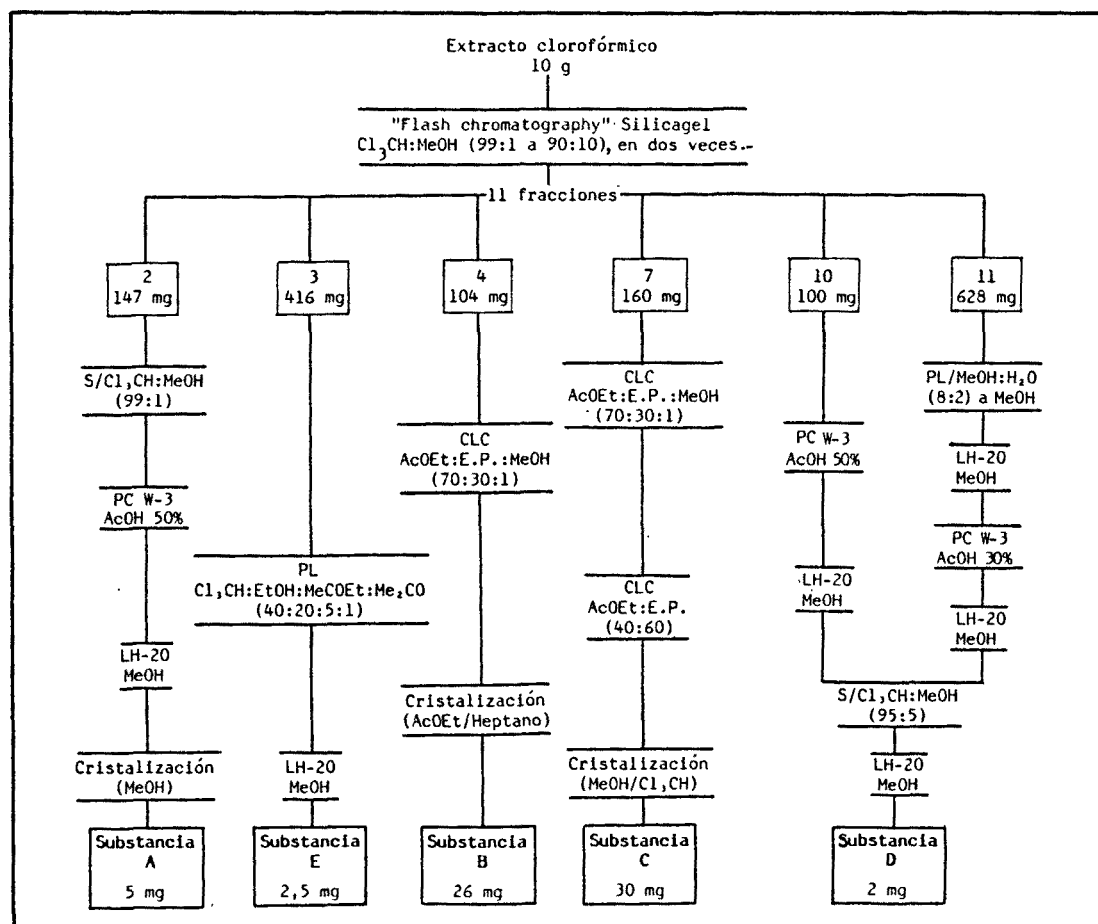


FIGURA V-3: Esquema del aislamiento de los flavonoides del extracto clorofórmico de *S. lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. CLC: cromatografía en capa fina centrífuga de silicagel. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PC W-3: Cromatografía en papel Whatman 3. PL: columna de poliamida CC<sub>6</sub>. S: columna de silicagel.

#### V.4.- ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO.

Una parte (7 g) del extracto metanólico fué fraccionado por cromatografía contra-corriente en gotas (método ascendente) utilizando como fases móvil y estacionaria, las fases superior e inferior respectivamente de la mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{MeOH}:\text{PrOH}:\text{H}_2\text{O}$  (5:6:1:4). El eluato se dividió en doce fracciones (1-12) y al vaciar la fase estacionaria del cromatógrafo, ésta se separó en dos nuevas fracciones (A y B). El rendimiento del proceso fué aproximadamente del 94%. Subsiguientes purificaciones por cromatografía en columna de poliamida y Sephadex LH-20, cromatografía en capa fina centrífuga y cromatografía en papel Whatman 3 y Whatman 1, permitieron aislar 8 substancias, cuya identificación posterior resultó como sigue:

Substancia F	(2 mg):	Apigenina
Substancia H	(7 mg):	Luteolina
Substancia I	(130 mg):	Ácido rosmarínico
Substancia J	(15 mg):	7-0- $\beta$ -D-glucosil-luteolina
Substancia K	(2 mg):	Nepetina
Substancia L	(10 mg):	3-0- $\beta$ -D-glucosil-quercetina
Substancia M	(10 mg):	4'-0-diglucuronil-luteolina
Substancia N	(12 mg):	7-0-(6-0- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosil)- luteolina

En la figura V-4 se esquematiza el proceso de aislamiento de estas substancias.

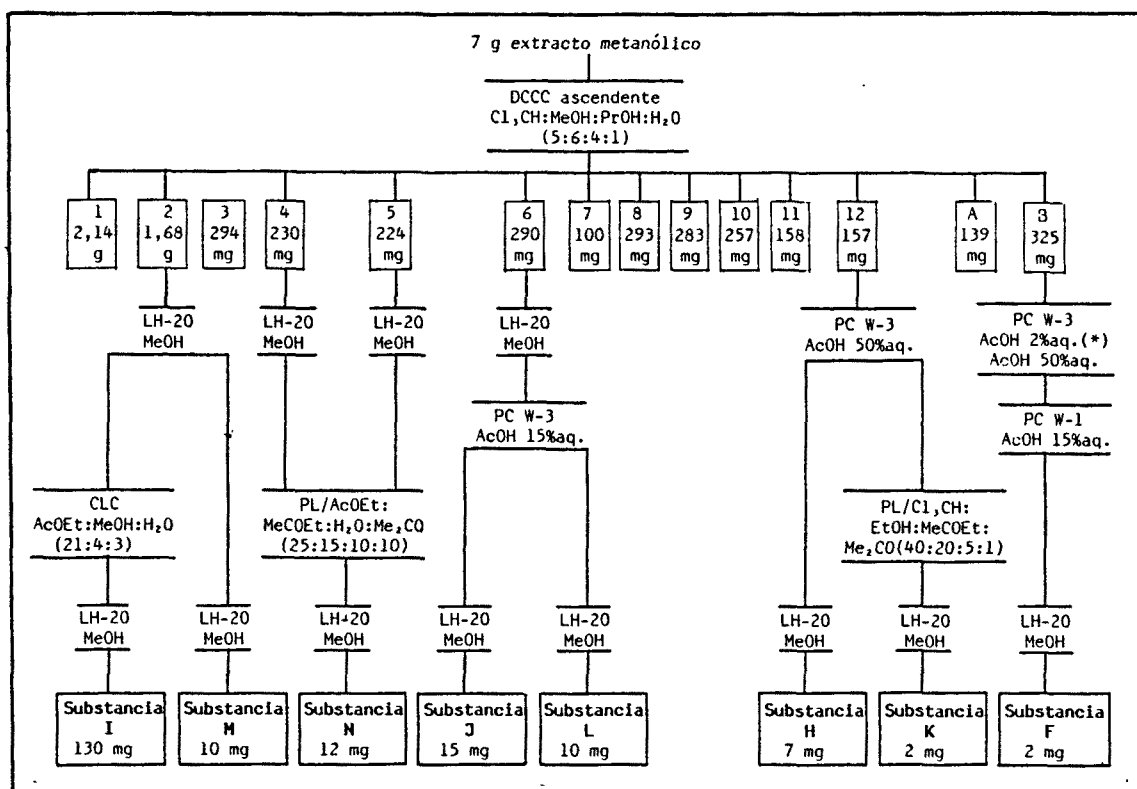


FIGURA V-4: Proceso de aislamiento seguido a partir del extracto metanólico de *S. lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. CLC: cromatografía en capa fina centrífuga en placas de silicagel. DCCC cromatografía contra-corriente en gotas. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PC W-3: cromatografía en papel Whatman 3. PC W-1: cromatografía en papel Whatman 1. PL: columna de poliamida CC6.  
(\*): Se eluyó primeramente con AcOH 2%aq. a fondo perdido durante dos días para eliminar ácidos fenóles, seguidamente la separación se efectuó eluyendo con AcOH 50%aq.

## V.5.- DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SUBSTANCIAS AISLADAS.

### V.5.1.- COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO.

Las características cromatográficas (Rf en diversos sistemas y revelado) de las sustancias aisladas a partir de las hojas de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* se reúnen en la tabla V-1 para los aglicones flavónicos, tabla V-2 para los heterósidos flavónicos, tabla V-3 para los aglicones liberados en la hidrólisis (HCl 2N, 120 min, 100°C) de los heterósidos y tabla V-4 para la sustancia I frente al ácido rosmarínico.



Las abreviaciones utilizadas para el revelado son las siguientes:

A = Amarillo	ALF = Azul-lila fluorescente
AB = Amarillo brillante	A0 = Amarillo oscuro
AC = Amarillo claro	AV = Amarillo verdoso
ACF = Amarillo claro fluorescente	N = Naranja
AF = Azul fluorescente	V0 = Violáceo oscuro

Y para los sistemas cromatográficos en capa fina:

CL-1 = Celulosa/AcOH 50%aq.	S-1 = Silicagel/Cl <sub>3</sub> CH:MeOH (93:7)
CL-2 = Celulosa/AcOH 30%aq.	S-2 = Silicagel/Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)
CL-3 = Celulosa/H <sub>2</sub> O	S-3 = Silicagel/Cl <sub>3</sub> CH:Hexano:MeOH (40:40:5)
	S-4 = Silicagel/AcOEt:MeCOEt:AcOH:H <sub>2</sub> O (5:3:1:1)
	S-5 = Silicagel/Cl <sub>3</sub> CH:MeOH:H <sub>2</sub> O (65:45:12)

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC				
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-1	CL-2	S-1	S-2	S-3
A	V0	V0	V0	V0	92	46	72	58	52
B	V0	V0	V0	V0	87	46	56	39	24
C	V0	V0	V0	V0	89	49	40	35	16
D	V0	V0	V0	V0	79	37	29	33	10
E	V0	A	A	A	81	29	42	41	19
F	V0	A0	A	AV	70	28	26	25	7
Api.	V0	A0	A	AV	70	27	25	25	7
G	V0	V0	A	A	81	26	73	65	58
MeG	V0	V0	A	A	81	26	73	65	58
H	V0	A	A	N	56	21	16	13	4
Lut.	V0	A	A	N	55	21	15	13	4
K	V0	V0	V0	N	65	28	19	18	5

TABLA V-1: Características cromatográficas de los aglicones flavónicos aislados de las hojas de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. Api. = apigenina; Lut. = luteolina; MeG = 4'-O-Me-genkwanina (5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona). Para otras abreviaturas, ver texto.

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC			
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-2	CL-3	S-4	S-5
J	V0	A	A	N	35	25	42	50
L	V0	A	A	N	63	25	43	48
M	V0	V0	A	AV	51	0,34	17	29
N	V0	A	A	N	55	25	19	26
7GLu.	V0	A	A	N	36	25	42	50

TABLA V-2: Características cromatográficas de los heterósidos flavónicos aislados de las hojas de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. 7GLu.: 7-glucosil-luteolina. Para otras abreviaturas ver texto.

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC				
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-1	CL-2	S-1	S-2	S-3
J-A	V0	A	A	N	57	22	16	13	4
M-A	V0	A	A	N	56	21	15	13	4
N-A	V0	A	A	N	56	21	15	13	4
Lut.	V0	A	A	N	56	21	16	13	4
Api.	V0	A0	A	AV	70	28	26	25	7
L-A	A	AB	AB	N	42	13	11	20	3
Quer.	A	AB	AB	N	43	13	11	20	3
Kae.	A	AB	AB	N	39	10	9	19	2

TABLA V.3: Características cromatográficas de los aglicones liberados por hidrólisis (HCl 2N, 120 min, 100°C) de los heterósidos aislados de las hojas de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*. La letra del heterósido seguida de A indica el aglicón correspondiente. Lut.: luteolina; Api.: apigenina; Quer.: quercetina; Kae.: kaempferol. Para otras abreviaturas, ver texto.

		Substancia I	Ácido rosmarínico
REVELADO	UV366nm	AF	AF
	NH <sub>3</sub> /UV366nm	ACF	ACF
	AlCl <sub>3</sub> /UV366nm	ALF	ALF
	NEU/UV366nm	AC	AC
RF X 100 TLC	CL-1	84	84
	CL-2	78	78
	S-1	0	0
	S-2	2	2
	S-3	0	0
	S-4	87	86
	S-5	29	29

TABLA V-4: Características cromatográficas de la substancia I, frente al ácido rosmarínico. Para abreviaturas, ver texto.

#### V.5.2.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA A.

Aislada de los extractos "éter de petróleo" y clorofórmico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Punto de fusión (Kofler): 188-189°C. Bibliografía: 187-188°C [ULUBELEN & UYGUR, 1976].
- Espectroscopía ultravioleta-visible: figura V-5.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura V-6.
- Espectroscopía de <sup>1</sup>H-NMR: figura V-7.

El comportamiento cromatográfico es el de una flavona altamente metoxilada. El pico molecular del espectro de masas (m/z=328) corresponde a una fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, indicando que se trata de una hidroxitrimetoxiflavona.

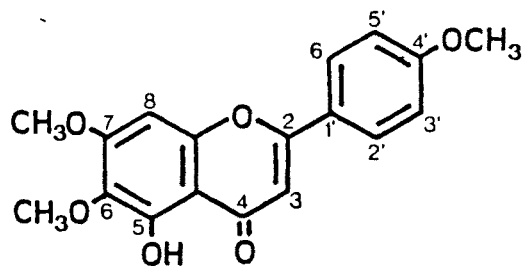
El espectro UV-visible corresponde a una 5-OH-flavona substituida

en la posición 6 (banda I no desdoblada en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  y  $\Delta\lambda_{\text{I}}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  respecto a MeOH de 21 nm) y metoxilada en la posición 7 (ausencia de  $\Delta\lambda_{\text{II}}$  batocrómico entre NaAcO y MeOH) monosustituida en el anillo B.

En el espectro de masas, los picos a 132, 133, 117 y 135, correspondientes a  $\text{B}_1^+$  y derivados y  $\text{B}_2^+$  indican la existencia de un solo metoxilo en el anillo B, que gracias al espectro de  $^1\text{H-NMR}$  puede situarse en la posición 4'.

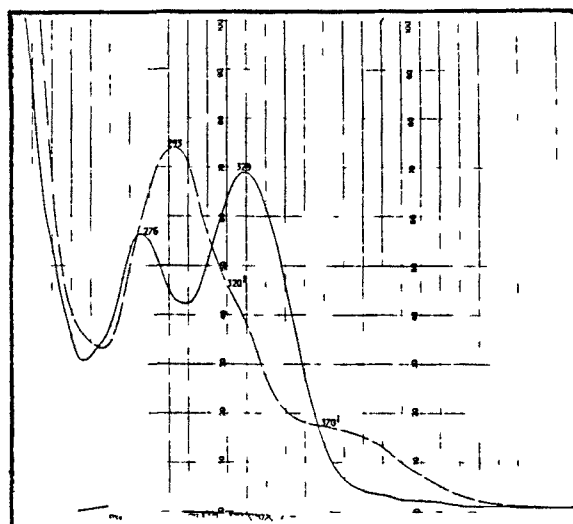
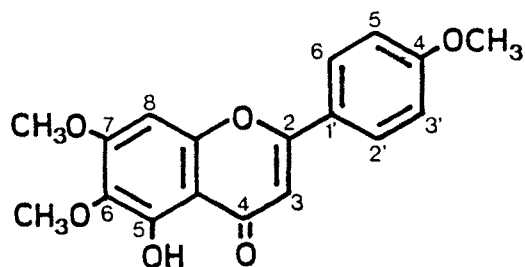
El anillo A debe contener, pues, un hidroxilo y dos metoxilos. La fácil pérdida de un radical metilo por el ión molecular, provocando un intenso M-15 a  $m/z = 313$  indica un metoxilo en 6 o en 8. Ya que la espectroscopía UV-visible nos ha delatado un 5-OH libre y una sustitución en 6, resultará que en esta posición habrá un metoxilo y que el segundo metoxilo del anillo A es el que substituye la posición 7.

La  $^1\text{H-NMR}$  confirma la estructura propuesta, que corresponde a la 5-OH-6,7,4'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona (salvigenina o psatirotina), cuyo punto de fusión es similar al de la sustancia A.

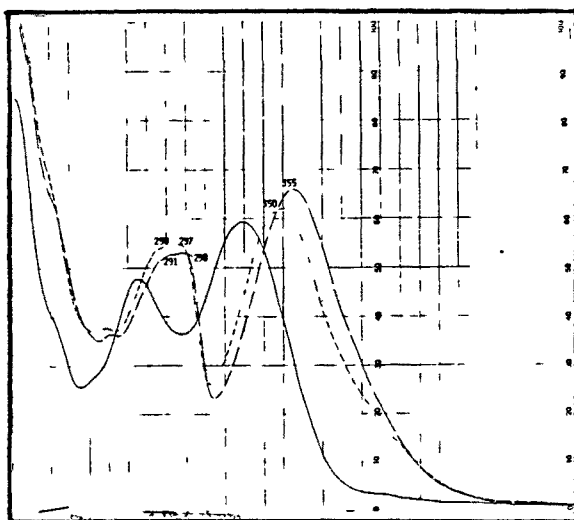


Substancia A: 5-OH-6,7,4'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona (salvigenina o psatirotina).

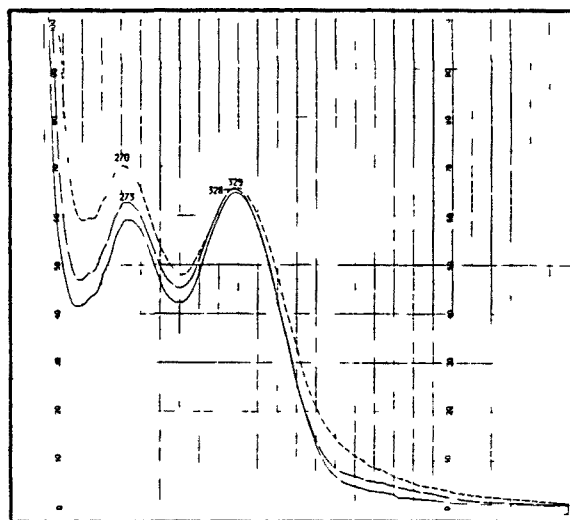
FIGURA V-5: Espectros UV-visible de la sustancia A.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- · - · AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
- · - · NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	276	329
NaOMe:	293	320i 370i
AlCl <sub>3</sub> :	291	298 355
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	290	297 350
NaOAc:	273	328
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	270	329

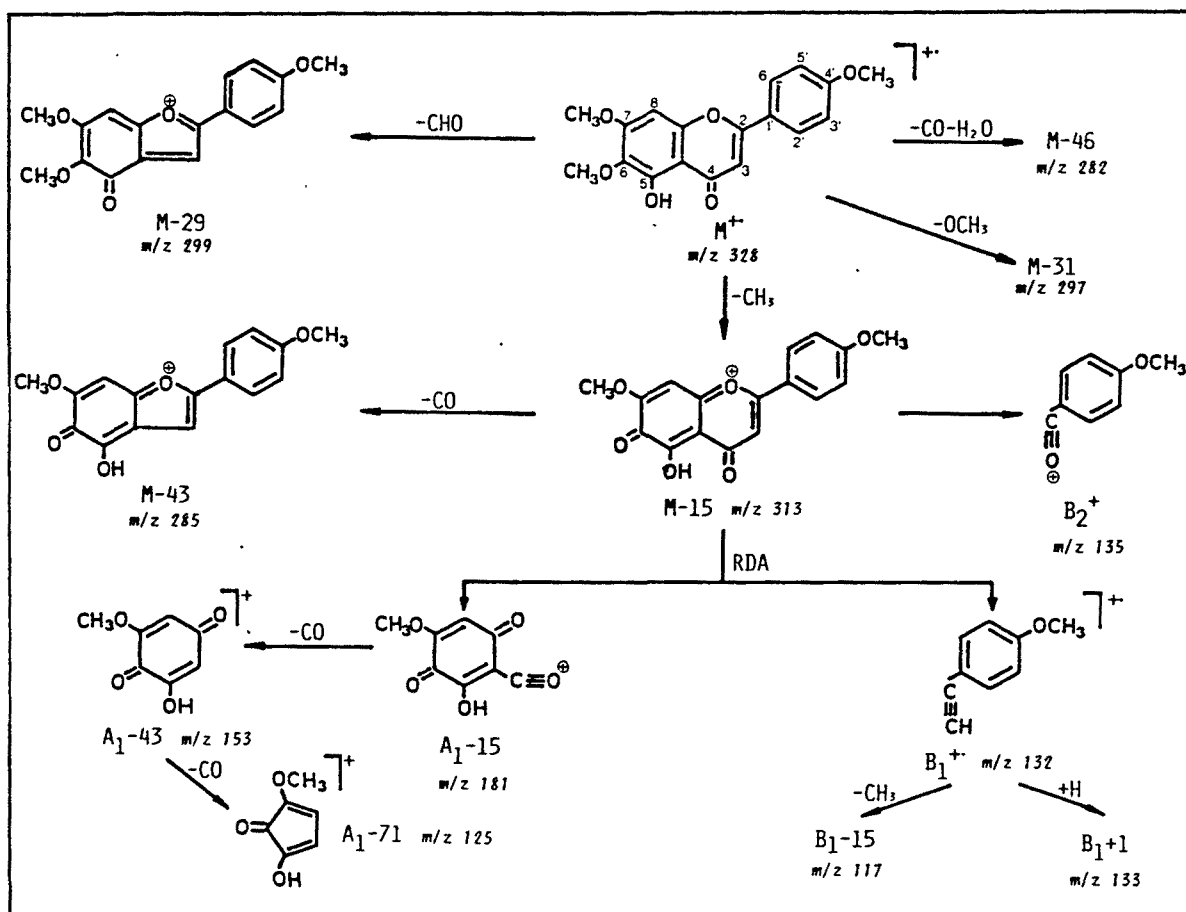
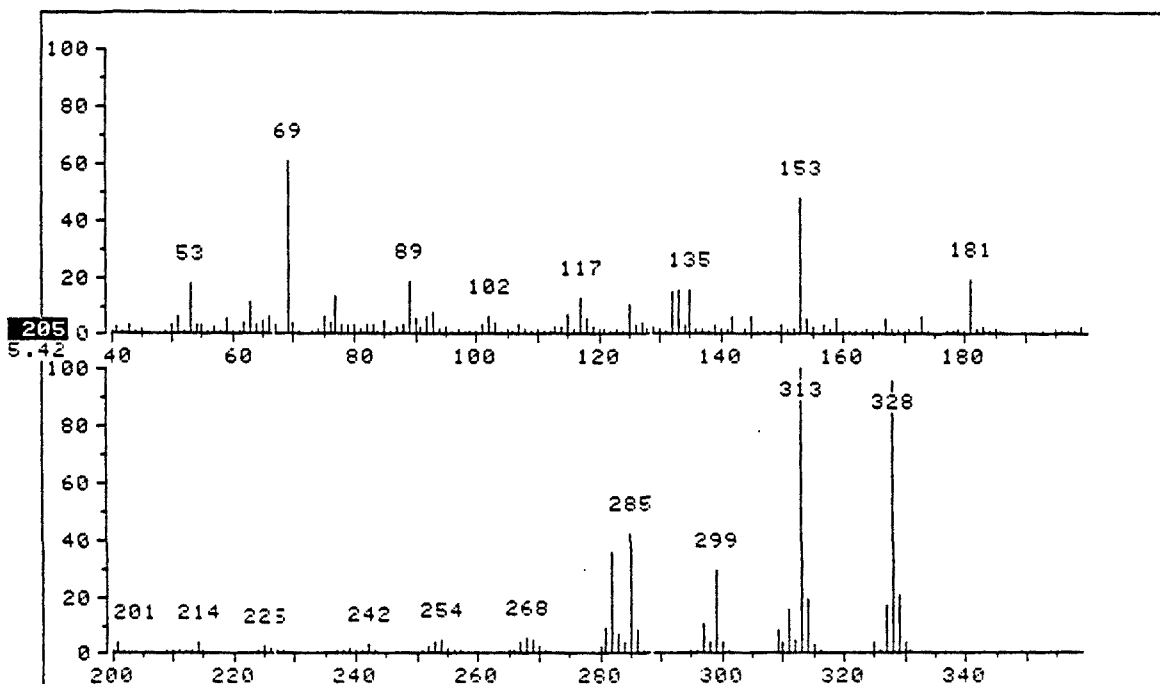


FIGURA V-6: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia A.

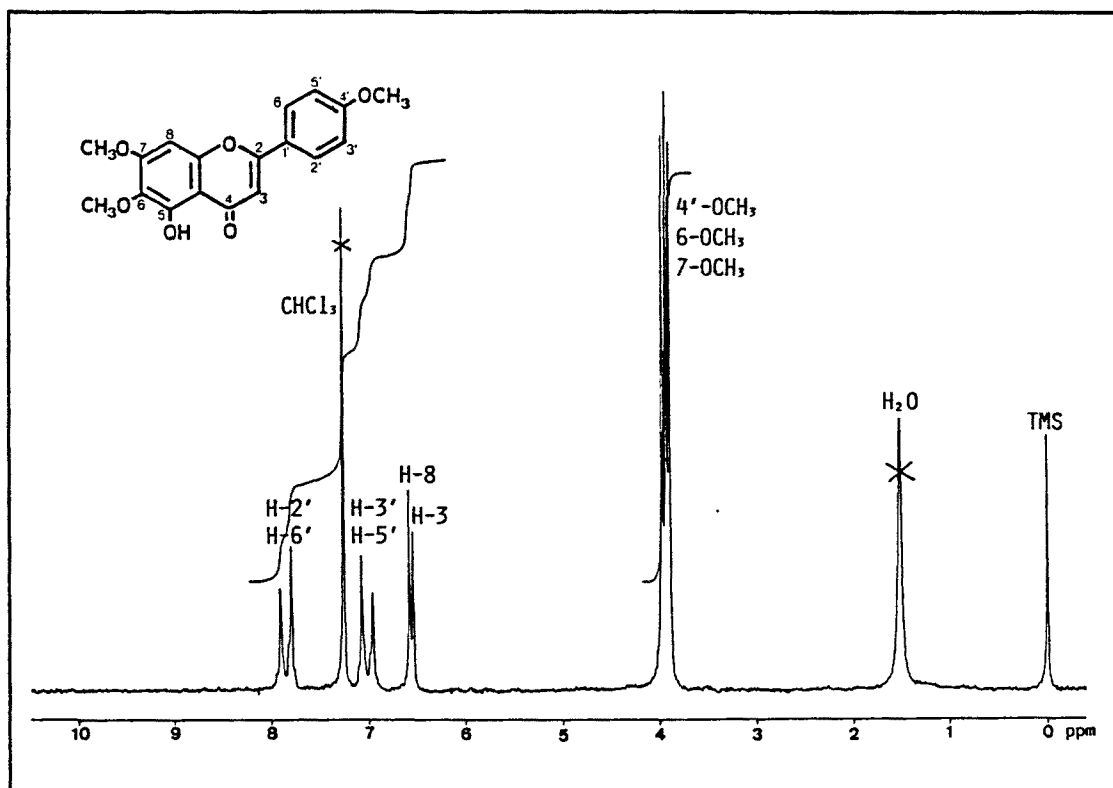


FIGURA V-7: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la sustancia A.

### V.5.3.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA B.

Esta sustancia ha sido aislada a partir del extracto clorofórmico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Punto de fusión (Kofler): 191-194°C. Bibliográfico: 195°C [RODRÍGUEZ et al., 1974], 196-198°C [KUPCHAN et al., 1969].
- Espectroscopía UV-visible: figura V-9.
- Espectrometría de masas: figura V-10 (EI-MS y fraccionamiento) y figura V-8 (CI-MS, NH<sub>3</sub>).
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura V-11.

Dados sus elevados Rf en la mayoría de sistemas cromatográficos y el hecho de que no se revele con ninguno de los reactivos empleados (NH<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, NEU), debe ser una flavona metoxilada.

La espectroscopía UV-visible revela una estructura de 5-OH-flavona 6-substituida ( $\Delta\lambda_I$  en AlCl<sub>3</sub>+HCl respecto al MeOH de 23 nm y banda I no desdoblada en AlCl<sub>3</sub>+HCl) con una agrupación o-hidroxilo-metoxilo en el anillo B ( $\Delta\lambda_I$  en AlCl<sub>3</sub>+HCl respecto a AlCl<sub>3</sub> de -9 nm).

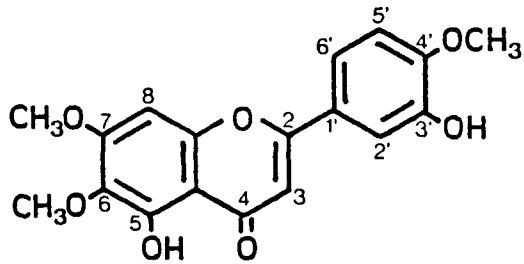
El peso molecular de 344 (M<sup>+</sup> en EI-MS y (M+H)<sup>+</sup> a m/z = 345 en CI-MS) corresponde a una fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, es decir una dihidroxitrimetoxiflavona. Los fragmentos B<sub>1</sub><sup>+</sup> (m/z = 148) y derivados (m/z = 149, 133 y 134) y B<sub>2</sub><sup>+</sup> (m/z = 151) indican un anillo B monohidroxilado y monometoxilado. Por los datos <sup>1</sup>H-NMR (protones del anillo B) y UV-visible (4'-OH substituido, ya que no se observa un desplazamiento superior a 40 nm de la banda I en NaOMe respecto al MeOH) permiten situar el hidroxilo en la posición 3' y el metoxilo en la 4'.

La elevada intensidad de los fragmentos a M-15 (m/z = 329) tanto en EI-MS como en CI-MS es característica de la presencia de un -OMe en la posición 8 y/o 6, que por los datos UV-visible podemos situar en 6. El anillo A debe contener, además, un hidroxilo (el de la posición 5) y un metoxilo, que ocupa la posición 7, ya que el espectro UV-visible no indica substitución en 8.

La estructura propuesta queda confirmada por la coincidencia de los puntos de fusión de la sustancia B y la eupatorina, así como por los datos espectrales de <sup>1</sup>H-NMR.



La substancia B es, pues, la eupatorina o 5,3'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,4'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona.



Substancia B:  
5,3'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,4'-(OMe)<sub>3</sub>-  
flavona (eupatorina).

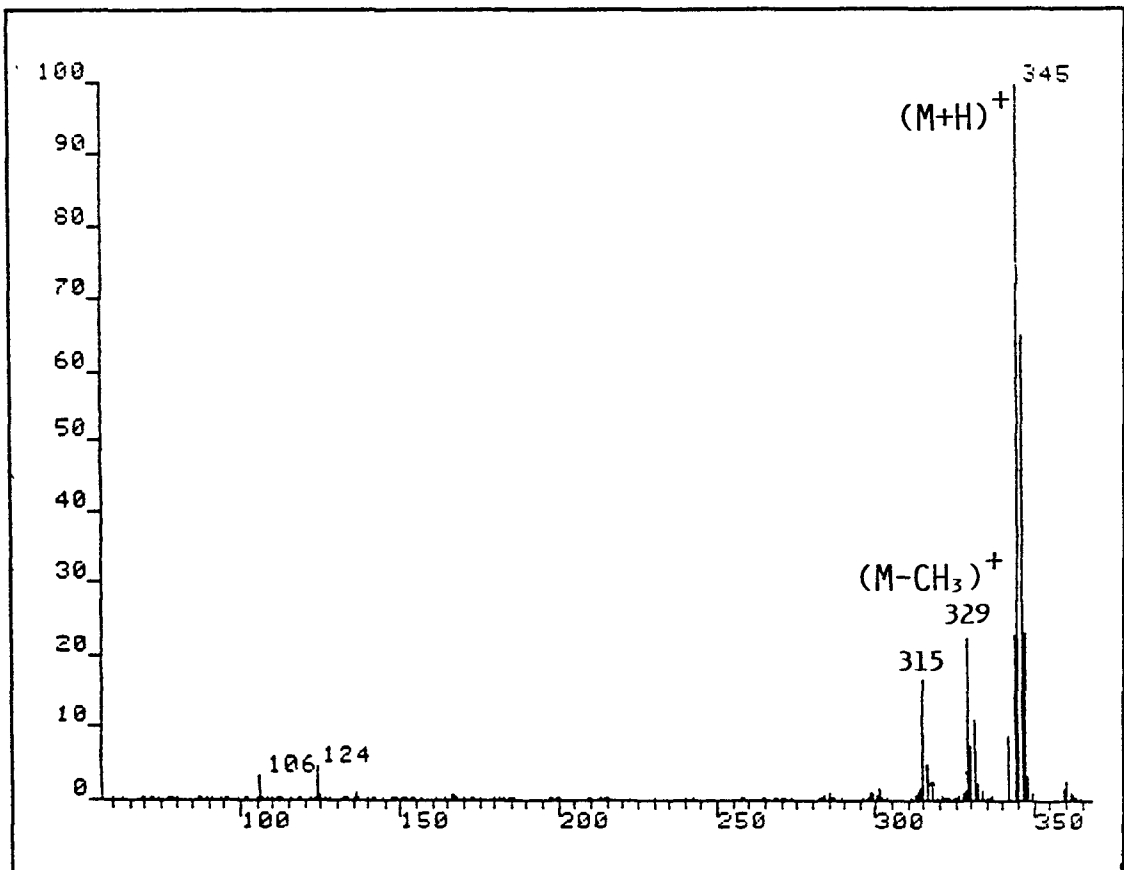
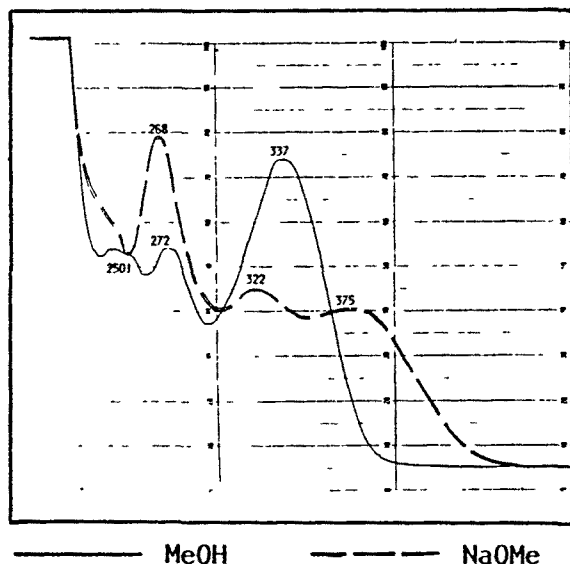
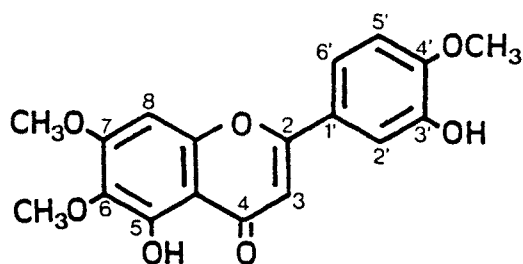
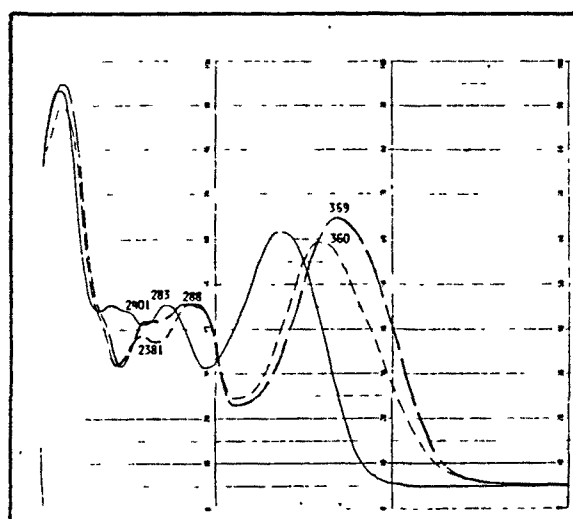


FIGURA V-8: Espectro CI-MS (NH<sub>3</sub>) de la substancia B.

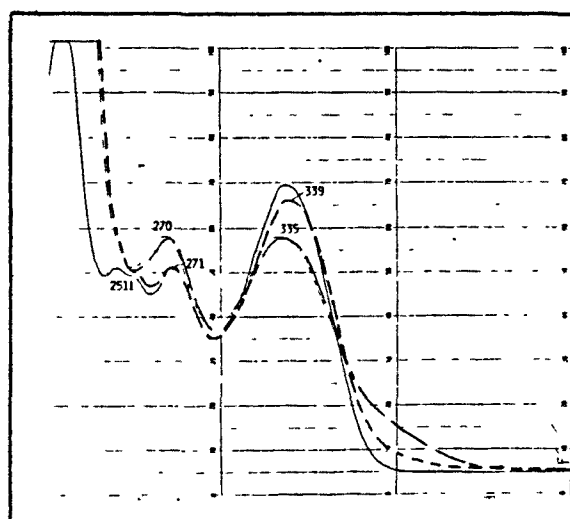
FIGURA V-9: Espectros UV-visible de la sustancia B.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	250i	272	337
NaOMe:	268	322	375
AlCl <sub>3</sub> :	240i	283	369
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	238i	288	360
NaOAc:	270	335	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	251i	271	339

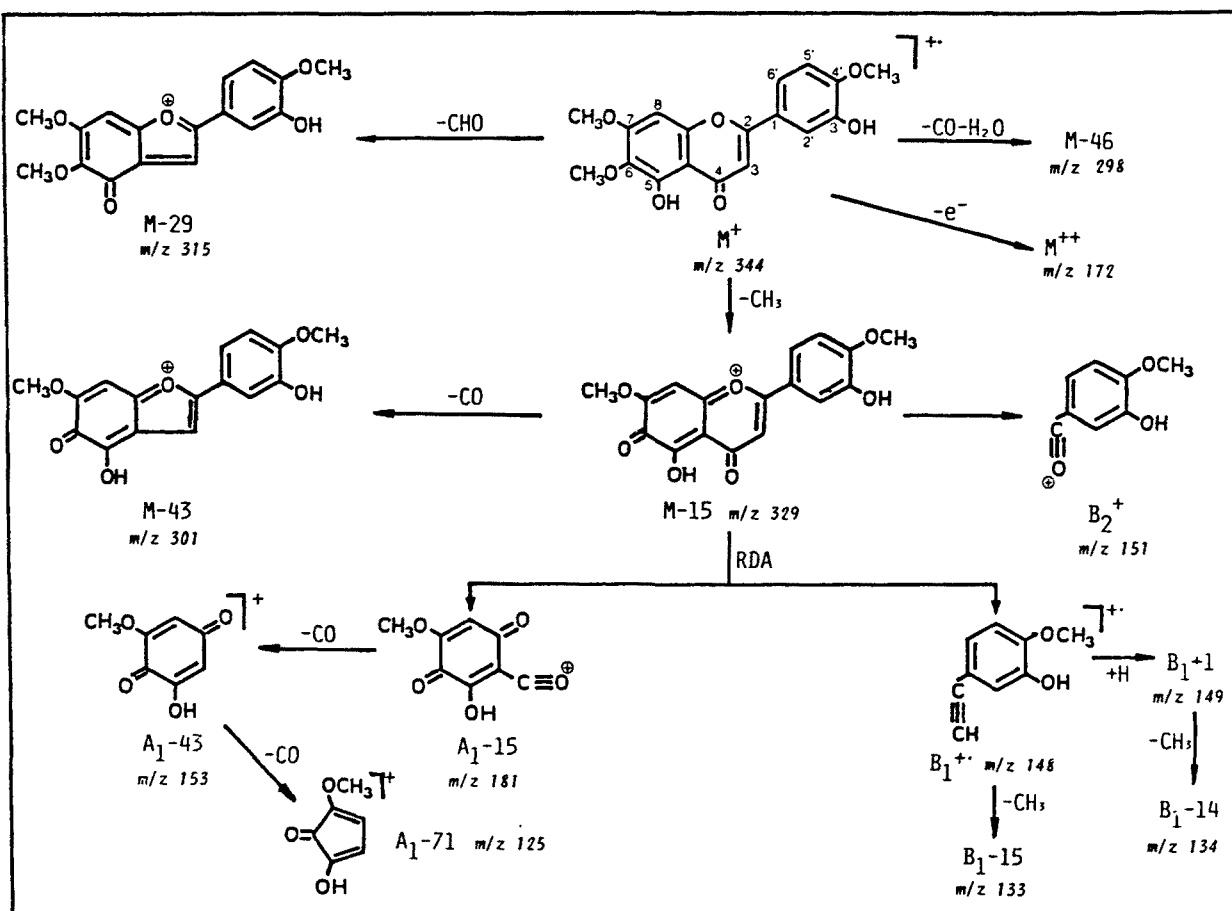
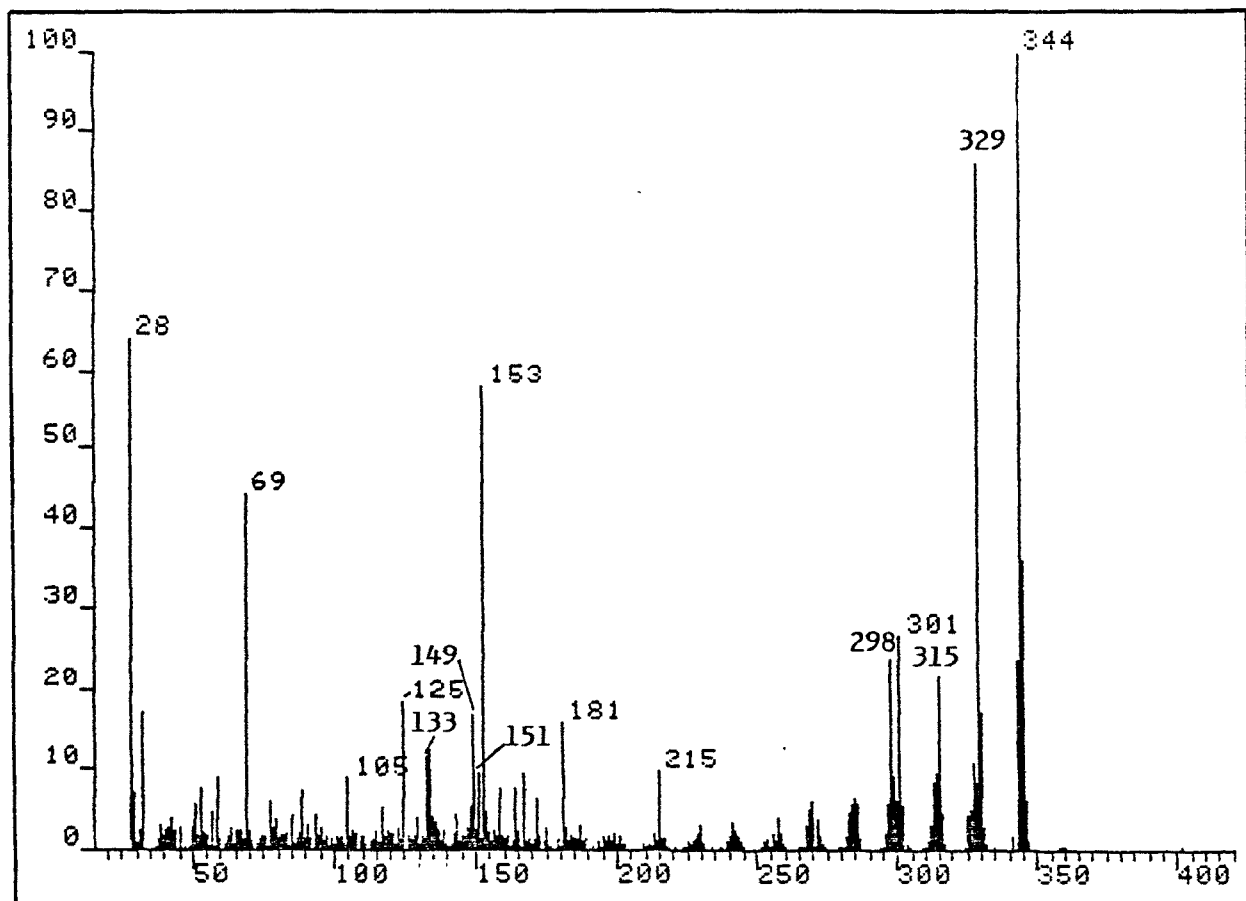


FIGURA V-10: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia B.

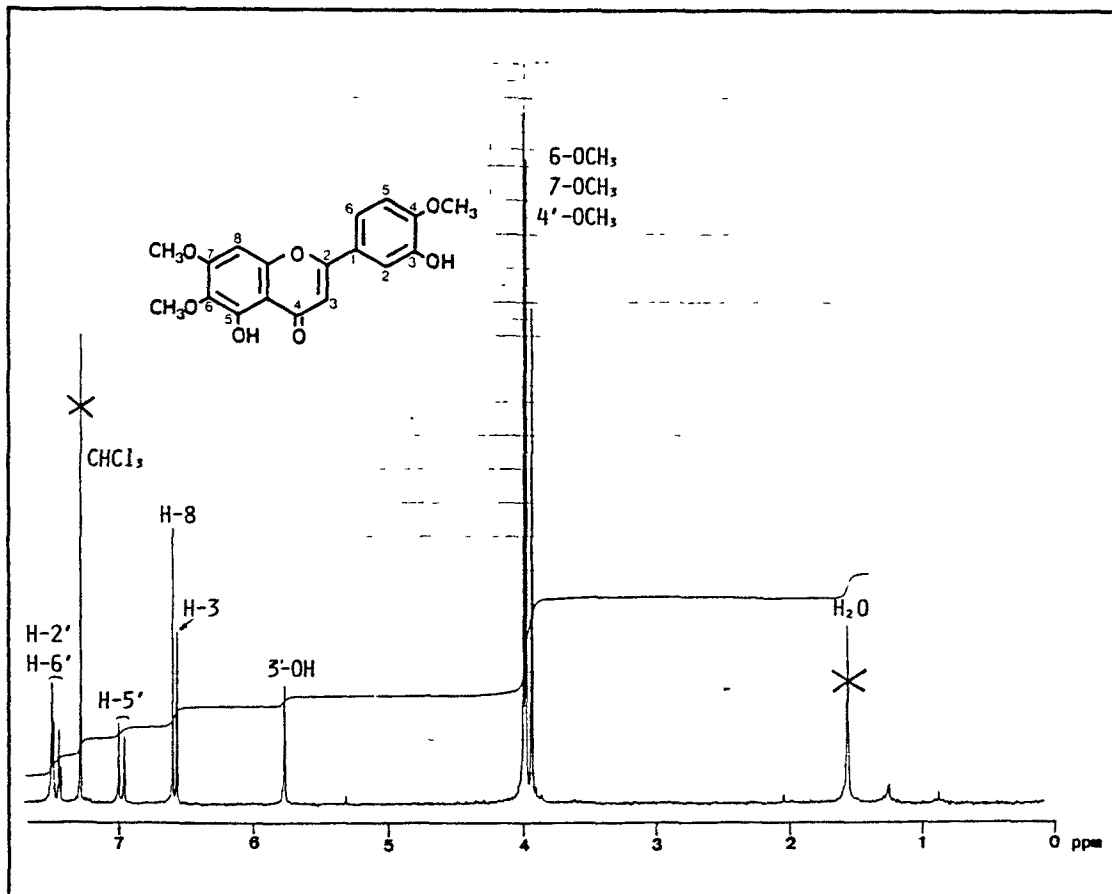


FIGURA V-11: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la sustancia B.

#### V.5.4.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA C.

La sustancia C ha sido aislada del extracto clorofórmico.

Datos analíticos:

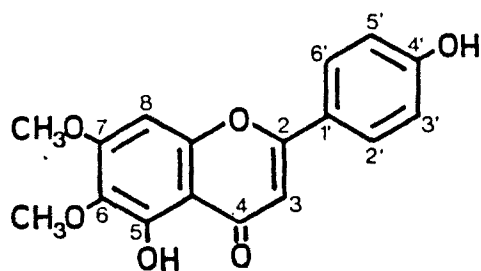
- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Punto de fusión (Kofler): 254-256°C. Bibliográfico: 255-257°C [BRIESKORN & BIECHELE, 1969].
- Espectroscopía UV-visible: figura V-13.
- Espectrometría de masas: figura V-14 (EI-MS) y figura V-12 (CI-MS, NH<sub>3</sub>).
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura V-15.

La sustancia C tiene un comportamiento de flavona metoxilada relativamente apolar, y el espectro UV-visible correspondiente a una 5-OH flavona 6 substituida ( $\Delta\lambda_I$  en AlCl<sub>3</sub>+HCl respecto al MeOH de 22 nm y banda I no desdoblada en AlCl<sub>3</sub>+HCl), monosubstituida en el anillo B (una sola banda entre 250 y 275 nm en el espectro metanólico) por un hidroxilo libre en 4' ( $\Delta\lambda_I$  en NaOMe respecto al MeOH de 50 nm) y con un 7-OR (ausencia de  $\Delta\lambda_{II}$  en NaOAc respecto al MeOH y  $\Delta\lambda_I$  en NaOAc/MeOH >  $\Delta\lambda_I$  en NaOMe/MeOH).

Su fórmula molecular, C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, correspondiente a un peso molecular de 314 (M<sup>+</sup> en EI-MS, y (M+H)<sup>+</sup> a m/z = 315 en CI-MS) es la de una dihidroxidimetoxiflavona. El anillo B contiene únicamente un hidroxilo libre en 4' (B<sub>1</sub><sup>+</sup>; (B<sub>1</sub>+H)<sup>+</sup>, B<sub>2</sub><sup>+</sup> y (B<sub>2</sub>-CO)<sup>+</sup> a m/z = 118, 119, 121 y 93 respectivamente) y por tanto el anillo A debe contener un hidroxilo (el de la posición 5) y dos metoxilos. Dada la intensidad de M-15 (m/z = 299) en el espectro EI-MS, podemos situar uno de los metoxilos en la posición 6. El segundo metoxilo del anillo A es el que substituye la posición 7.

El espectro <sup>1</sup>H-NMR corrobora la deducción: los protones del anillo B dan un sistema simétrico típico de benceno p-disubstituido y se observan, también, los protones de las posiciones 3 y 8 y dos señales metoxílicas a 3,75 y 3,92 ppm, correspondientes a los de las posiciones 6 y 7.

El punto de fusión de la sustancia C es, también, similar al de la cirsimaritina, por lo que se concluye que dicha sustancia es la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7-(OMe)<sub>2</sub>-flavona (cirsimaritina o escrofuleína).



Substancia C: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7-(OMe)<sub>2</sub>-flavona  
(cirsimaritina o escrofulina).

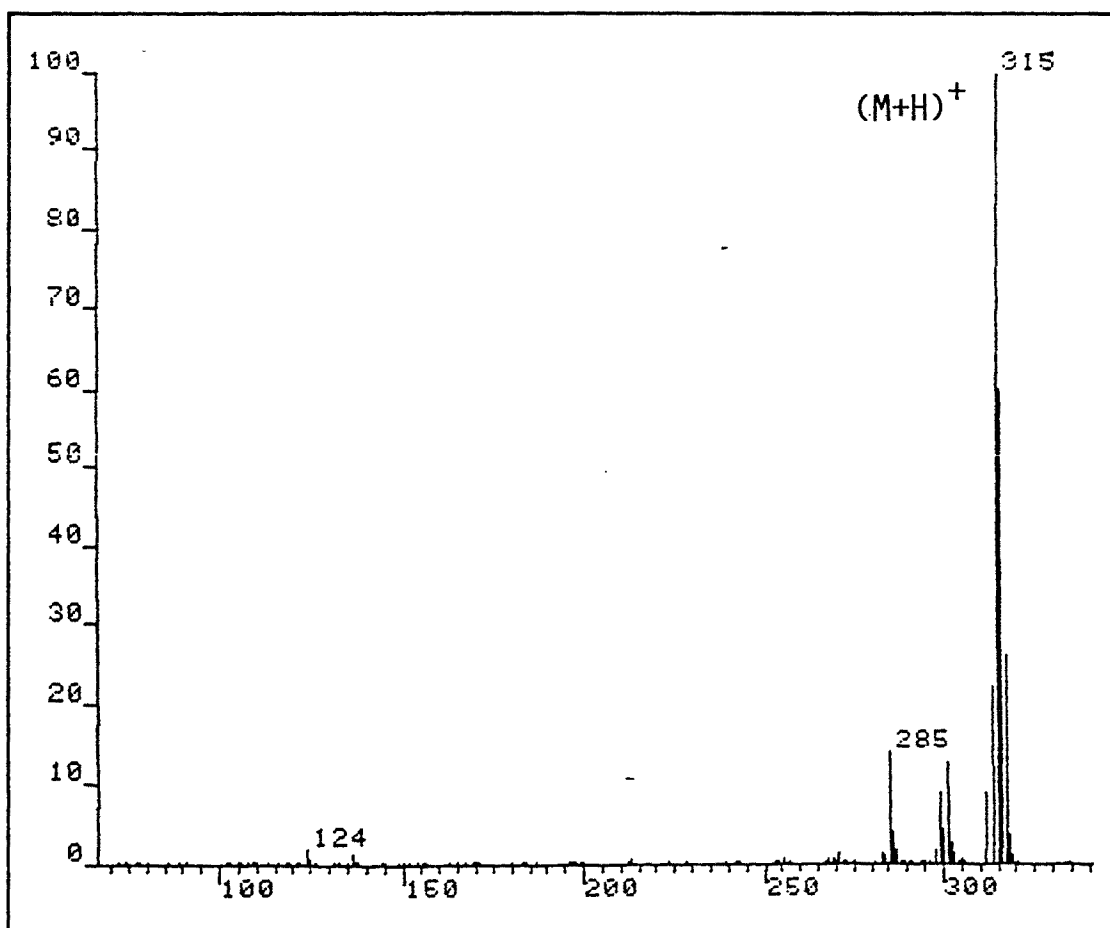
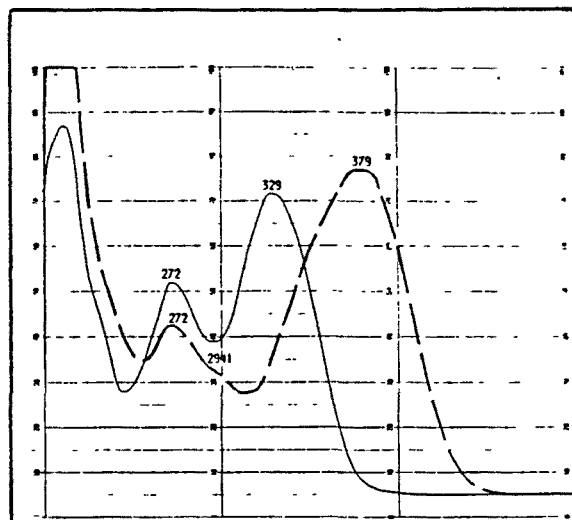
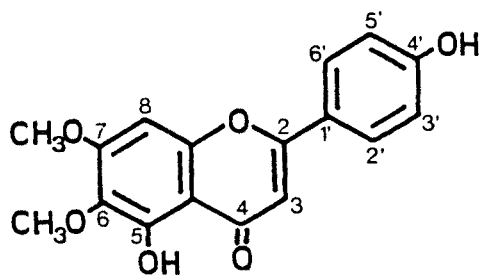
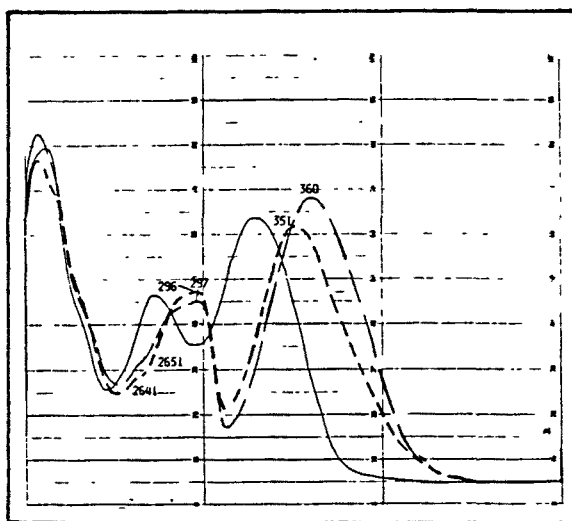


FIGURA V-12: Espectro CI-MS (NH<sub>3</sub>) de la substancia C.

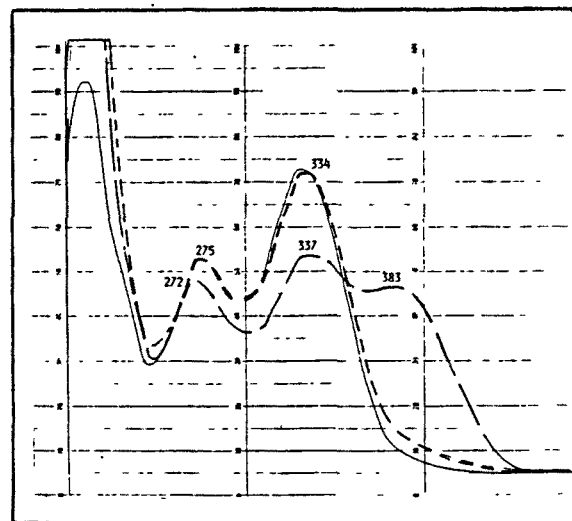
FIGURA V-13: Espectros UV-visible de la sustancia C.



————— MeOH      - - - - - NaOMe



————— MeOH      - - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- · - · - AlCl<sub>3</sub> + HCl



————— MeOH      - - - - - NaOAc  
- · - · - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	272	329
NaOMe:	272	294i 379
AlCl <sub>3</sub> :	265i	297 360
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	264i	296 351
NaOAc:	272	337 383
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	272	334

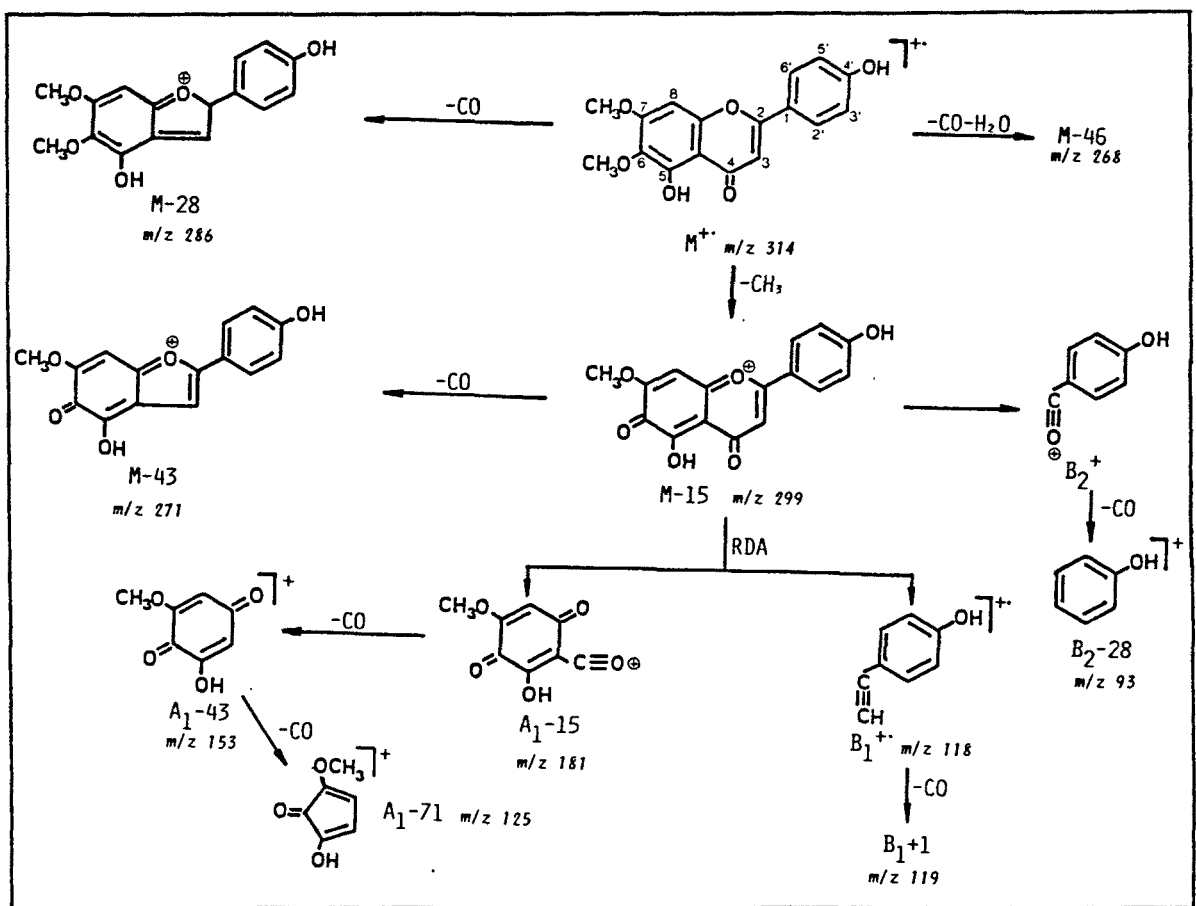
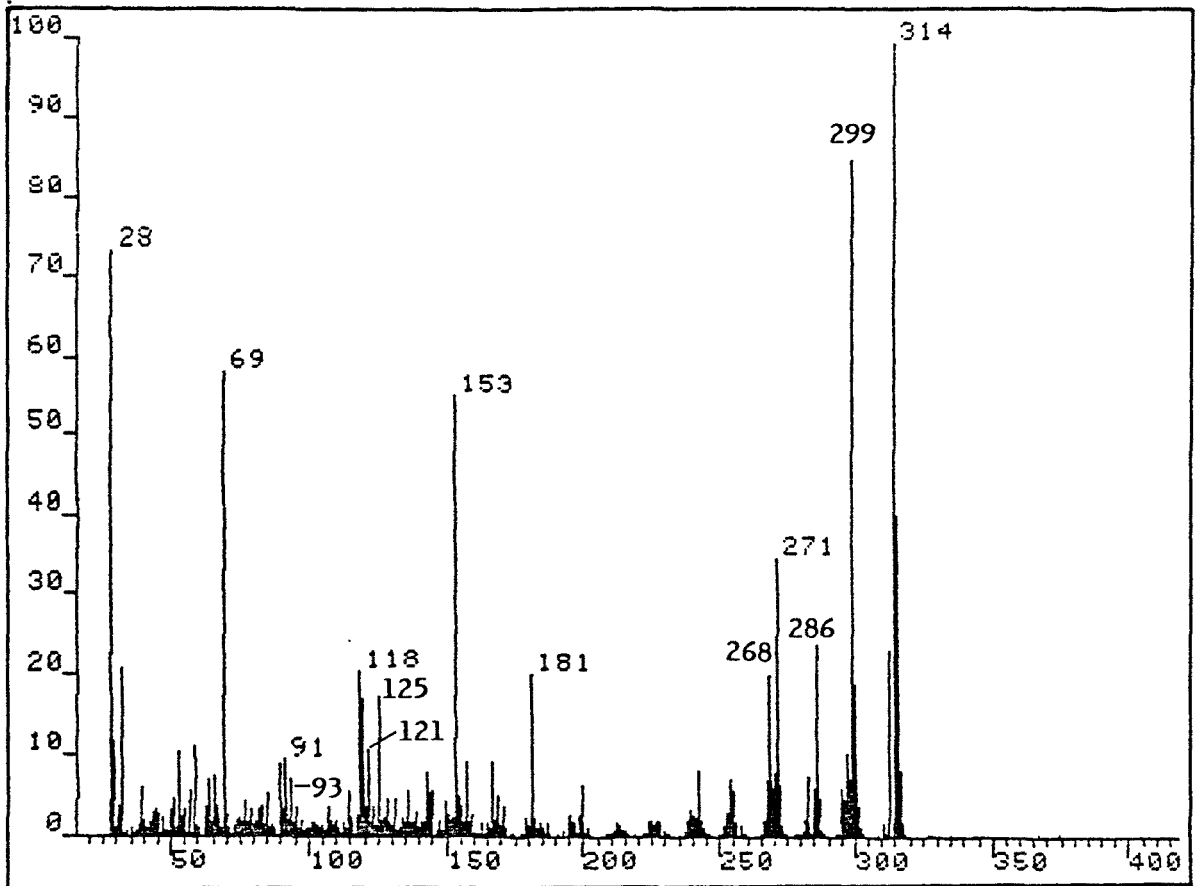


FIGURA V-14: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia C.



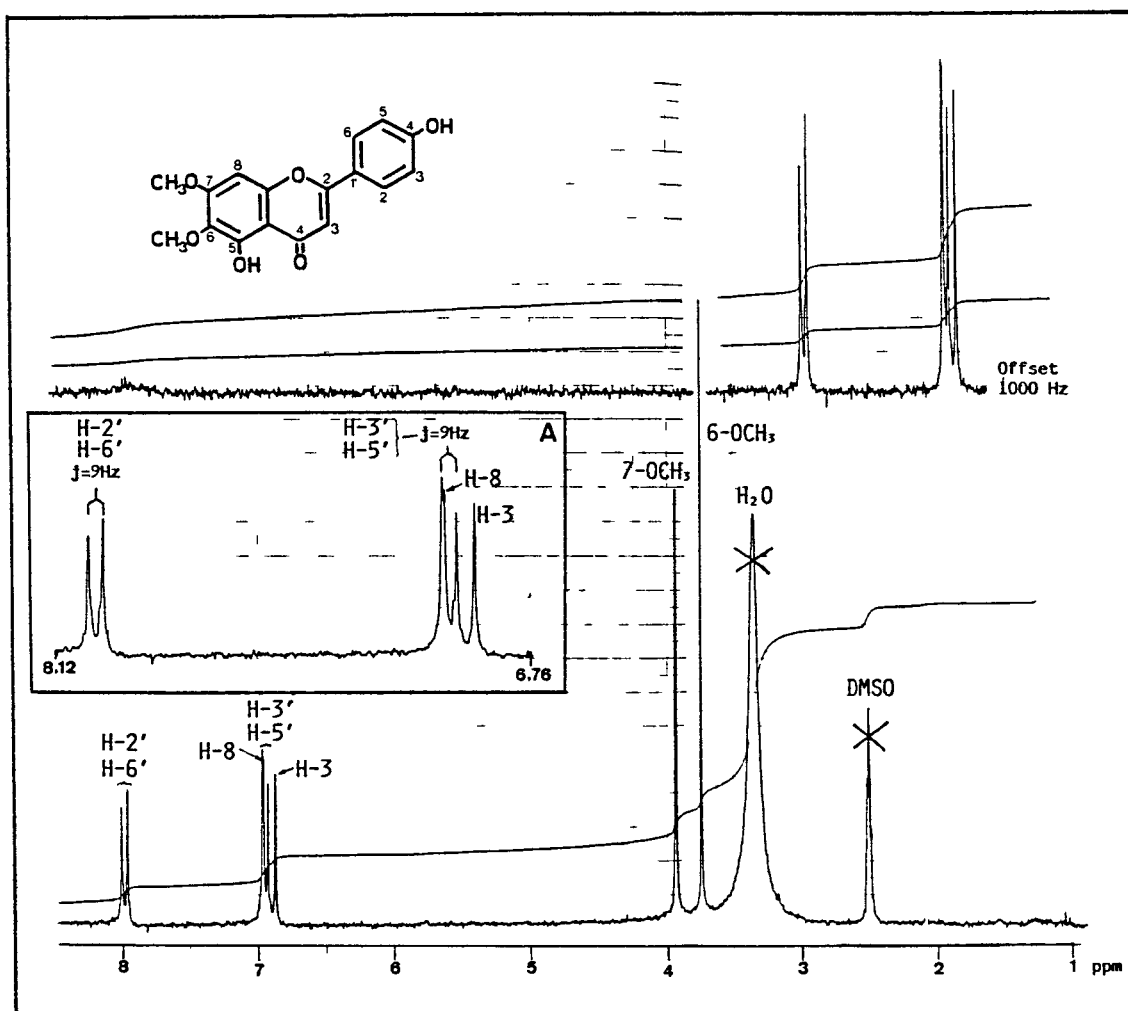


FIGURA V-15: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la sustancia C.  
A: Ampliación de la zona entre 6,76 y 8,12 ppm.

### V.5.5.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA D.

La sustancia D ha sido aislada del extracto clorofórmico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-16.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura V-17.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-18.

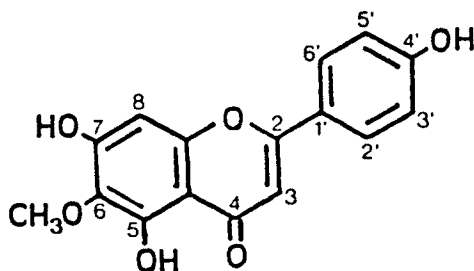
El comportamiento cromatográfico de esta sustancia es el de una flavona metoxilada, no muy apolar.

Sus espectros UV-visible nos indican que se trata de una 5-OH-flavona substituida en la posición 6 (banda I no desdoblada en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  y  $\Delta\lambda_{\text{I}}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  respecto al MeOH de 18 nm) monosubstituida en el anillo B (un solo máximo entre 250 y 275 nm en el espectro metanólico) por un hidroxilo libre en la posición 4' ( $\Delta\lambda_{\text{I}}$  en NaOMe respecto al MeOH de 55 nm, y sistema de señales simétrico, característico de bencenos p-disubstituidos, provocado por los protones del anillo B en  $^1\text{H-NMR}$ ).

La sustancia D tiene un peso molecular de 300 ( $\text{M}^+$  en EI-MS), con una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ , correspondiente a una trihidroximetoxi-flavona. Los fragmentos  $\text{B}_1$  y  $\text{B}_2$  a 118 y 121 respectivamente corroboran que sólo un hidroxilo se encuentra en el anillo B. El espectro EI-MS muestra, además, un M-15 importante, lo que permite situar el único metoxilo de la molécula en la posición 6. El anillo A contiene dos hidroxilos más, dados los valores de m/z a 167, 139 y 111 para  $\text{A}_1-15$ ,  $\text{A}_1-43$  y  $\text{A}_1-77$ , que son los que ocupan las posiciones 5 y 7.

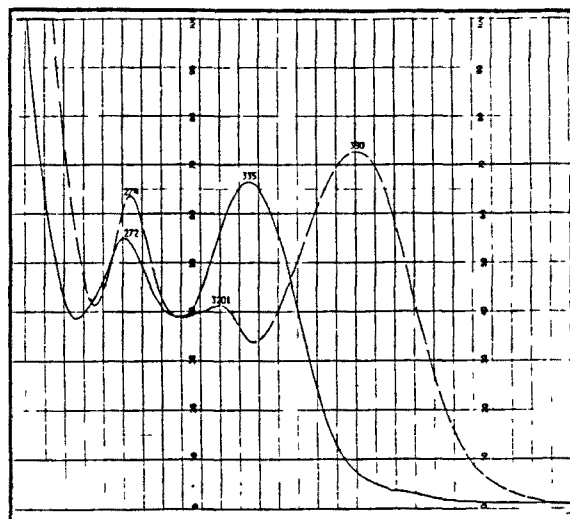
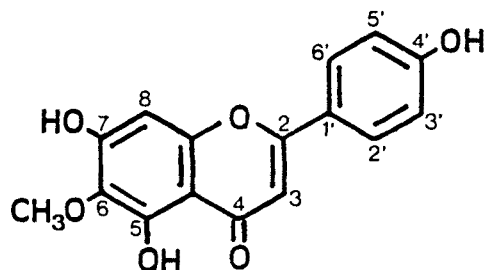
Los protones de las posiciones no substituidas del anillo A (posición 8) y C (posición 3) se aprecian claramente en el  $^1\text{H-NMR}$  en forma de singlete a 6,76 ppm y 6,58 ppm, respectivamente.

La sustancia D resulta ser, pues, la 5,7,4'-(OH) $_3$ -6-OMe-flavona o hispidulina o dinatina.

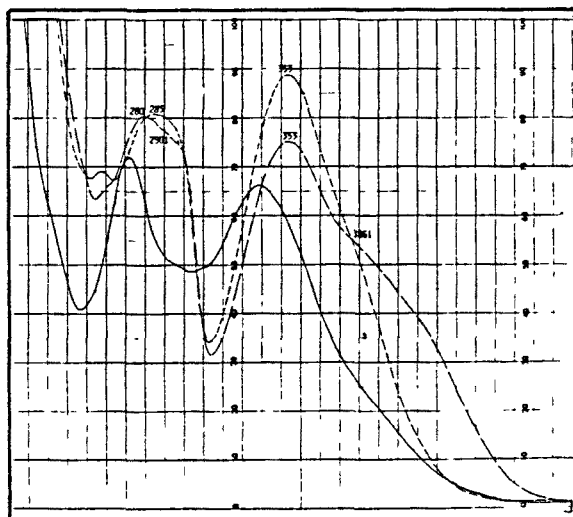


Substancia D: 5,7,4'-(OH) $_3$ -6-OMe-flavona (hispidulina o dinatina).

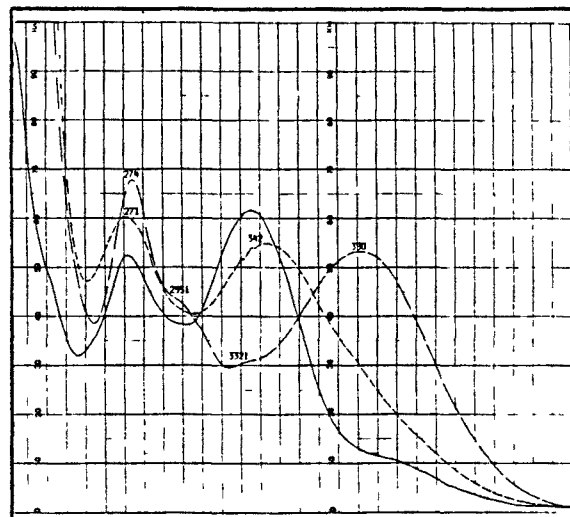
FIGURA V-16: Espectros UV-visible de la substancia D.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
- - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	272	335		
NaOMe:	274	320i	390	
AlCl <sub>3</sub> :	280	290i	353	386
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	285	353		
NaOAc:	274	295i	332i	390
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	271	342		

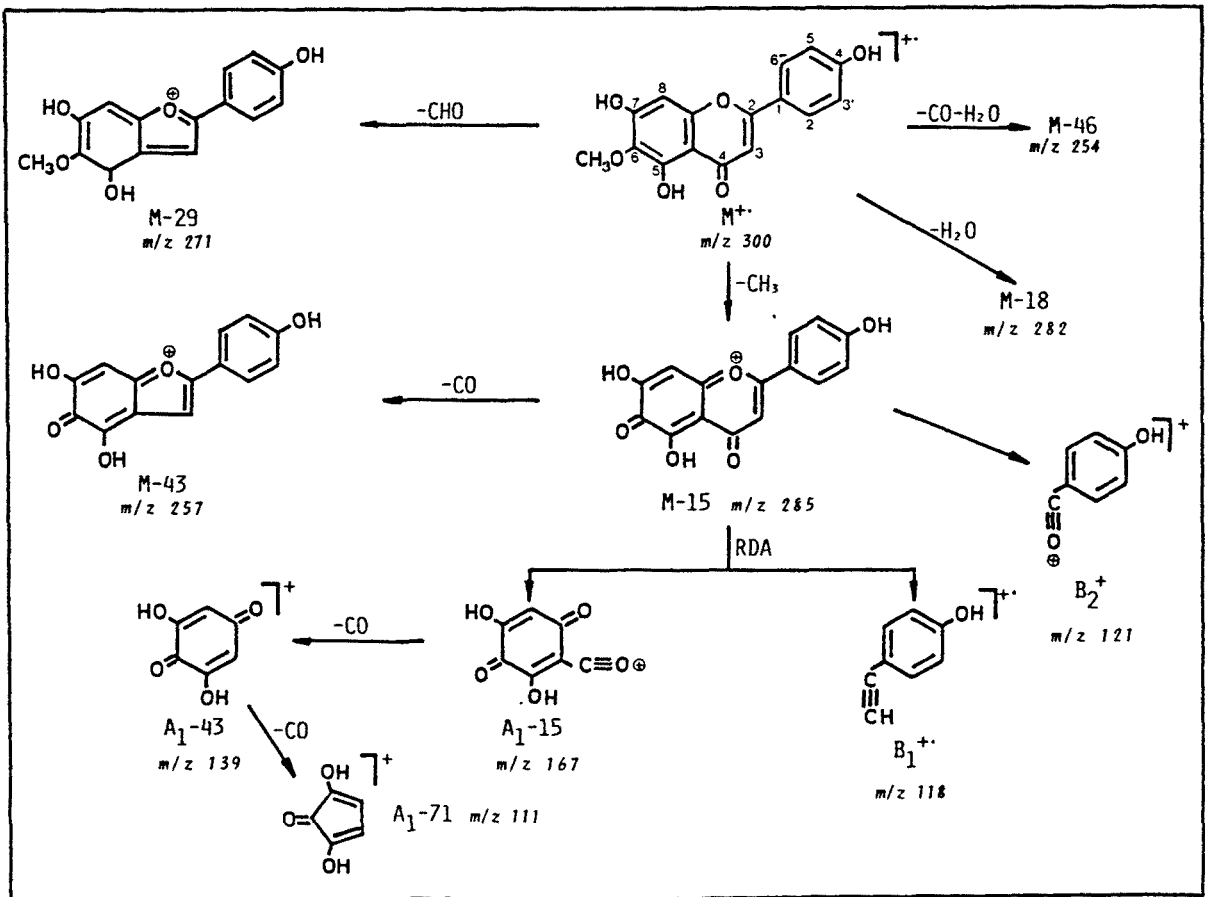
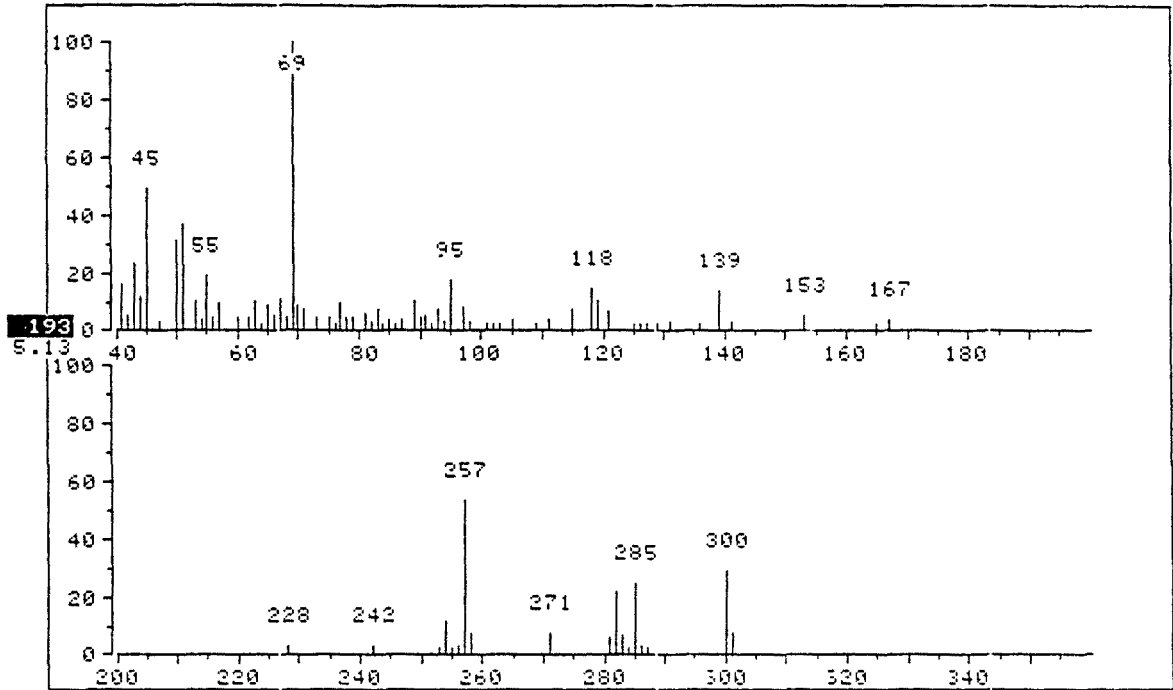


FIGURA V-17: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la substancia D.

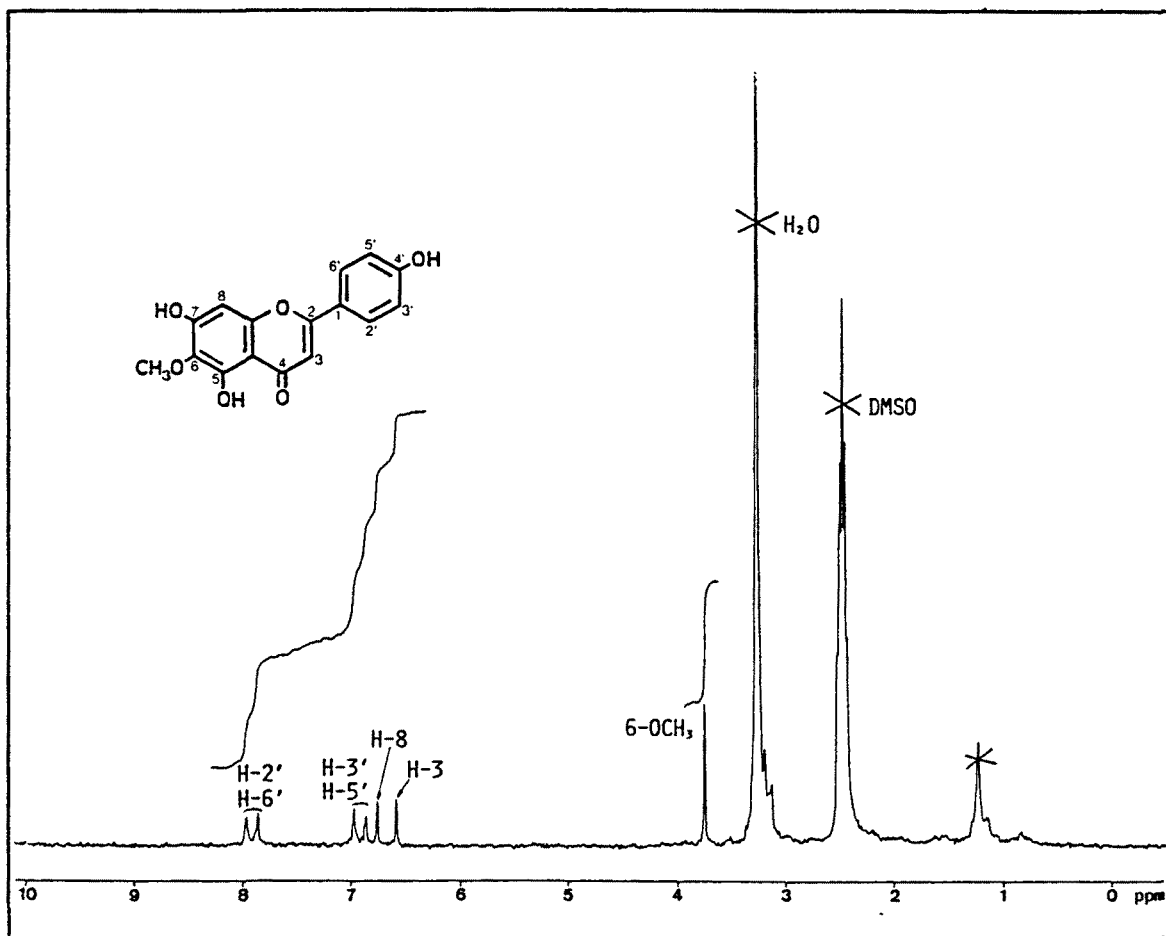


FIGURA V-18: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia D.

### V.5.6.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA E.

La sustancia E ha sido aislada del extracto clorofórmico.

Datos analíticos:

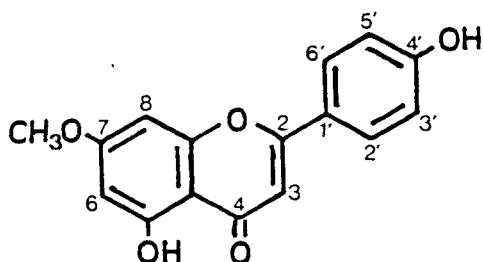
- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-19.
- Espectrometría EI-MS: figura V-20.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-21.

El comportamiento cromatográfico de la sustancia E indica que se trata de una flavona más apolar que la apigenina, en cuanto a movilidad, sin embargo se revela con  $\text{AlCl}_3$ , lo cual augura una ausencia de sustitución en la posición 6.

El análisis por espectroscopía UV-visible muestra una estructura de 5-OH-flavona no substituida en 6 ( $\Delta\lambda_{\text{I}}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  respecto al MeOH de 41 nm y banda I desdoblada en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ ), con un hidroxilo libre en 4' ( $\Delta\lambda_{\text{I}}$  en NaOMe respecto al MeOH de 48 nm) y el hidroxilo de la posición 7 substituido (ausencia de  $\Delta\lambda_{\text{II}}$  batocromo en NaOAc respecto al MeOH y  $\Delta\lambda_{\text{I}}$  en NaOAc respecto a MeOH del mismo orden que con NaOMe).

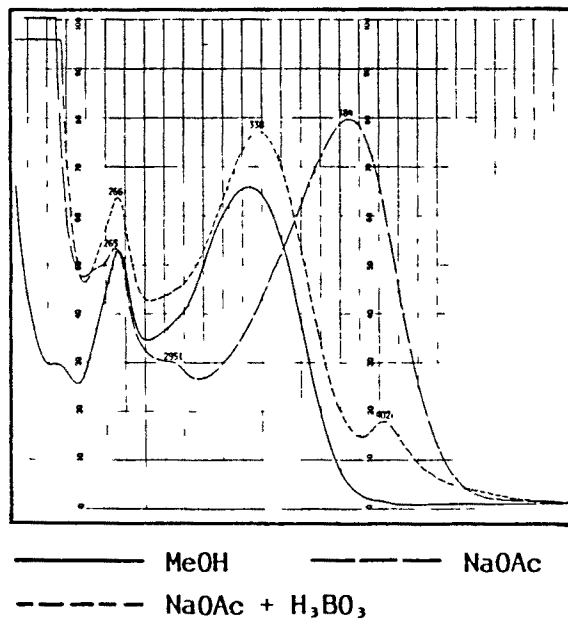
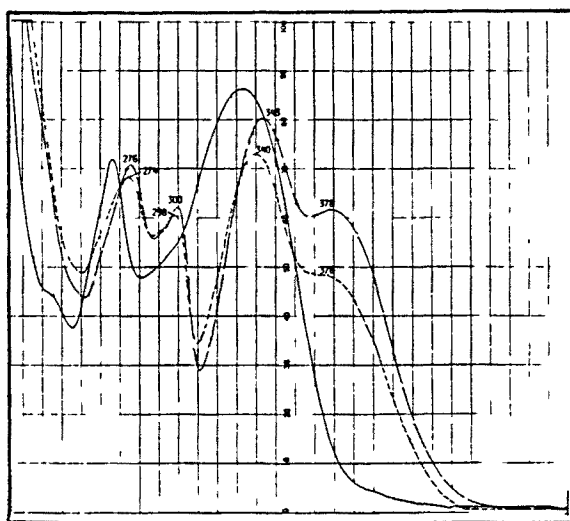
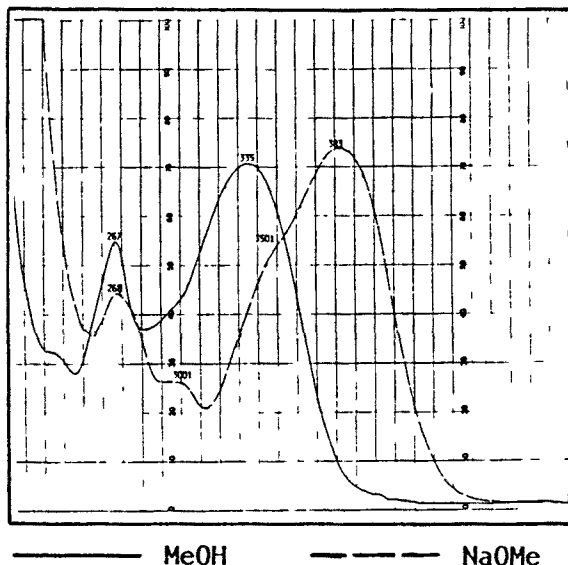
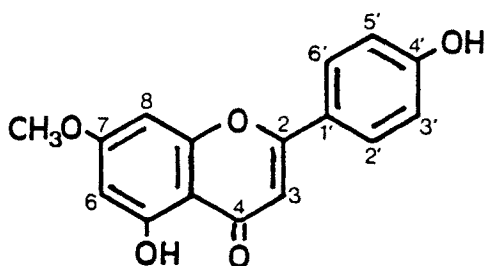
El espectro de masas da un  $\text{M}^+$  a  $m/z = 284$ , correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$  y por tanto una dihidroximetoxiflavona.

Con estos datos, la estructura de la sustancia E queda establecida como la de la genkwanina o 5,4'-(OH) $_2$ -7-OMe-flavona, lo que viene confirmado por la fragmentación por EI-MS y por el análisis por  $^1\text{H-NMR}$ . Éste, muestra un sistema simétrico característico para los protones del anillo B, un doblete integrando 1 H ( $J = 2,5$  Hz) a 6,38 ppm correspondiente al H-6, que acopla con el H-8, el cual aparece como un doblete a 6,56 ppm, con el singulete del H-3 sobrepuesto. Los protones metoxílicos aparecen como singulete a 3,87 ppm.



Substancia E: 5,4'-(OH) $_2$ -7-(OMe)-  
flavona (genkwanina).

FIGURA V-19: Espectros UV-visible de la sustancia E.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	267	335		
NaOMe:	268	300i	350i	383
AlCl <sub>3</sub> :	276	300	343	378
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	274	298	340	376
NaOAc:	265	295i	384	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	266	338	402i	

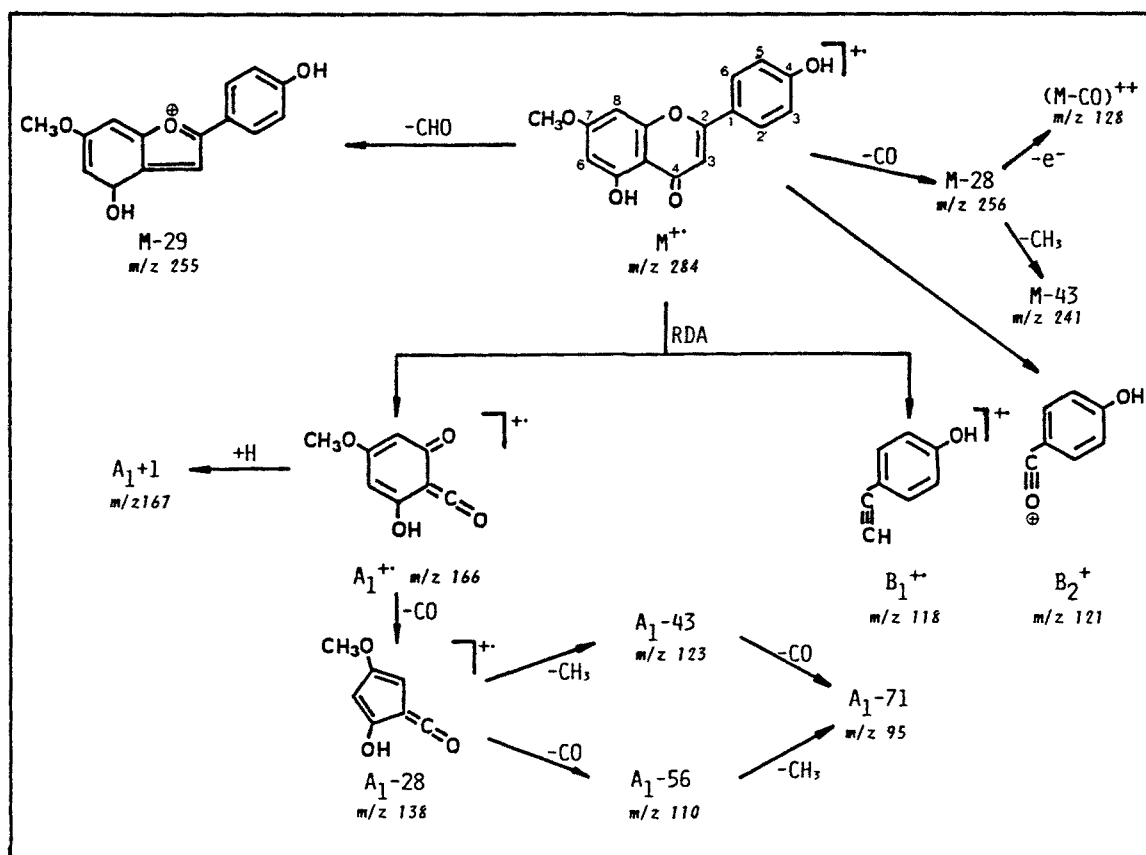
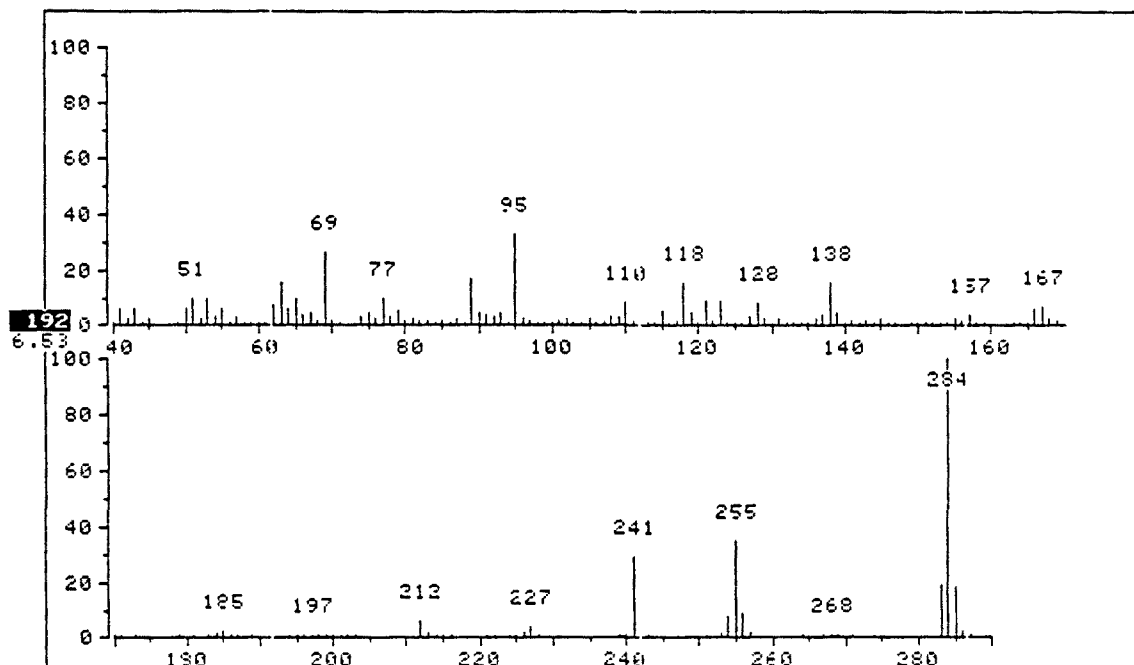


FIGURA V-20: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia E.



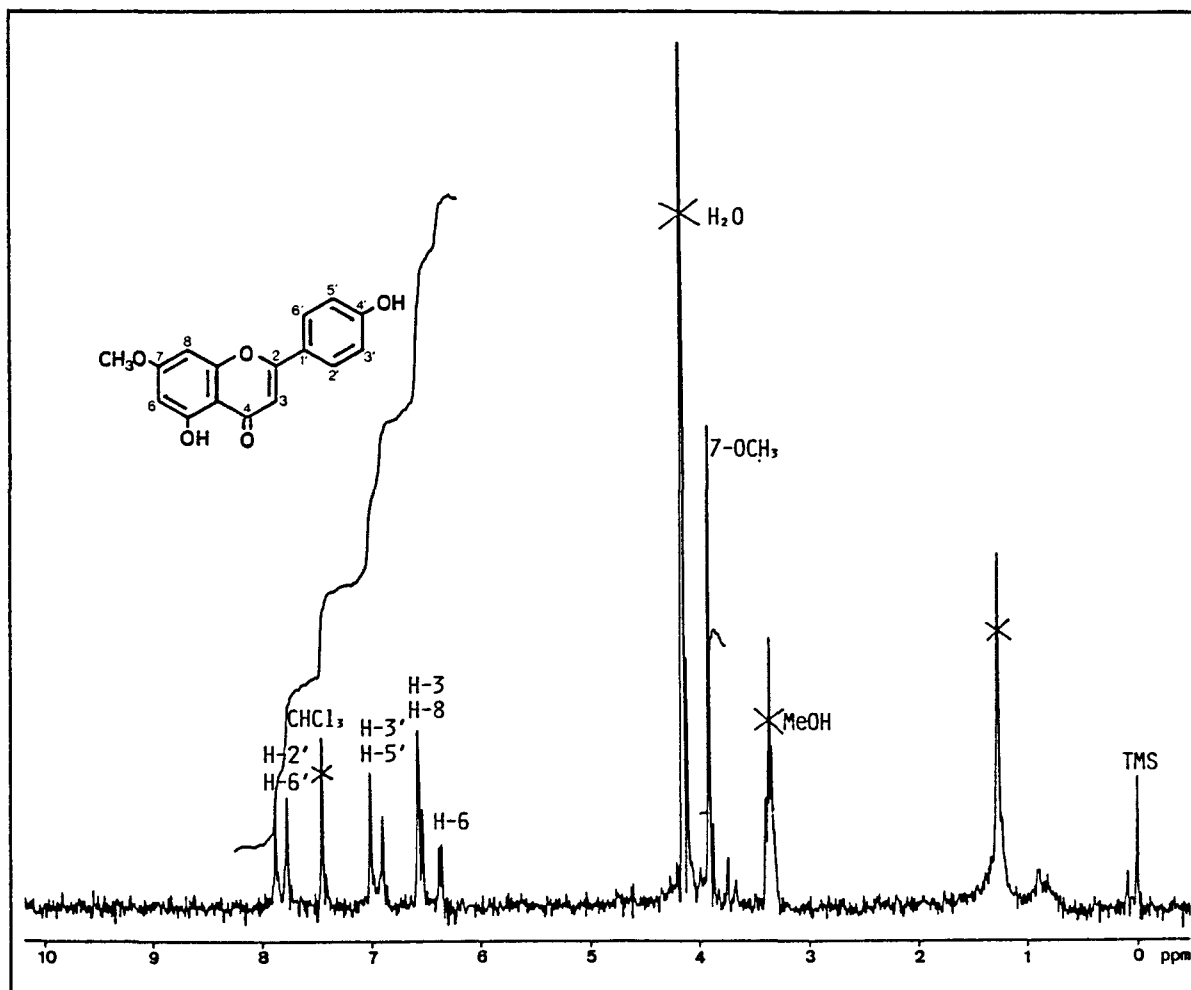


FIGURA V-21: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$  +  $d\text{-MeOH}$ ) de la substancia E.

### V.5.7.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA F.

Esta sustancia ha sido aislada del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-22.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura V-23.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-24.

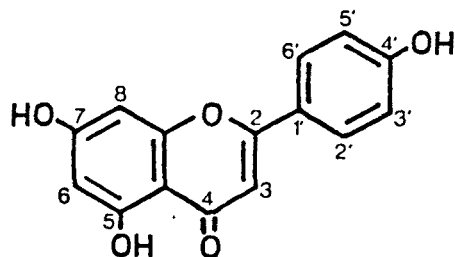
El comportamiento cromatográfico de la sustancia F es idéntico al de la apigenina. Efectivamente, sus espectros UV-visible corresponden a una 5-OH-flavona, con hidroxilos libres en las posiciones 4' y 7, observándose la ausencia de grupos o-dihidroxilos y de sustitución en la posición 6.

El espectro de masas presenta un  $\text{M}^{++}$  a  $m/z = 270$ , correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ , característica de las trihidroxiflavonas. La existencia de un solo hidroxilo en el anillo B y dos en el anillo A viene confirmada, respectivamente, por los valores de  $m/z$  de los fragmentos  $\text{B}_1^+$  (118),  $\text{B}_2^+$  (121),  $\text{B}_2-28$  (93) y  $\text{A}_1^+$  (152),  $\text{A}_1+1$  (153),  $\text{A}_1-28$  (124) y  $\text{A}_1-56$  (96).

También, en el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  se aprecia la estructura propuesta:

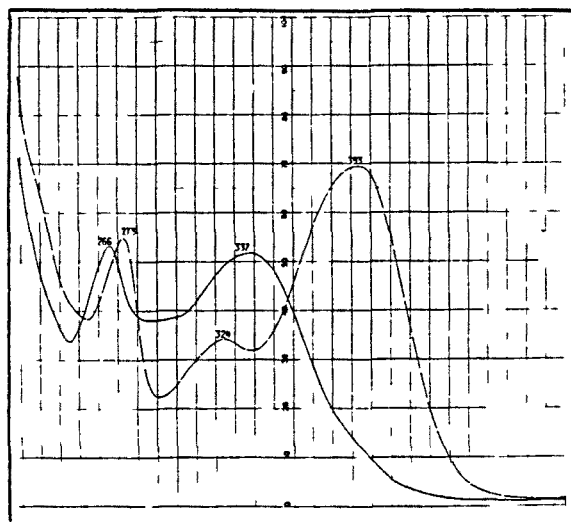
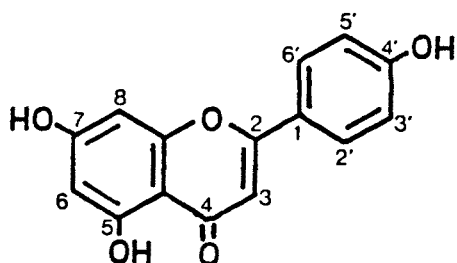
- Ausencia de señales de protones metoxílicos.
- Protones del anillo A en dos dobletes ( $J = 2,5$  Hz) integrando 1 H cada uno, centrados a 6,18 ppm (H-6) y 6,46 ppm (H-8).
- Protones del anillo B en un sistema simétrico formado por dos dobletes ( $J = 9$  Hz), que integran dos protones cada uno, y centrados a 6,91 ppm (H-3' y H-5') y 7,92 ppm (H-2' y H-6').
- El H-3, único protón del anillo C resona como singulete a 6,75 ppm.

La estructura de la sustancia F es, pues, la de la apigenina o 5,7,4'-(OH) $_3$ -flavona.

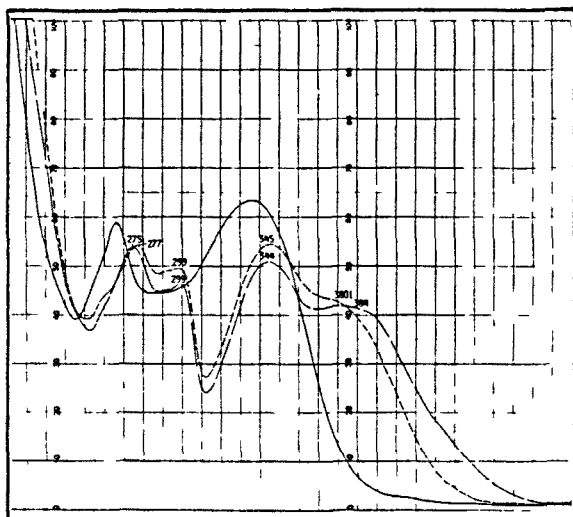


Substancia F: 5,7,4'-(OH) $_3$ -flavona (apigenina).

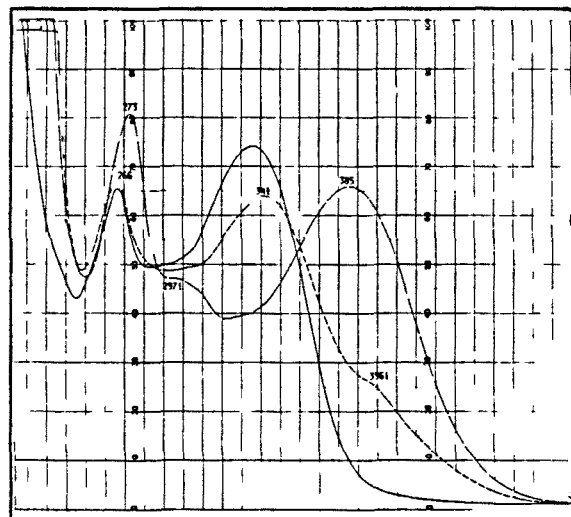
FIGURA V-22: Espectros UV-visible de la sustancia F.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	266	337		
NaOMe:	273	324	393	
AlCl <sub>3</sub> :	275	299	344	384
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	277	299	345	380i
NaOAc:	273	297i	385	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	266	341	396i	

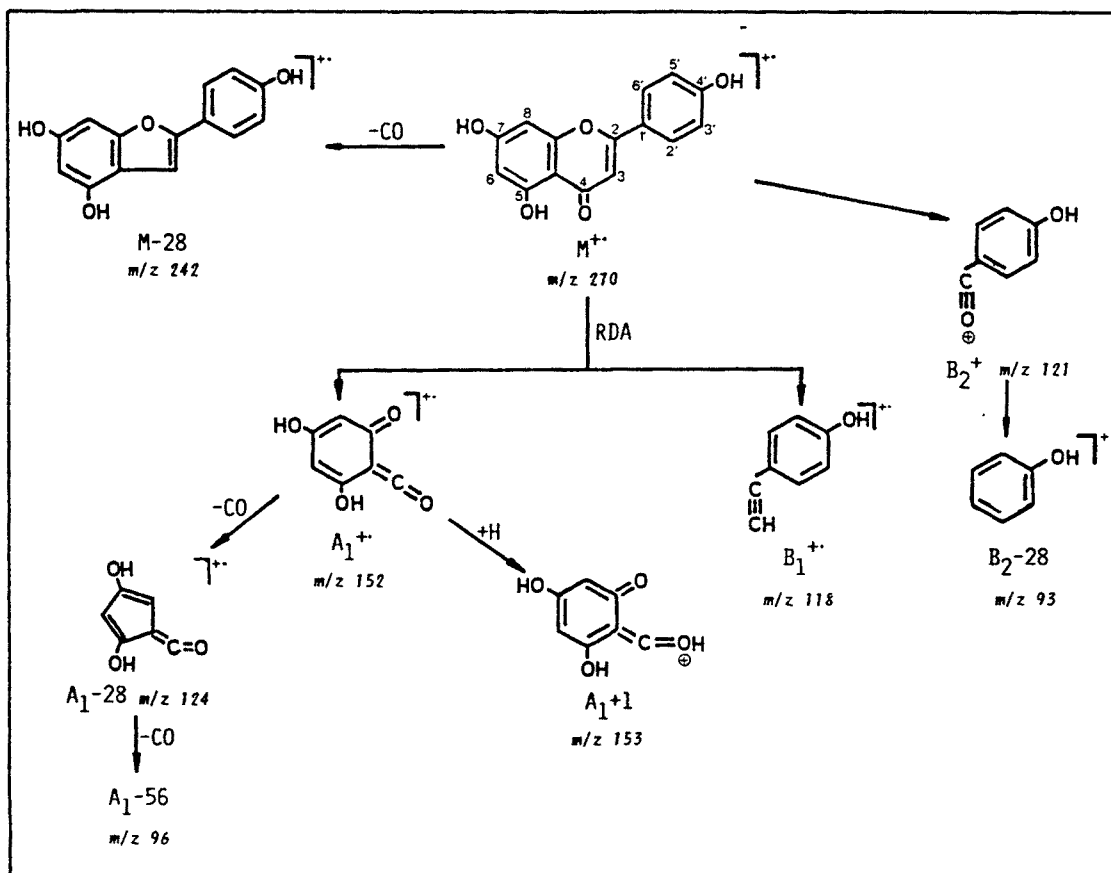
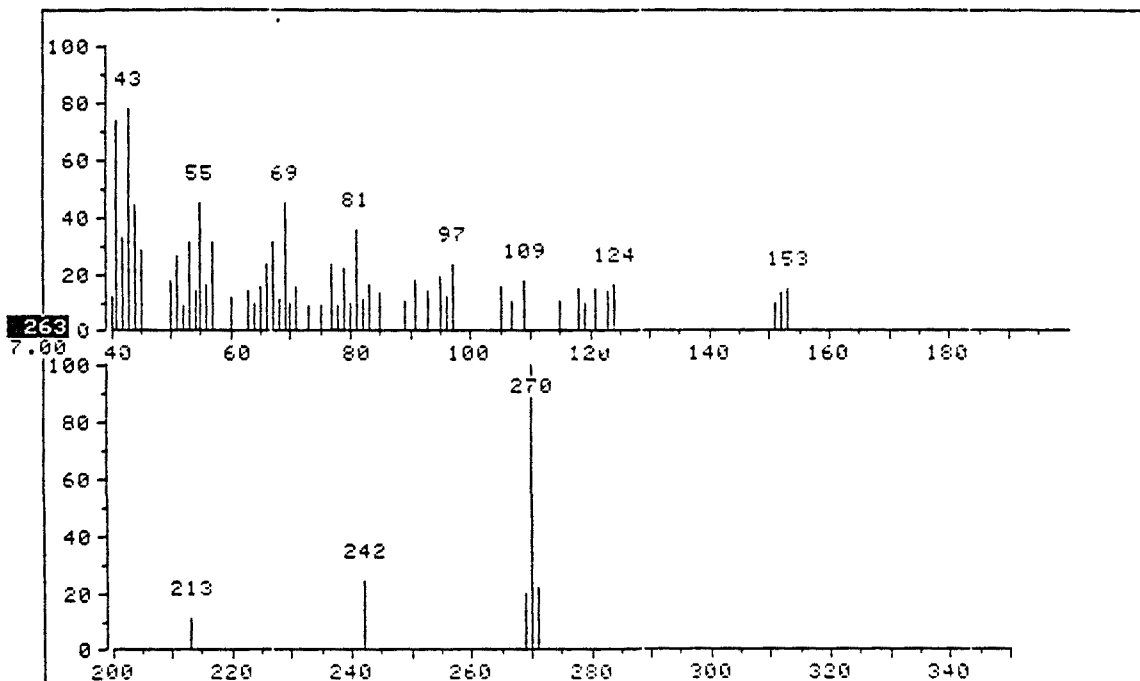


FIGURA V-23: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia F.

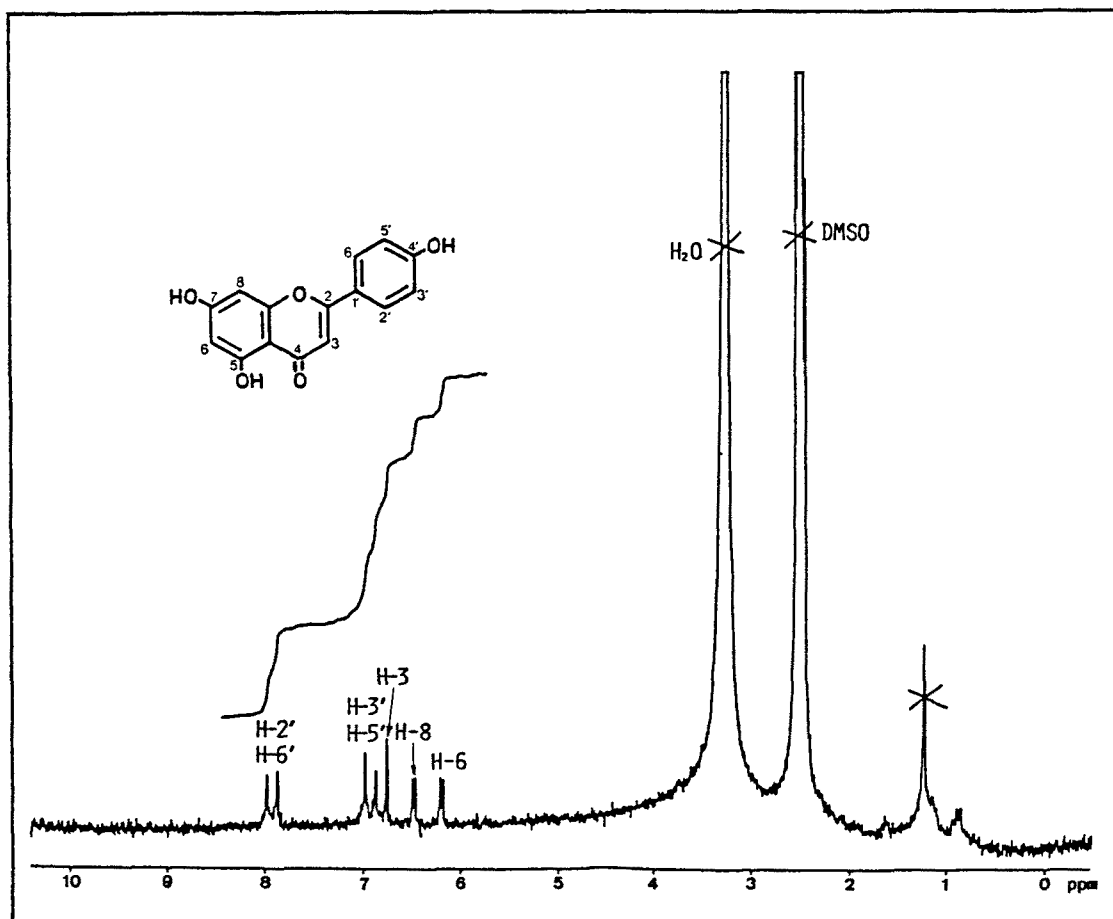


FIGURA V-24: Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia F.

### V.5.8.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA G.

La sustancia G ha sido aislada a partir del extracto "éter de petróleo" en una cantidad muy pequeña, inferior a 1 mg.

Datos analíticos:

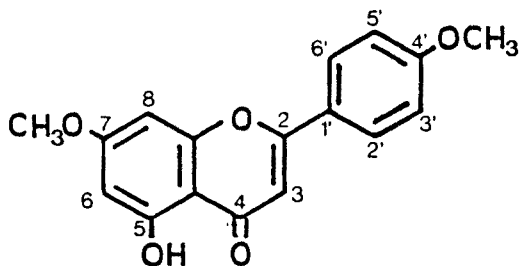
- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-25.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura V-26.

El comportamiento cromatográfico de la sustancia G es idéntico al de la 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona.

El análisis por espectroscopía UV-visible muestra una estructura de 5-OH-flavona (espectro en AlCl<sub>3</sub>+HCl constituido por cuatro bandas y  $\Delta\lambda_{II}$  en AlCl<sub>3</sub>+HCl respecto al MeOH de 41 nm), monosustituida en el anillo B (banda II en el espectro metanólico con un solo pico entre 250 y 275 nm), con las posiciones 7 y 4' metoxiladas (ausencia de desplazamientos de las bandas en NaOAc respecto al espectro metanólico). También se observa la ausencia de grupos o-dihidroxi y de sustitución en 6 y 8.

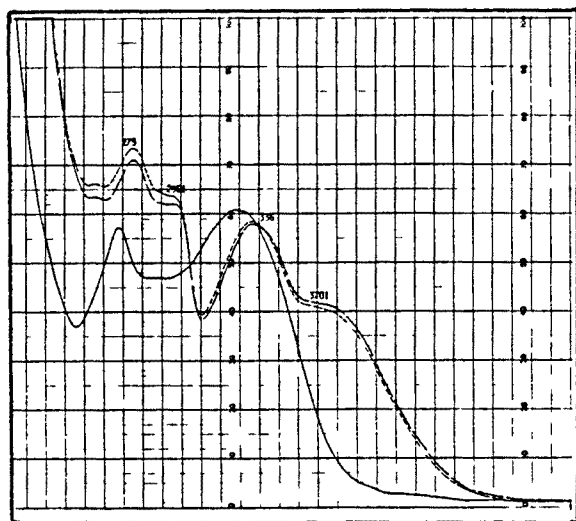
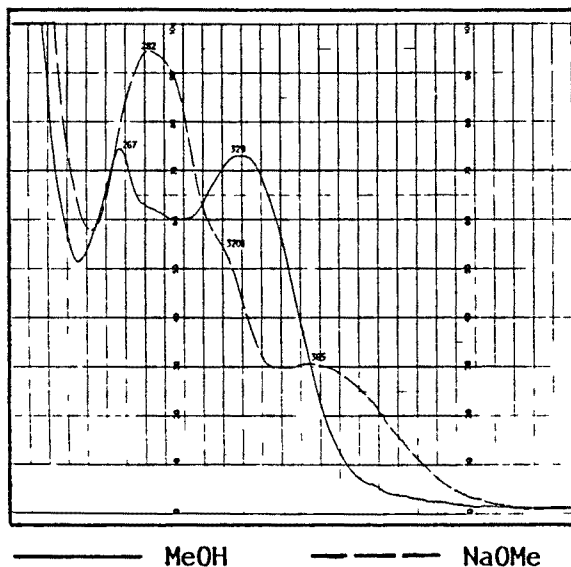
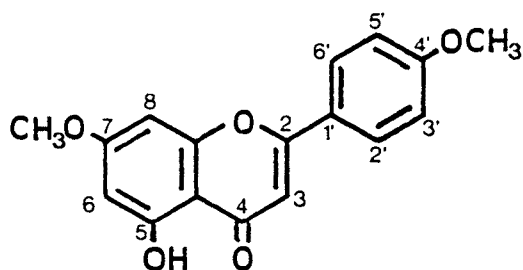
El espectro EI-MS no es de buena calidad debido a la poca cantidad de sustancia aislada. Permite ver, únicamente, el M<sup>+</sup> a m/z = 298, correspondiente a una fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, que es característica de una hidroxidimetoxiflavona.

Sin embargo, la información reunida sobre la sustancia G, permite afirmar que se trata de la 4'-O-Me-genkwanina o 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona.

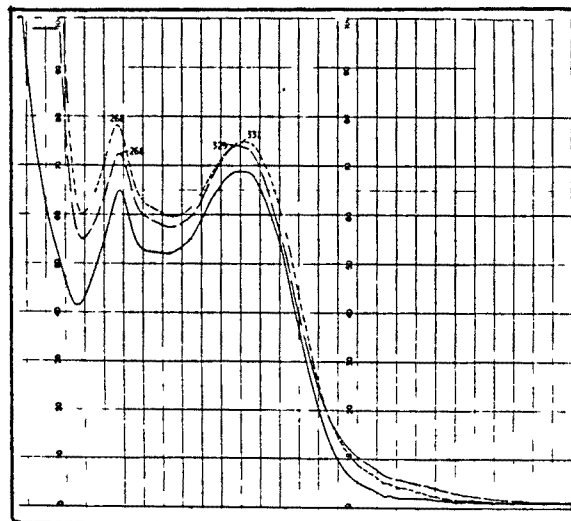


Substancia G: 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona  
(4'-O-Me-genkwanina).

FIGURA V-25: Espectros UV-visible de la substancia G.



— MeOH      - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl



— MeOH      - - - NaOAc  
 - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	267	329		
NaOMe:	282	320i	365	
AlCl <sub>3</sub> :	275	296i	336	370i
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	275	296i	336	370i
NaOAc:	268	329		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	268	331		

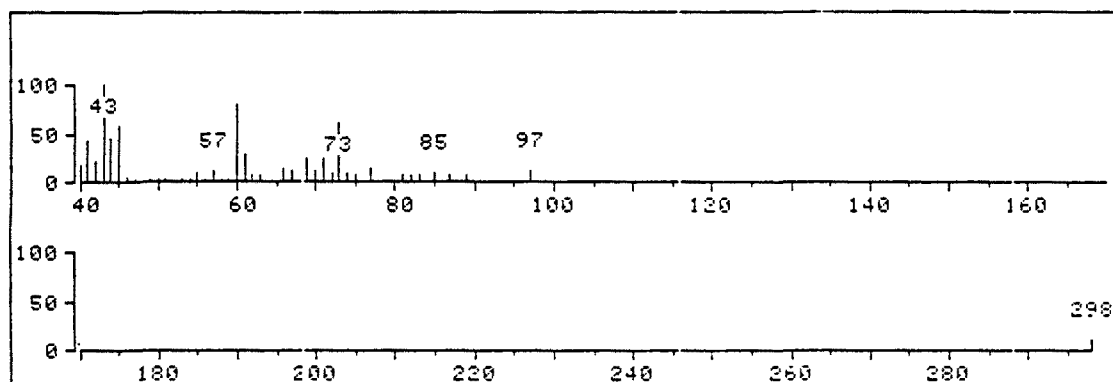


FIGURA V-26: Espectro EI-MS de la substancia G.



### V.5.9.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA H.

La sustancia H ha sido aislada a partir del extracto metanólico.

Datos analíticos:

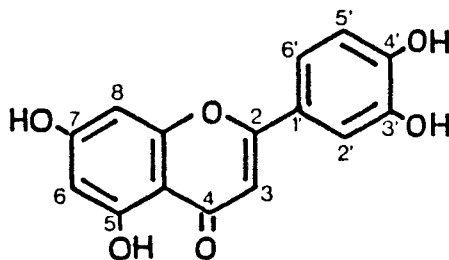
- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-27.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura V-28.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-29.

El comportamiento cromatográfico de la sustancia H es idéntico al de la luteolina. El estudio espectroscópico confirma que la sustancia H es la luteolina o 5,7,3',4'-(OH)<sub>4</sub>-flavona.

De los espectros en  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  se deduce que se trata de una 5-OH-flavona con un grupo *o*-dihidroxilo en el anillo B, confirmado también por el espectro en  $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ . El espectro en  $\text{NaOAc}$  demuestra la existencia del hidroxilo libre en 7.

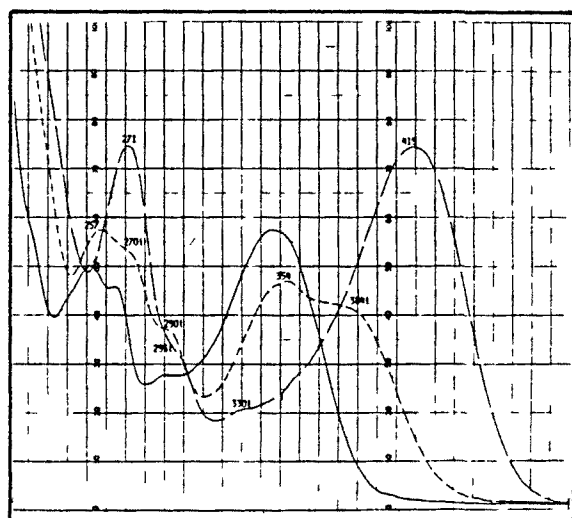
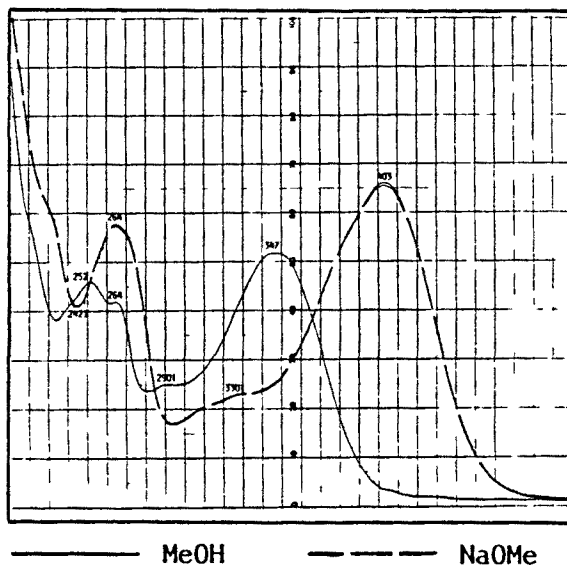
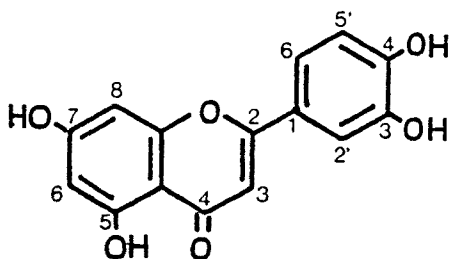
El espectro EI-MS confirma el peso molecular a 286 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ), correspondiente a una tetrahidroxiflavona, y la distribución de los hidroxilos en los anillos A y B (fragmentos  $\text{A}_1^+$ ,  $\text{A}_1+1$ ,  $\text{A}_1-28$ ,  $\text{A}_1-56$ ,  $\text{B}_1^+$  y  $\text{B}_2^+$  a 152, 153, 124, 96, 134 y 137, respectivamente).

En el espectro  $^1\text{H-NMR}$  los protones en 6 y 8 aparecen como sistema meta característico en 2 dobletes con una J pequeña (2Hz) a 6,16 ppm (H-6) y 6,36 ppm (H-8). El H-3 se presenta como singulete a 6,64 ppm. El protón H-5' aparece como doblete (J = 9 Hz), centrado a 6,89 ppm, por su acoplamiento *orto* con el H-6'. Éste forma un multiplete junto con el H-2' centrado a 7,41 ppm.

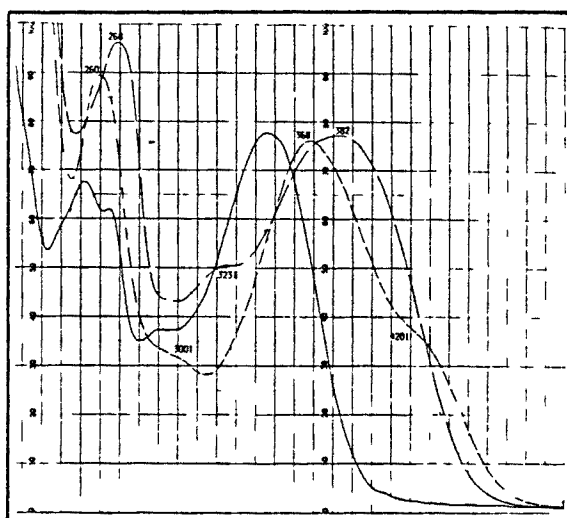


Substancia H: 5,7,3',4'-(OH)<sub>4</sub>-flavona  
(luteolina).

FIGURA V-27: Espectros UV-visible de la sustancia H.



— MeOH      - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - · - AlCl<sub>3</sub> + HCl



— MeOH      - - - NaOAc  
 - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	242i	252	264	290i	347
NaOMe:	264	330i	403		
AlCl <sub>3</sub> :	271	295i	330i	419	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	257	270i	290i	354	384i
NaOAc:	268	323i	382		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	260	300i	368	420i	

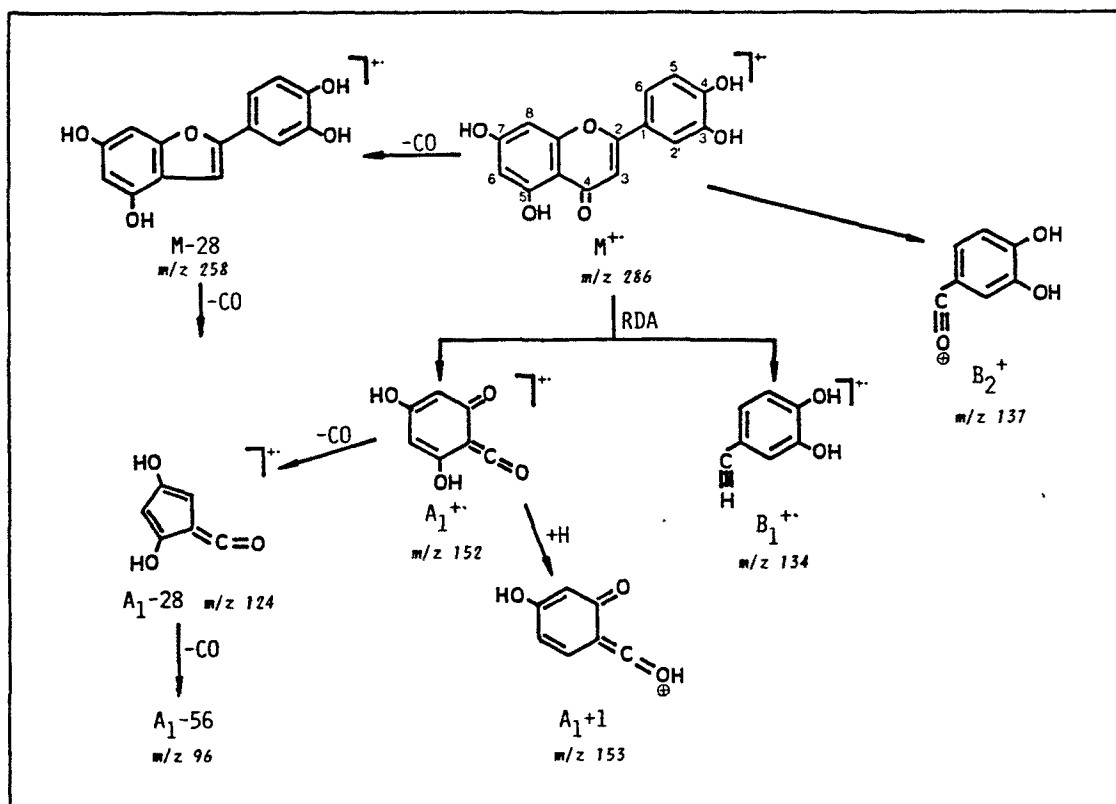
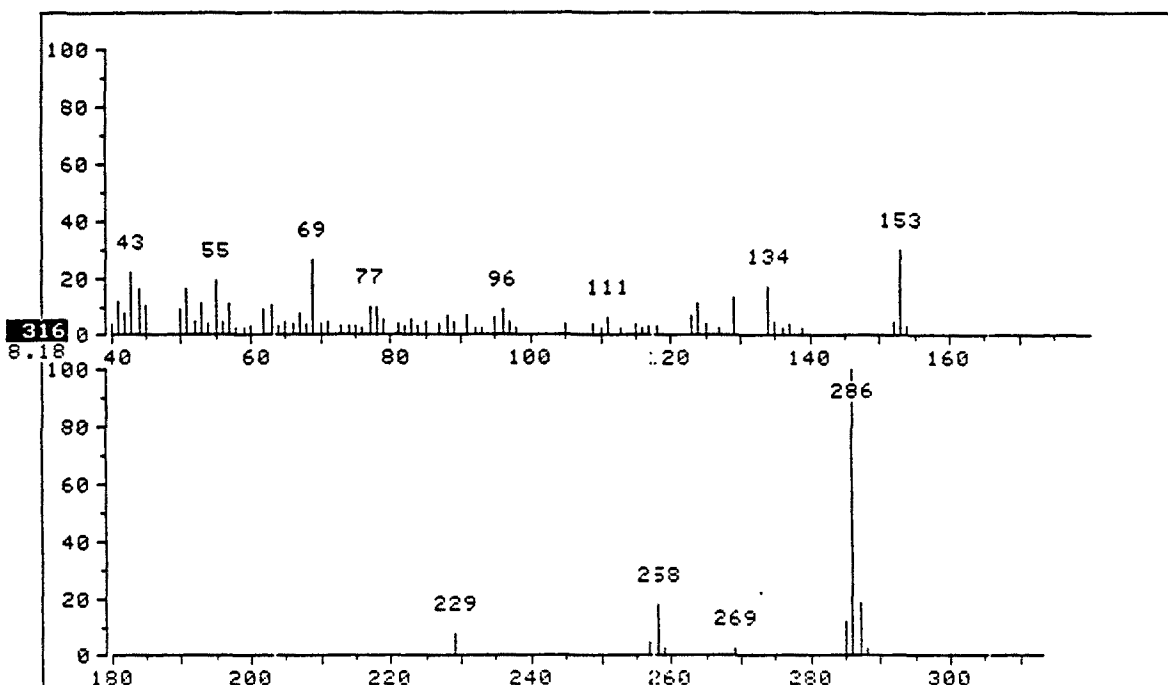


FIGURA V-28: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia H.

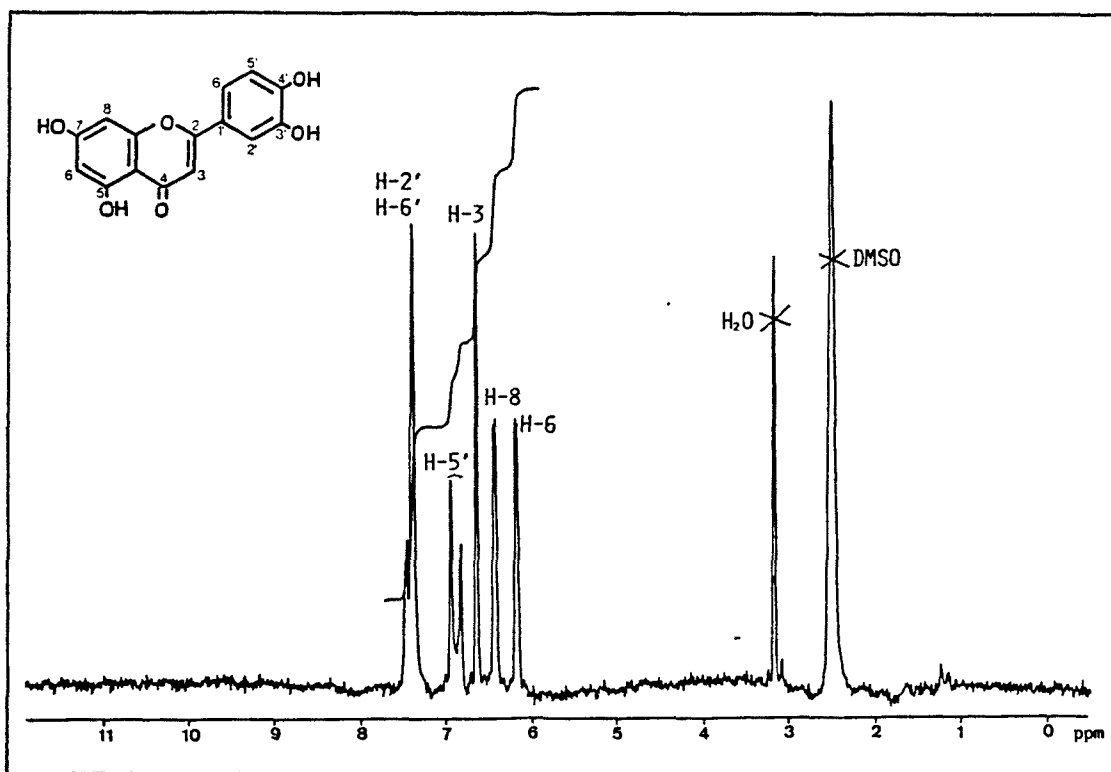


FIGURA V-29: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia H.

#### V. 5.10.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA I.

Esta sustancia ha sido aislada a partir del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-4.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-30.
- Espectrometría FAB-MS: figura V-31.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-32 y tabla V-5.
- Espectroscopía  $^{13}\text{C-NMR}$ : figura V-33 y V-34 y tabla V-5.

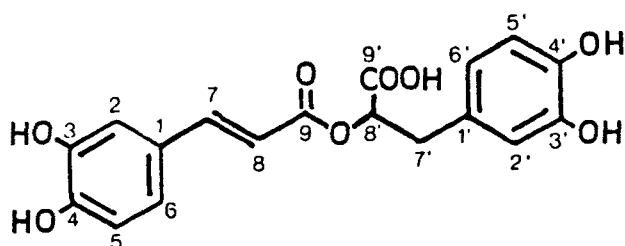
La sustancia I tiene un comportamiento cromatográfico idéntico al del ácido rosmarínico. el estudio espectroscópico realizado (UV-visible, FAB-MS,  $^1\text{H-NMR}$  y  $^{13}\text{C-NMR}$ ) confirman que la estructura de la sustancia I corresponde, en efecto, al ácido rosmarínico.

Su espectro UV-visible en solución metanólica es característico de los derivados hidroxilados del ácido cinámico, con máximos cercanos a los que presenta el ácido caféico. El desplazamiento provocado tanto por la adición de NaOMe como de NaOAc indican la presencia de hidroxilos fenólicos libres. El desplazamiento provocado por el  $\text{AlCl}_3$  y la regeneración del espectro metanólico al añadir HCl, caracterizan grupos  $\text{o}-(\text{OH})_2$  como únicos formadores de quelatos de la molécula. La presencia de éstos se confirma también por el desplazamiento provocado por el  $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ .

En el FAB-MS de iones negativos se aprecia un  $(\text{M-H})^-$  a 359, lo que confirma el peso molecular de 360 para la sustancia I. Los iones a m/z superiores se deben en su mayoría a la formación de complejos metálicos (con Na y K) de la molécula y su dímero, aductos con moléculas de glicerol de la matriz y complejos metálicos de éstos (fig. V-31). En el FAB-MS aparecen, además, los iones característicos de la rotura de la molécula por su enlace éster y los correspondientes a la pérdida de radicales por los fragmentos formados (fig. V-31).

El espectro  $^1\text{H-NMR}$  muestra claramente diferenciados los protones de los dos sistemas bencénicos 1,3,4 trisustituidos, que dan sistemas del tipo AMX. Los protones unidos a los carbonos del doble enlace ( $\text{C}_7=\text{C}_8$ ) resonan como sendos dobletes con una J de 16 Hz, lo que caracteriza un doble enlace trans-disustituido. Por último, los tres protones de los carbonos  $\text{C}_7$ , y  $\text{C}_8$ , forman un sistema ABX. Las asignaciones, multiplicidad y constantes de acoplamiento se relacionan en la tabla V-5.

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR se aprecian 18 señales correspondientes a los 18 carbonos de la molécula. La asignación (tabla V-5) se ha efectuado en base a la comparación de los espectros con desacoplamiento total y parcial ("off resonance") de protón, para distinguir entre C, CH,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , y los trabajos de ANDARY *et al.* (1982, 1985a y 1985b) y BECKER *et al.* (1982a) sobre derivados del ácido caféico y del 2-(3',4'-(OH) $_2$ -fenil)-etanol.



Substancia I: ácido rosmarínico.

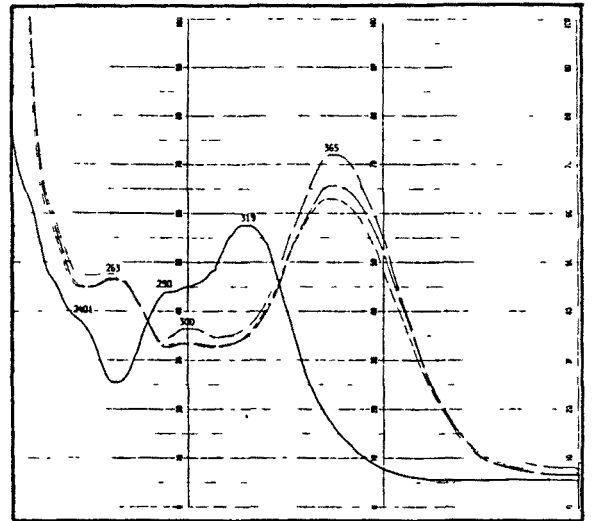
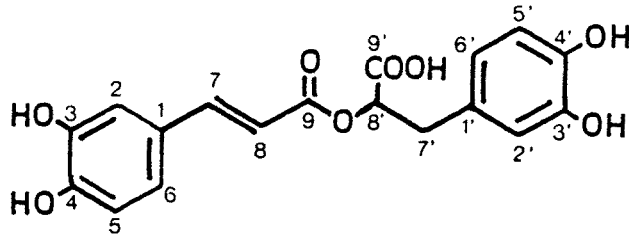
<b>A</b>			
H	$\delta$ (multiplicidad, J)	H	$\delta$ (multiplicidad, J)
2	7,06 (d, 2)	2'	6,67 (d,2)
5	6,75 (d,8)	5'	6,63 (d,8)
6	6,96 (dd, 8,2)	6'	6,49 (dd, 8,2)
7	7,39 (d, 16)	7'	2,75 (dd, 14,9) 3,00 (dd, 14,3)
8	6,19 (d, 16)	8'	4,87 (dd, 9,3)

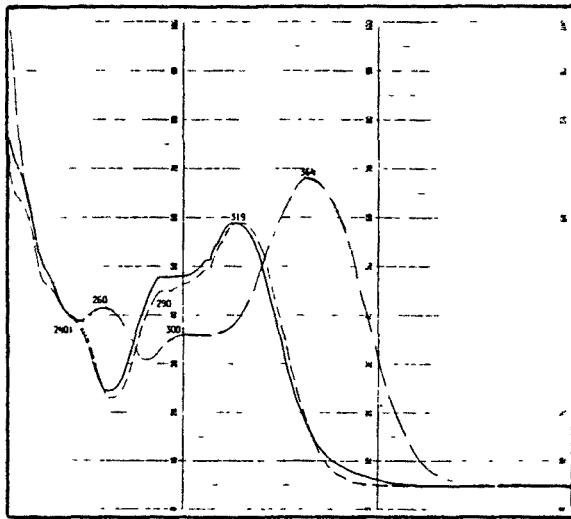
<b>B</b>					
C	$\delta$ (multiplicidad)	C	$\delta$ (multiplicidad)	C	$\delta$ (multiplicidad)
1	125,47 (s)	7	144,61 (d)	4'	143,64 (s)
2	115,01	8	116,01	5'	115,43
3	145,79 (s)	9	166,04 (s)	6'	119,72 (d)
4	148,57 (s)	1'	129,16 (s)	7'	36,92 (t)
5	114,39	2'	116,68	8'	75,00 (d)
6	120,92 (d)	3'	144,88 (s)	9'	172,45 (s)

TABLA V-5: Asignación de señales de los espectros de  $^1\text{H}$ -NMR (A) y  $^{13}\text{C}$ -NMR (B).  $\delta$  en ppm respecto a TMS, J en Hz.

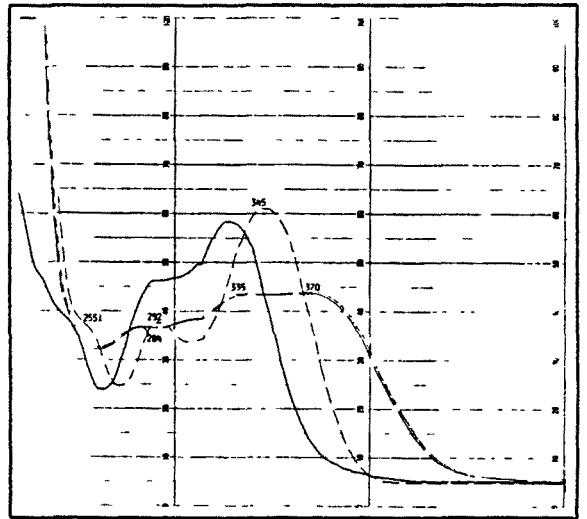
FIGURA V-30: Espectros UV-visible de la sustancia I.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
- - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	290	319	
NaOMe:	263	300	365	(descomposición)
AlCl <sub>3</sub> :	260	300i	364	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	240i	290	319	
NaOAc:	284	335	370	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	255i	292	345	

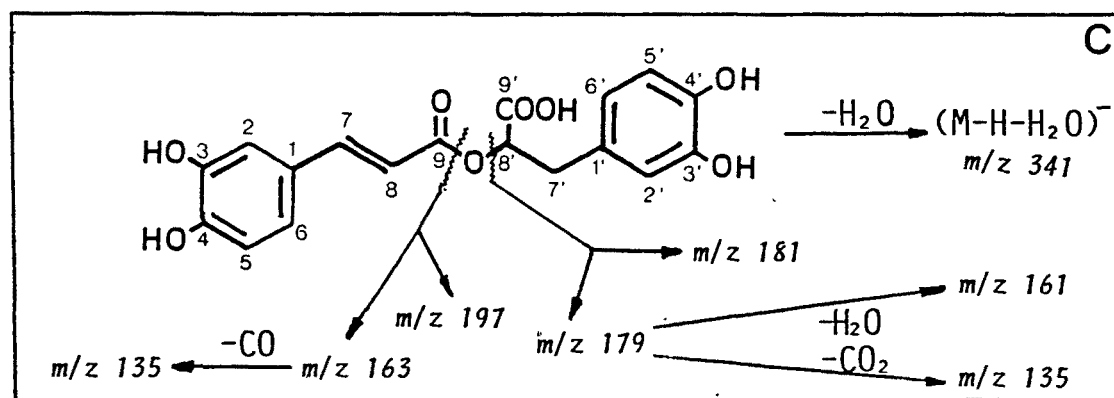
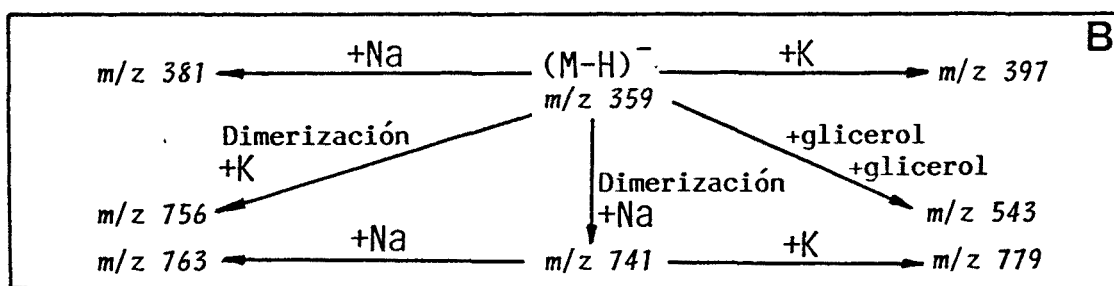
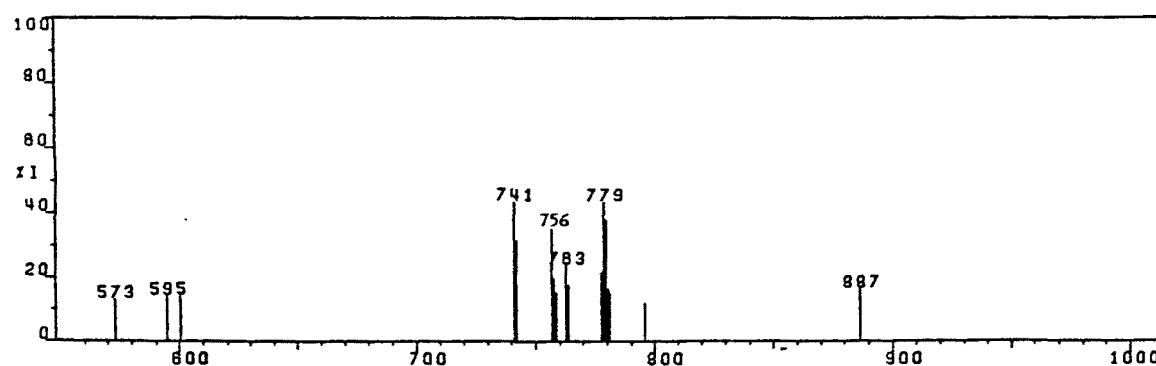
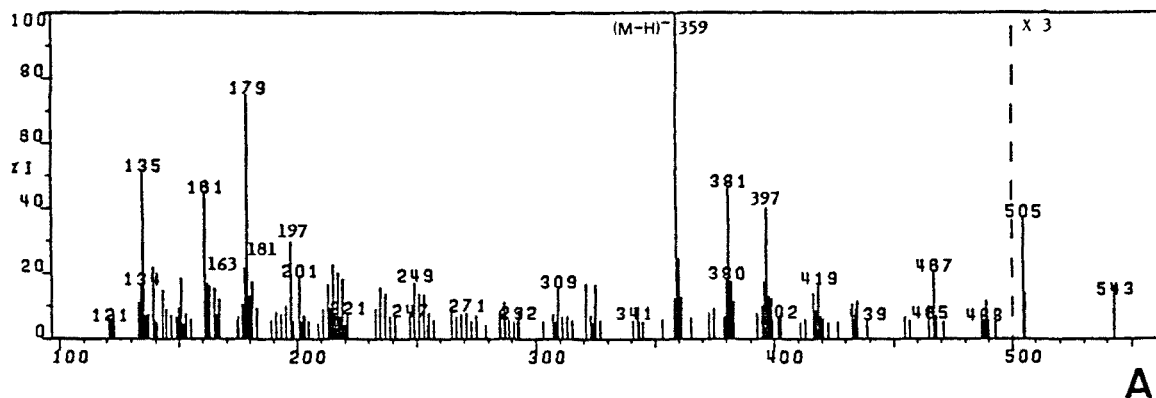


FIGURA V-31: Espectrometría FAB-MS de la sustancia I. A: Espectro FAB-MS de iones negativos. B: Principales iones formados por complejación. C: Principales iones formados en la fragmentación.



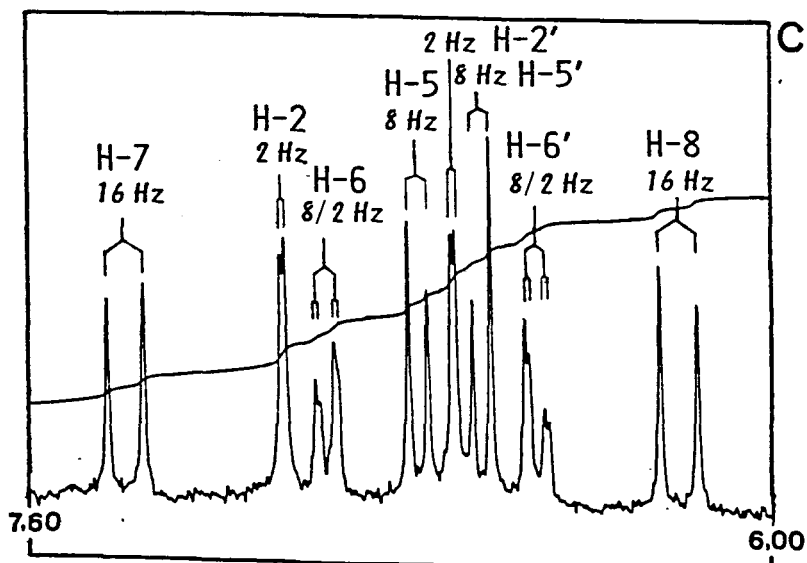
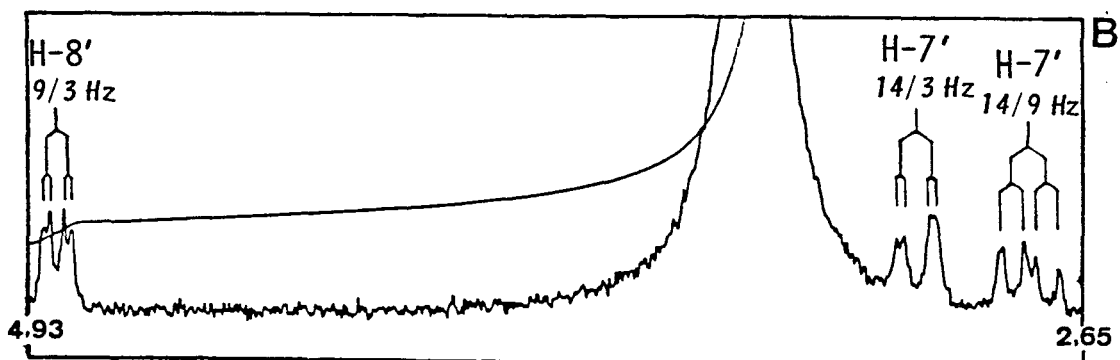
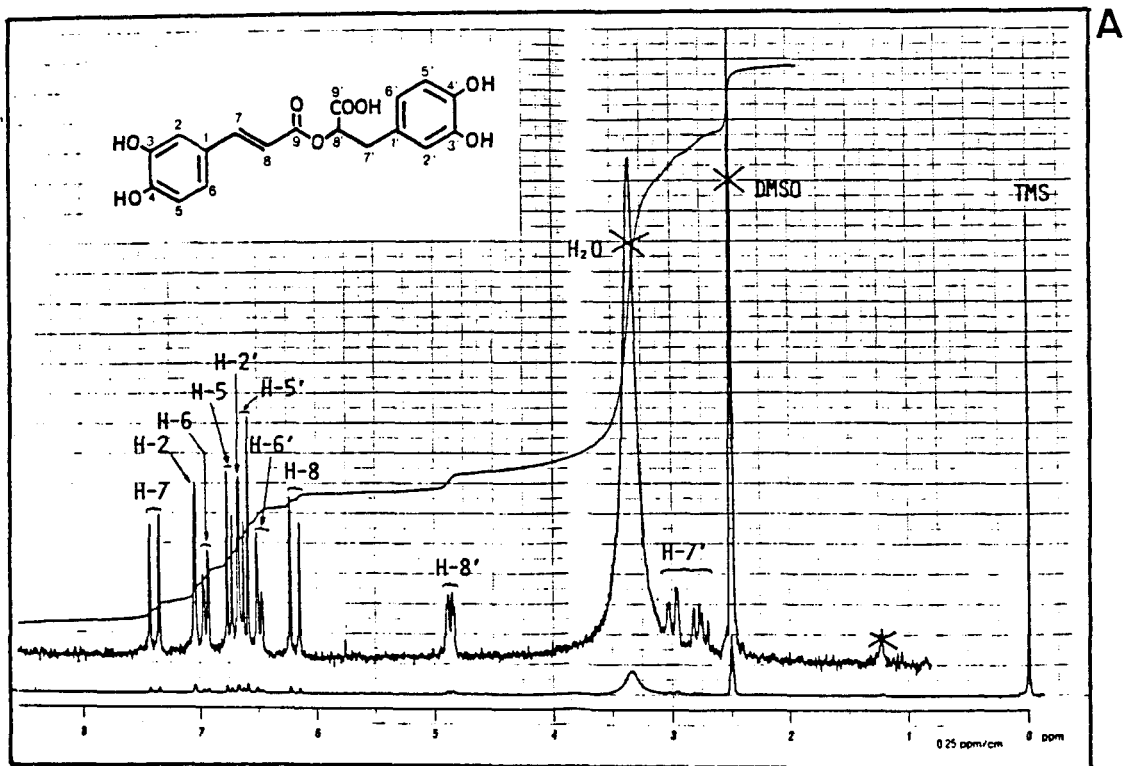


FIGURA V-32: Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $d_6\text{DMSO}$ ) de la sustancia I. A: Espectro total. B: Ampliación de la zona entre 2,65 y 4,93 ppm. C: Ampliación de la región entre 6,0 y 7,6 ppm.

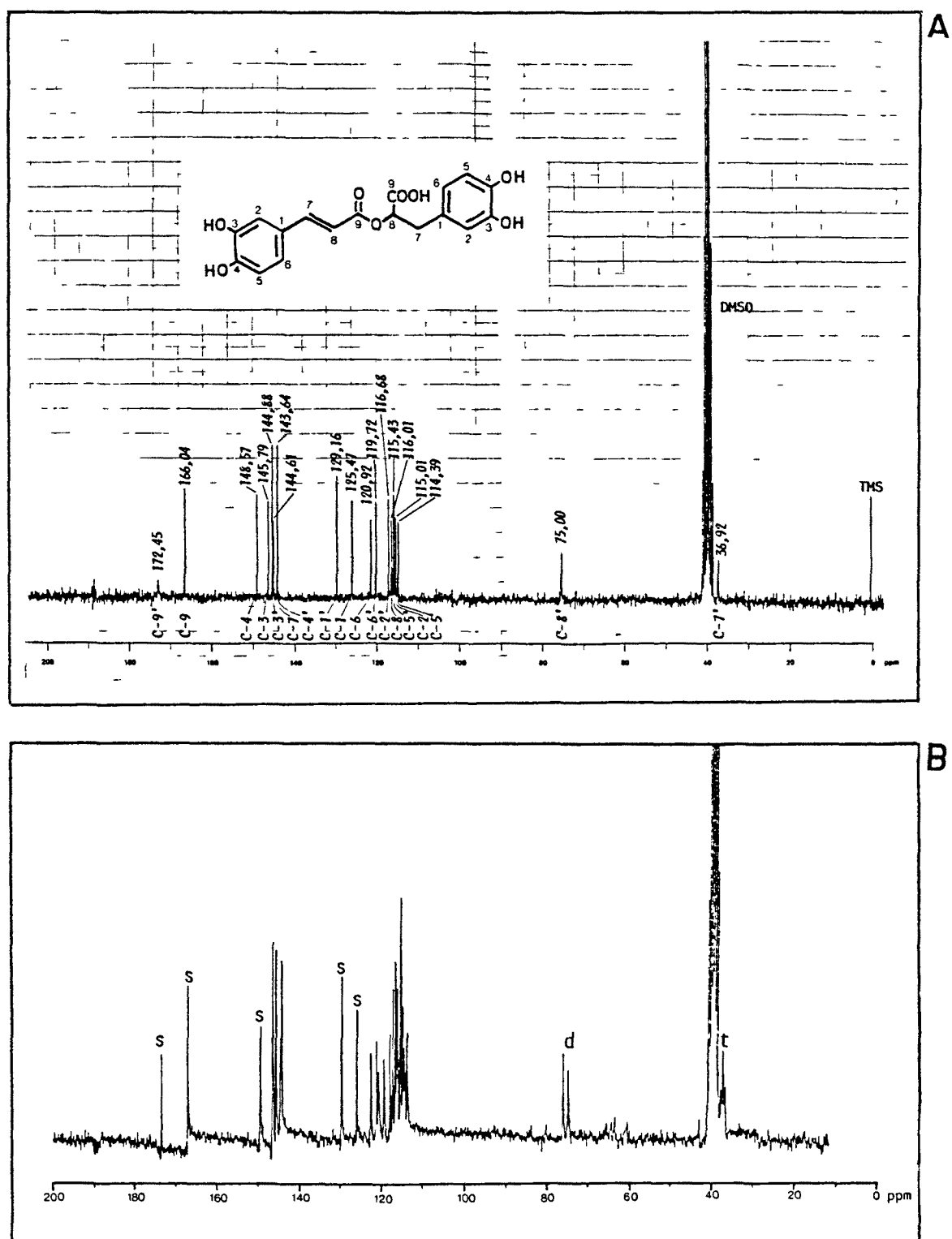


FIGURA V-33 : Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR (50,29 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO) de la substancia I.  
A: Espectro normal (con desacoplamiento total de protón). B: Espectro "off resonance".

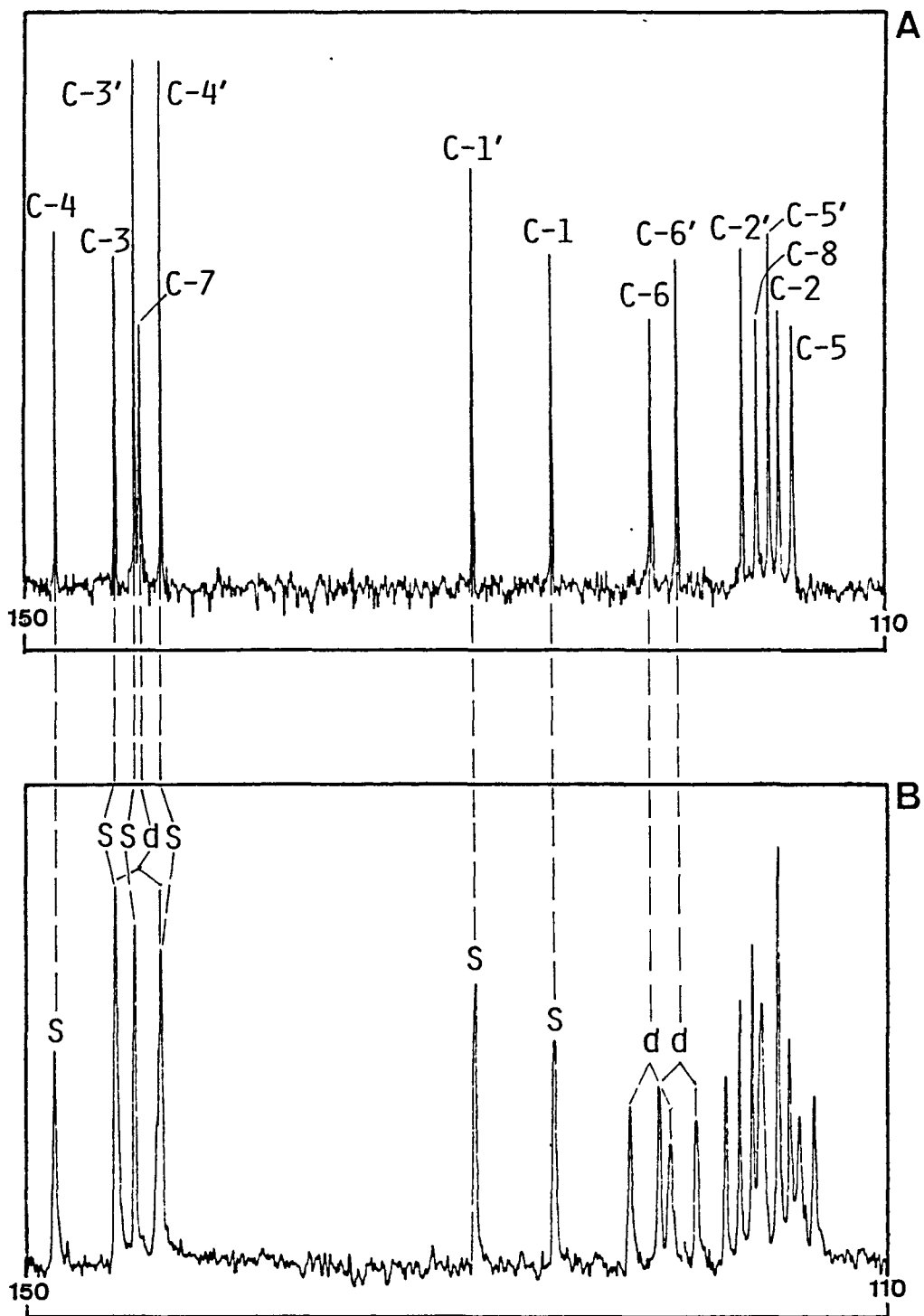


FIGURA V-34: Ampliaciones de la zona entre 110 y 150 ppm del espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR (50,29 MHz,  $d_6\text{DMSO}$ ) de la sustancia I. A: Espectro normal. B: Espectro "off resonance".

### V.5.11.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA J.

La sustancia J ha sido aislada a partir del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-2 (heterósido) y tabla V-3 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura V-35 (heterósido) y figura V-36 (aglicón).
- Espectrometría FAB-MS: figura V-37.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-38.
- Espectrometría EI-MS del aglicón: figura V-39.

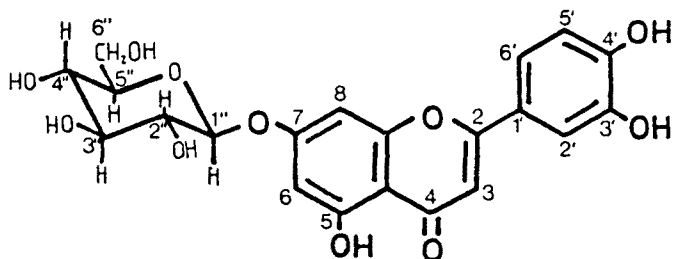
El comportamiento cromatográfico de la sustancia J es idéntico al de la 7-glucosil-luteolina. Por hidrólisis ácida libera glucosa (identificada por HPTLC) y un aglicón que se identifica cromatográficamente, por espectroscopía UV-visible y EI-MS como la luteolina. Del análisis por espectroscopía UV-visible de J resulta que la cadena glicosídica substituye el 7-OH.

El FAB-MS de la figura V-36 corresponde a una mezcla de las sustancias J y L, ya que fué registrado antes de que éstas fueran separadas. Permite distinguir perfectamente, sin embargo, los  $(\text{M-H})^-$  de cada una de ellas, a  $m/z = 447$  (J) y  $m/z = 463$  (L).

El peso molecular de J (448) indica que se trata de un monoglicósido. La pérdida de 162 observada en el FAB-MS ( $\text{M-H}-162$  a  $m/z = 285$ , correspondiente al aglicón) confirma que el azúcar es una hexosa.

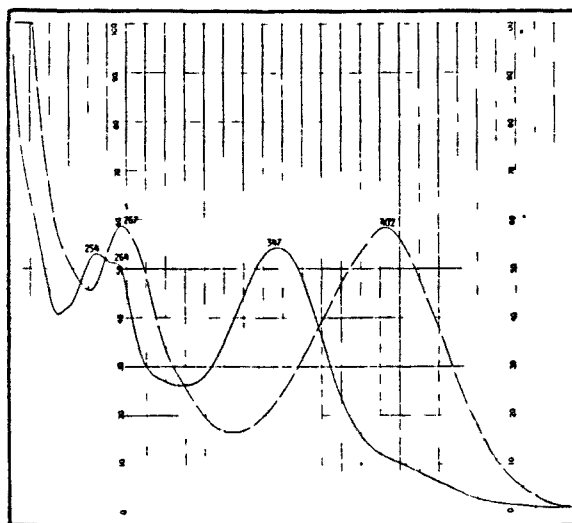
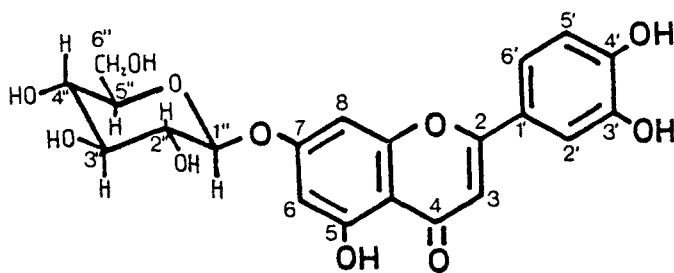
El espectro  $^1\text{H-NMR}$  de J corrobora que es un monoglicósido de la luteolina. Efectivamente, el doblete a 5,07 ppm (J aprox. 7 Hz) del H-1 del azúcar integra un protón. Su constante de acoplamiento indica que la unión del azúcar al aglicón es  $\beta$ .

Por tanto, la sustancia J es la 7-O- $\beta$ -D-glucosil-luteolina (cinarósido).

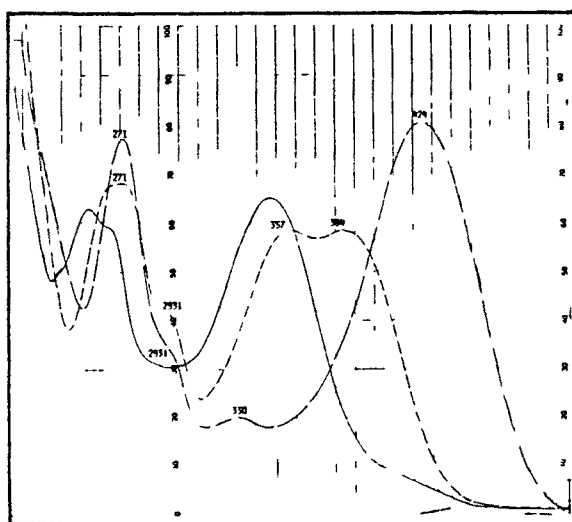


Substancia J: 7-O- $\beta$ -D-glucosil-luteolina (cinarósido).

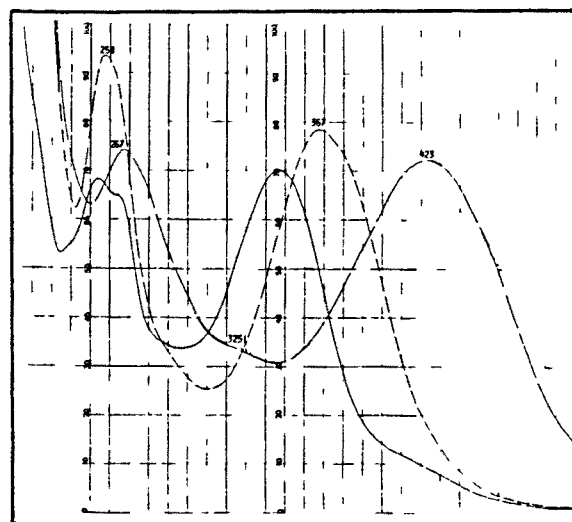
FIGURA V-35: Espectros UV-visible de la sustancia J.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- . - . AlCl<sub>3</sub>, + HCl

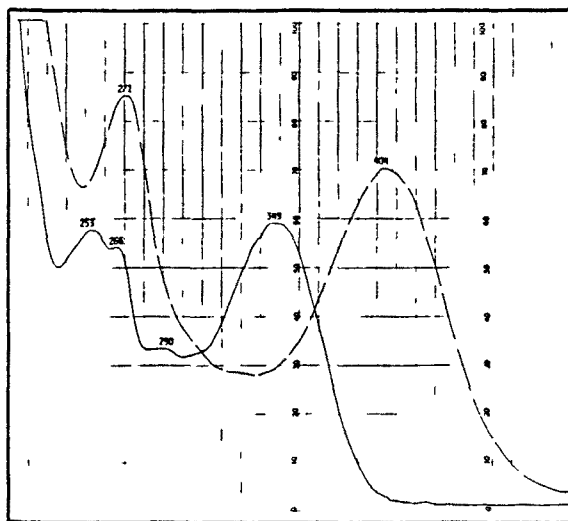
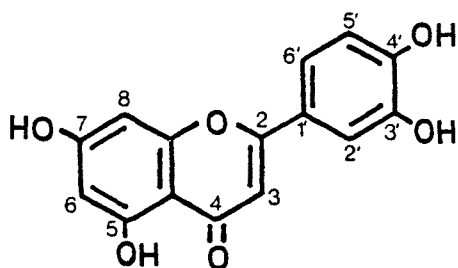


———— MeOH      - - - - NaOAc  
- - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

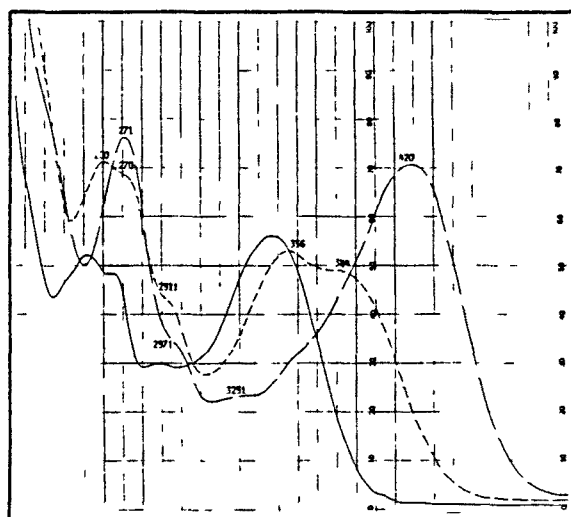
Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	254	264	347	
NaOMe:	267	402		
AlCl <sub>3</sub> :	271	293i	330	424
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	271	293i	357	384
NaOAc:	267	325i	423	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	258	367		

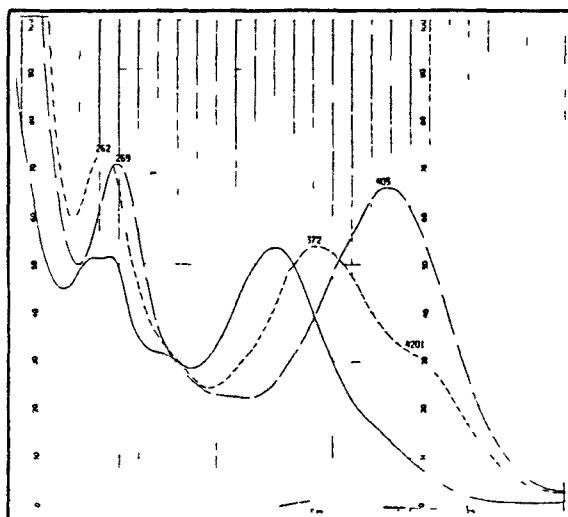
FIGURA V-36: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia J.



———— MeOH      - - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- · - · - AlCl<sub>3</sub>, + HCl



———— MeOH      - - - - - NaOAc  
- - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	266	290	349	
NaOMe:	271	404			
AlCl <sub>3</sub> :	271	297i	329i	420	
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	260	270	291i	356	384
NaOAc:	269	405			
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	272	372	420i		

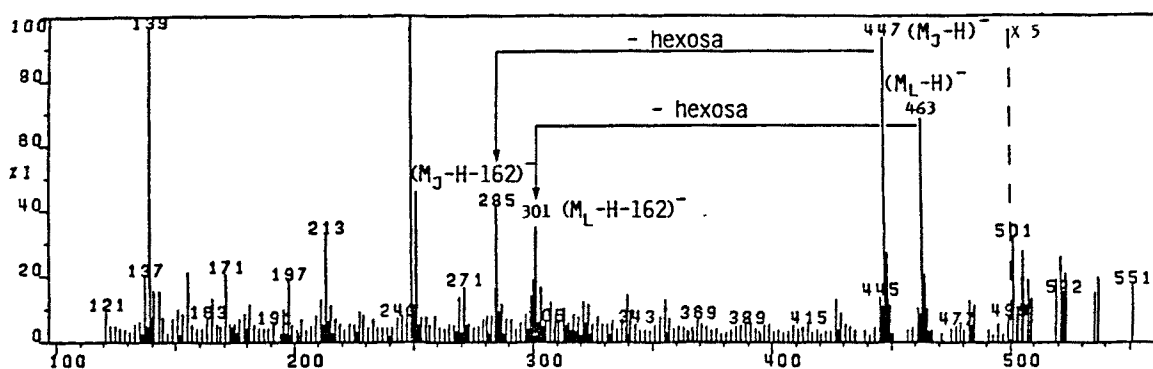


FIGURA V-37: FAB-MS de iones negativos de una mezcla de las sustancias J y L.

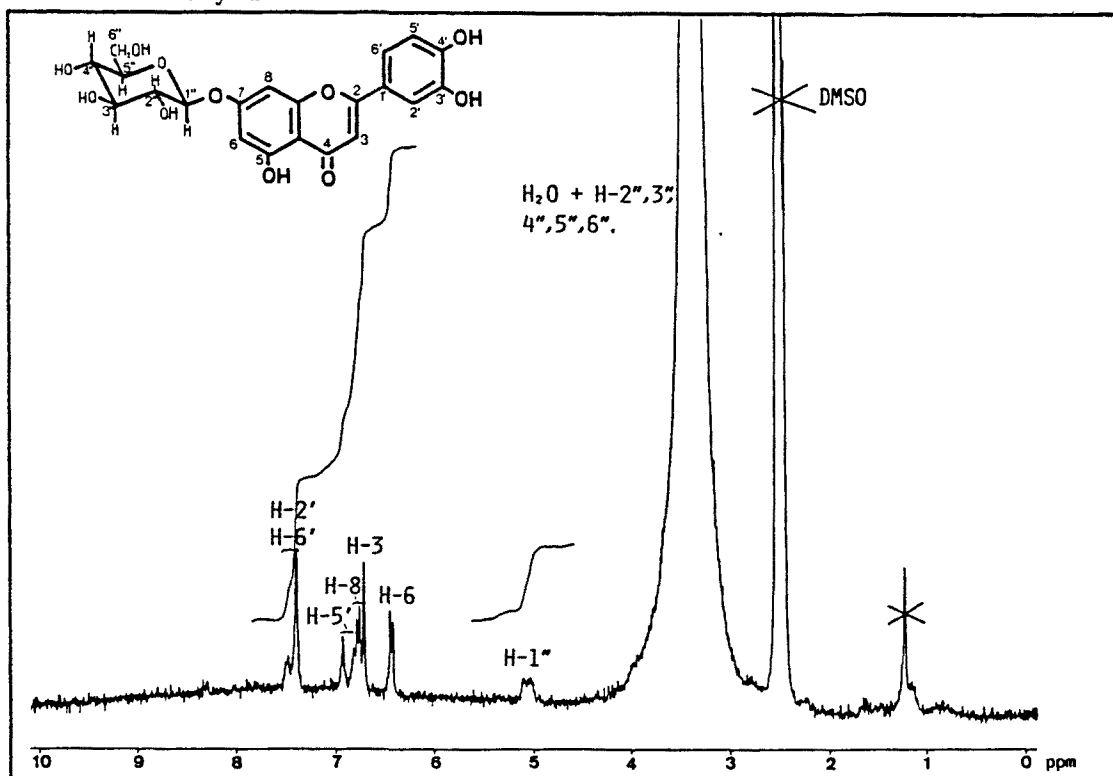


FIGURA V-38: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6$ -DMSO) de la sustancia J.

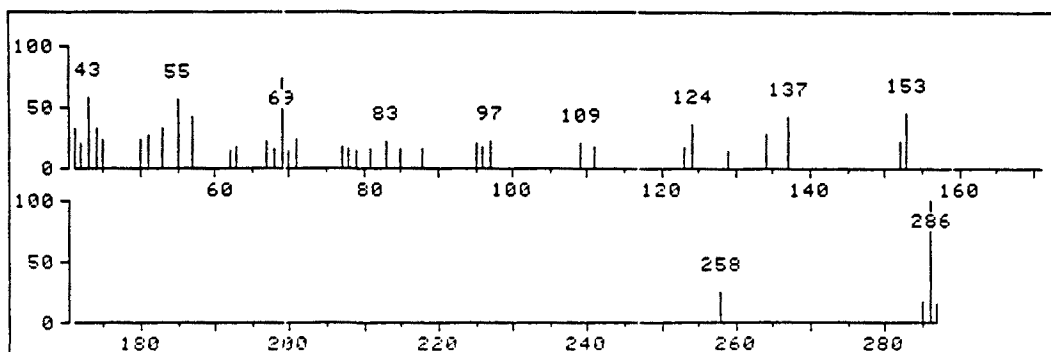


FIGURA V-39: Espectro EI-MS del aglicón de la sustancia J.

### V.5.12.- ESTRUCTURA DE SUBSTANCIA K.

Esta sustancia ha sido aislada del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla V-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura V-40.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura V-41.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-42.

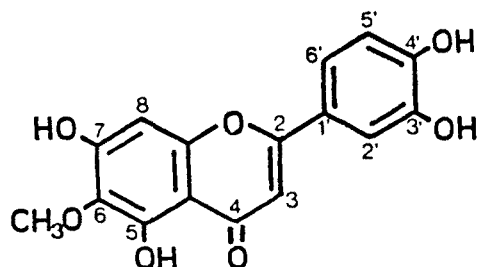
La sustancia K se comporta cromatográficamente como una flavona relativamente polar, probablemente metoxilada en la posición 6 u 8.

Sus espectros UV-visible indican que es una 5-OH-flavona, 6-substituida, con un grupo *o*-dihidroxiilo libre en el anillo B y un hidroxilo libre en 7.

El EI-MS presenta un  $\text{M}^{+}$  a  $m/z = 316$  ( $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$ ), correspondiente a una tetrahidroximetoxiflavona. Los iones  $\text{B}_1^+$ ,  $\text{B}_1+1$ ,  $\text{B}_2^+$  y  $\text{B}_2-28$ , respectivamente a  $m/z = 134$ , 135, 137 y 109, caracterizan un anillo B con dos hidroxilos, que gracias al espectro  $^1\text{H-NMR}$  podemos situar en las posiciones 3 y 4'.

El anillo A contiene 2 hidroxilos y un metoxilo ( $\text{A}_1-15$ ,  $\text{A}_1-43$  y  $\text{A}_1-71$  a  $m/z = 167$ , 139 y 111 respectivamente). Éste se sitúa en la posición 6 ya que en el EI-MS se aprecia un pico intenso a  $m/z = 301$ , correspondiente a M-15. Los dos hidroxilos son los que ocupan las posiciones 5 y 7.

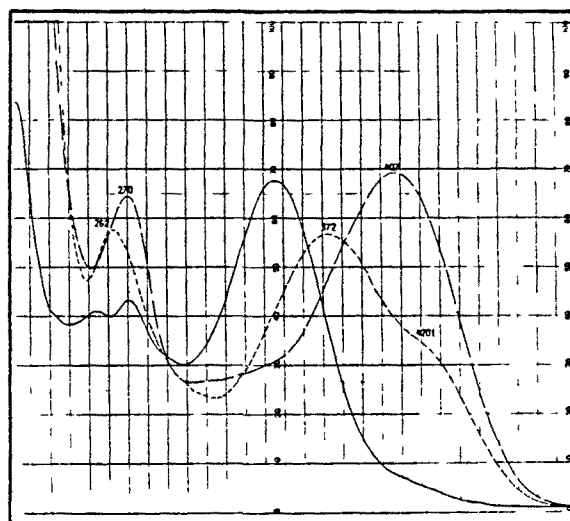
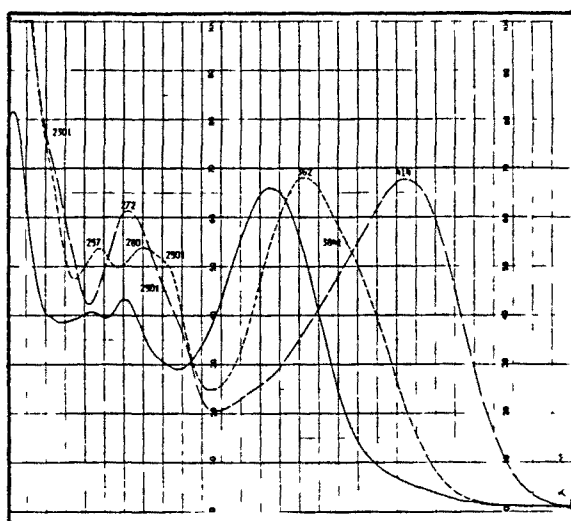
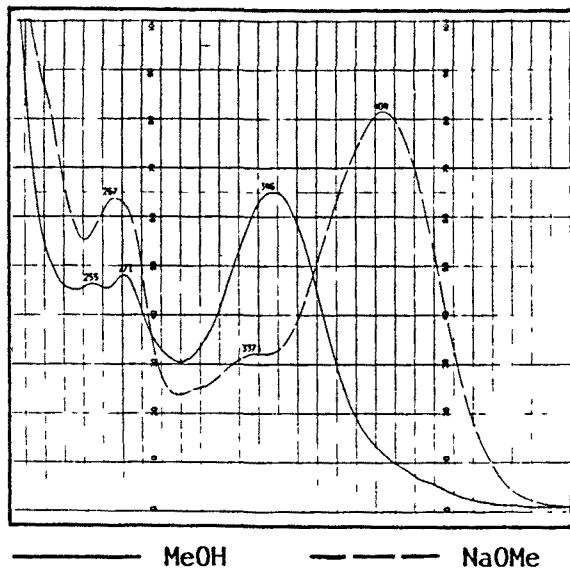
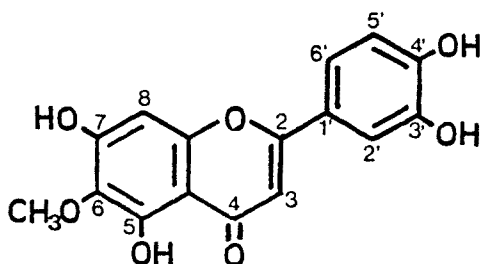
El espectro  $^1\text{H-NMR}$  confirma que la sustancia K es la nepetina o eupafolina o 5,7,3',4'-(OH) $_4$ -6-OMe-flavona.



Substancia K: 5,7,3',4'-(OH) $_4$ -6-OMe-flavona  
(nepetina o eupafolina).



FIGURA V-40: Espectros UV-visible de la sustancia K.



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl

———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	255	271	346			
NaOMe:	267	337i	404			
AlCl <sub>3</sub> :	230i	272	290i	414		
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	230i	257	280	290i	362	384i
NaOAc:	270	407				
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	262	372	420i			

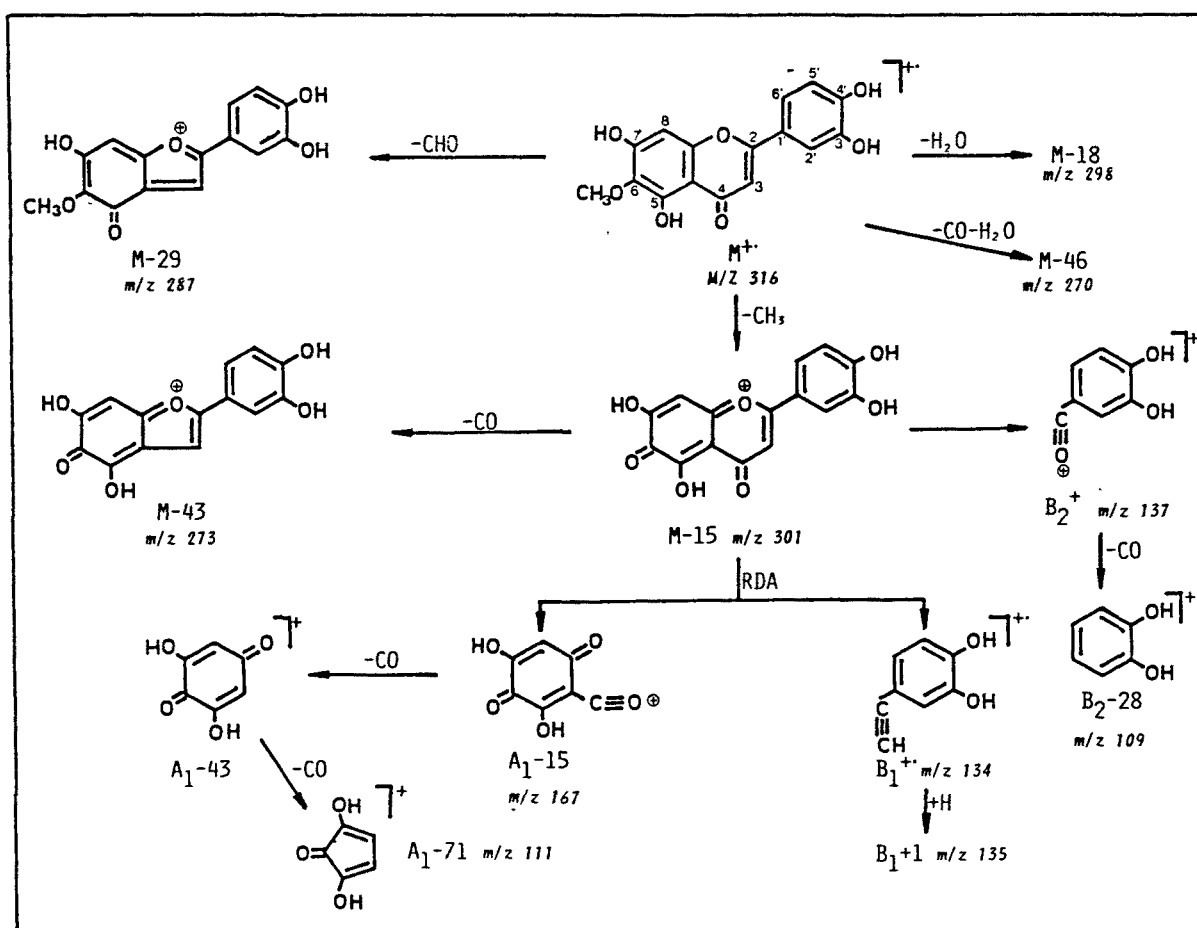
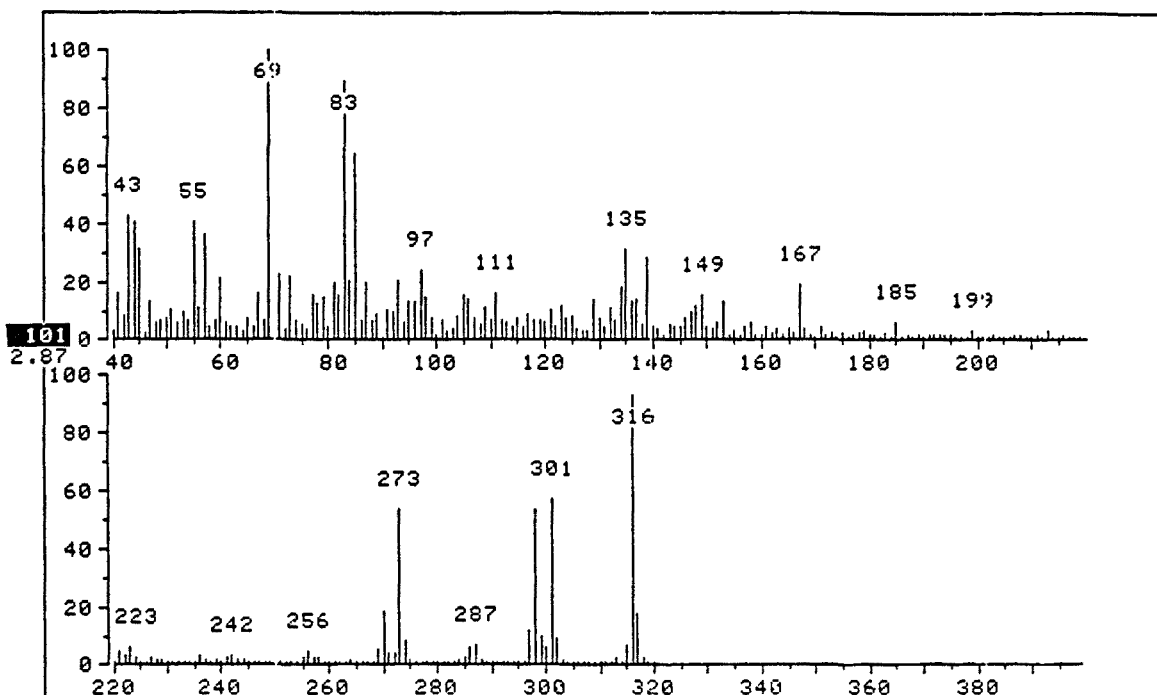


FIGURA V-41: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la substancia K.

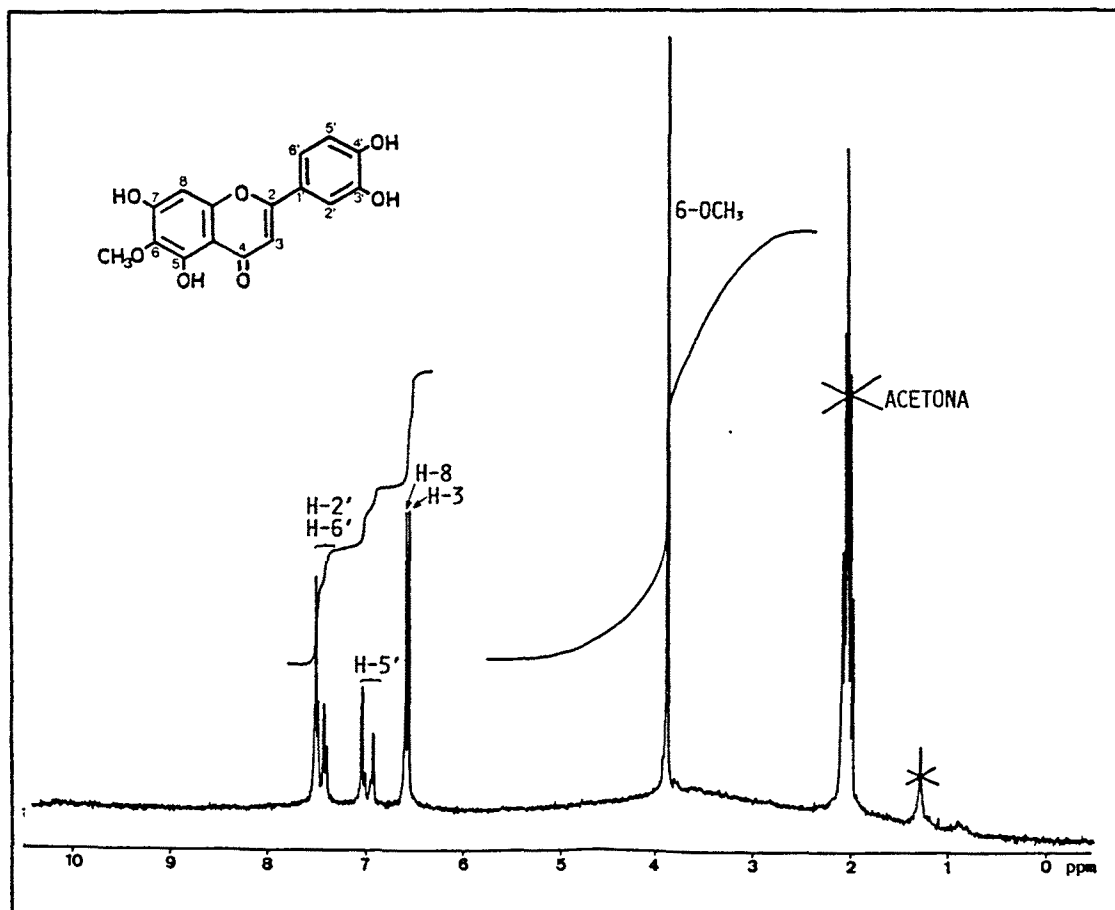


FIGURA V-42: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia K.

### V.5.13.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA L.

La sustancia L ha sido aislada a partir del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tablas V-2 (heterósido) y V-3 (aglicón)
- Espectroscopía UV-visible: figura V-43 (heterósido) y V-44 (aglicón).
- Espectrometría FAB-MS: figura V-36 (apartado V.5.11).
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-45.

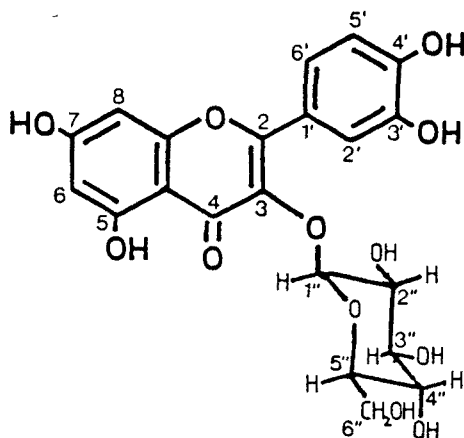
La hidrólisis de L proporciona glucosa (identificada por HPTLC) y quercetina, cuya estructura ha sido establecida por cromatografía y por espectroscopía UV-visible.

Del análisis del compuesto L por espectroscopía UV-visible, se deduce que la cadena osídica se halla unida al hidroxilo de la posición 3 de la quercetina.

El peso molecular de 464 ( $(\text{M-H})^-$  a  $m/z = 463$ ) y la pérdida de 162 unidades de masa, dando un  $(\text{M-H-162})^-$  a  $m/z = 301$  correspondiente a la quercetina, observados en el FAB-MS, indican que J es un monoglicósido y confirman que el azúcar es una hexosa.

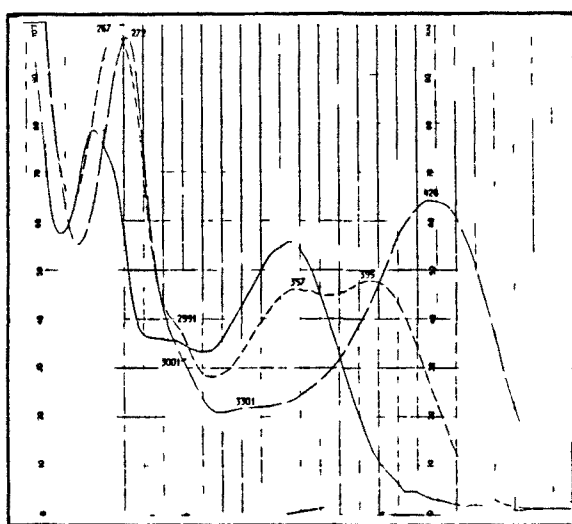
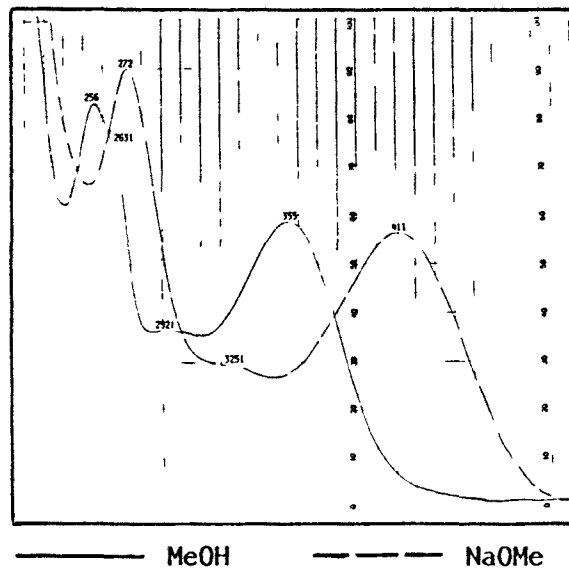
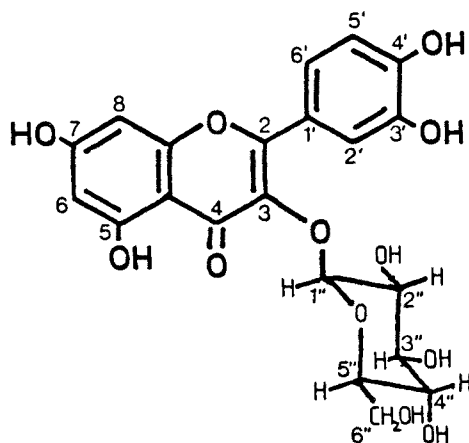
En el  $^1\text{H-NMR}$ , el H-1 del azúcar aparece como doblete deformado característico (centrado a 5,43 ppm), integrando un solo protón, lo cual corrobora que se trata de un monoglicósido. Su constante de acoplamiento ( $J$  aprox. 7 Hz) es característica de unión  $\beta$ .

Todo lo expuesto permite concluir que el compuesto L es la isoquercitrina o 3-O- $\beta$ -D-glucosil-quercetina.

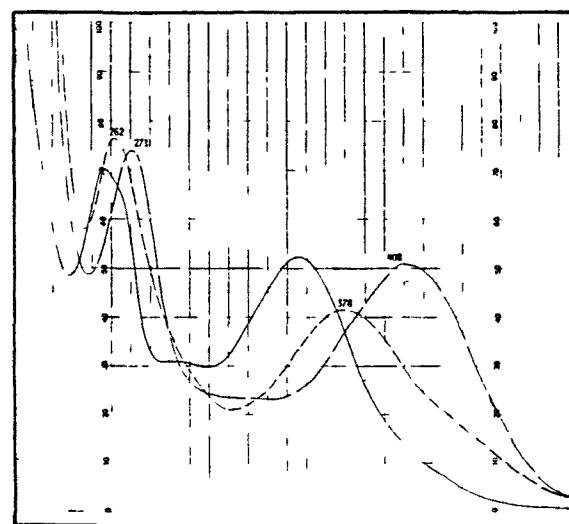


Substancia L: 3-O- $\beta$ -D-glucosil-quercetina.

FIGURA V-43: Espectros UV-visible de la substancia L.



— MeOH      - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 ····· AlCl<sub>3</sub> + HCl

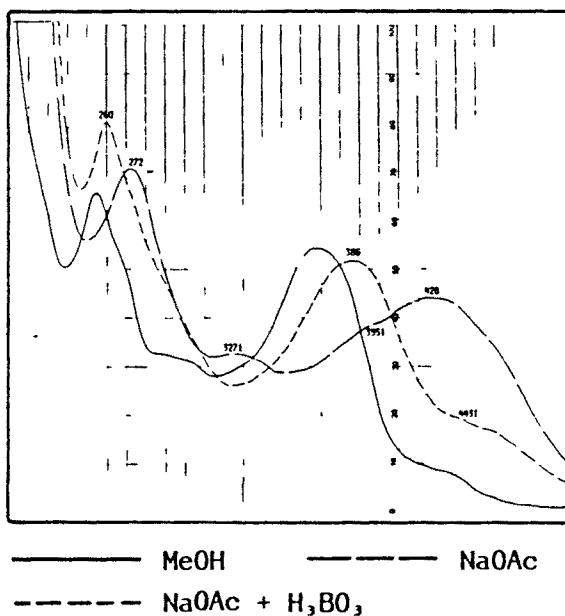
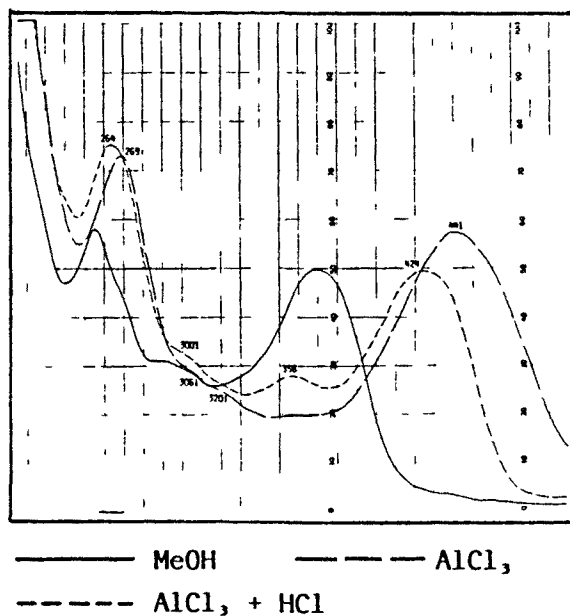
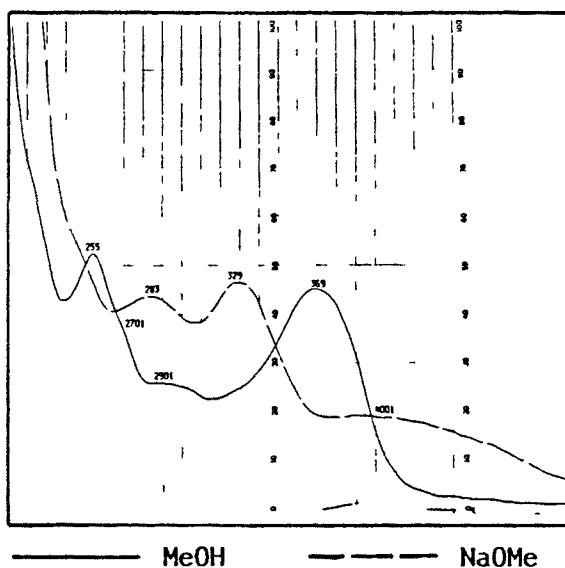
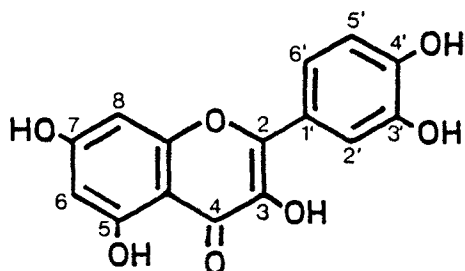


— MeOH      - - - NaOAc  
 - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	256	263i	292i	355
NaOMe:	272	325i	411	
AlCl <sub>3</sub> :	272	300i	330i	426
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	267	299i	357	395
NaOAc:	271	408		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	262	378		

FIGURA V-44: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia L.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	255	270i	290i	369
NaOMe:	283	329	400i	
AlCl <sub>3</sub> :	269	306i	320i	441
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	264	300	356	424
NaOAc:	272	327	395i	428
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	260	386	443i	

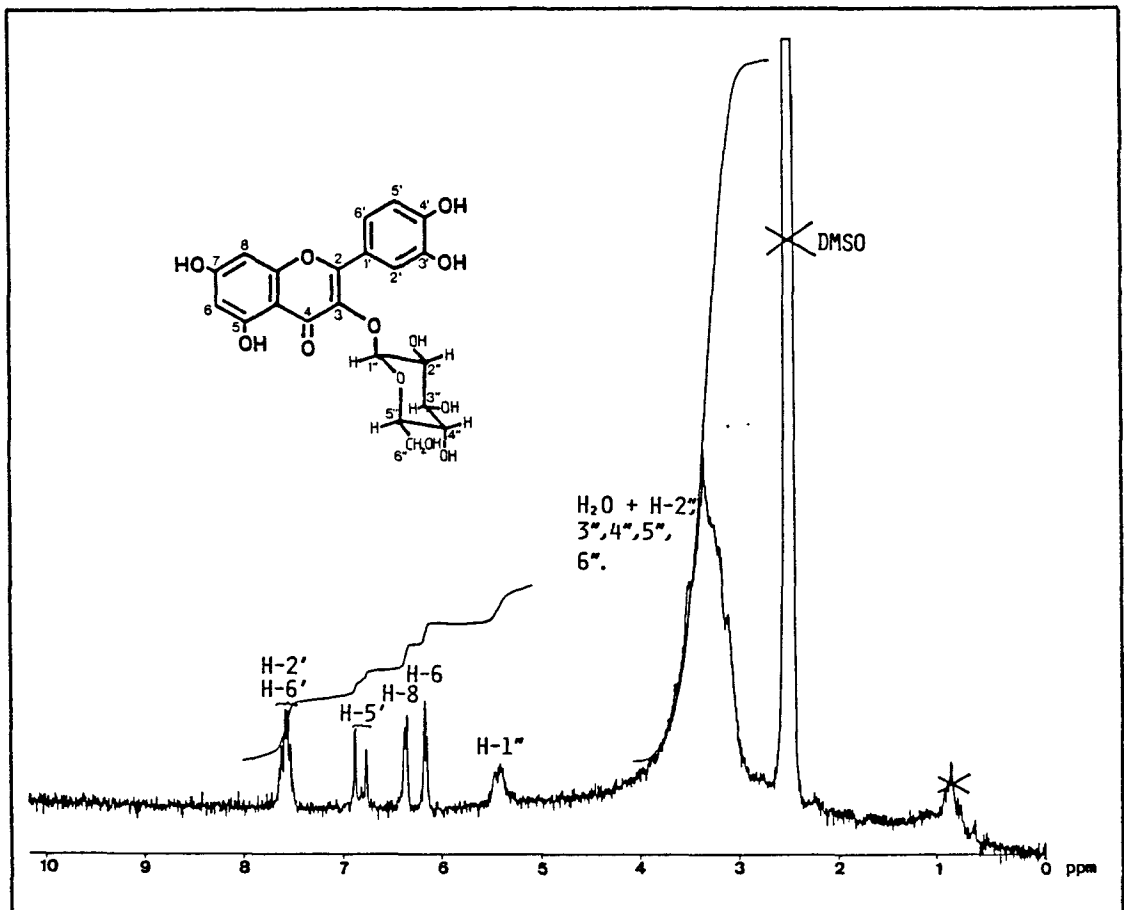


FIGURA V-45: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) del compuesto L.

#### V.5.14.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA M.

El compuesto M ha sido aislado del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tablas V-2 (heterósido) y V-3 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figura V-46 (heterósido) y V-47 (aglicón).
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-43.

El aglicón liberado por la hidrólisis de la sustancia M es la luteolina, lo cual se deduce tanto de sus características cromatográficas como espectroscópicas UV-visible.

El análisis de M por espectroscopía UV-visible revela que lleva una sola cadena glucosídica unida al hidroxilo de la posición 4'.

El espectro  $^1\text{H-NMR}$  confirma la situación de la cadena osídica en 4' y una estructura tipo luteolina para el aglicón. El multiplete situado entre 4,7 y 5,1 ppm integra 2 protones, correspondientes a dos protones H-1 de sendos monosacáridos, lo cual indica que la sustancia M es un 4'-diglicósido de la luteolina.

Después de la hidrólisis de M durante 2 h con HCl 2N aq., no se detecta ningún azúcar. A partir de este hecho y de su alto Rf en capa fina de celulosa eluida con  $\text{H}_2\text{O}$ , se induce que probablemente se trate de un glucurónido. Para comprobarlo, se practica una hidrólisis parcial (60 min a reflujo con HCl 2N aq. y MeOH a partes iguales), lo que proporciona ácido glucurónico (identificado por HPTLC), un solo heterósido intermediario (M') y una pequeña cantidad del aglicón.

M' se purifica por una columna de Sephadex LH-20 eluyendo con MeOH. Su espectro UV-visible es idéntico al de M y su hidrólisis (60 min a reflujo con HCl 2N aq.) proporciona luteolia y ácido glucurónico (identificado por HPTLC). Por tanto, M' es la 4'-O-glucuronil-luteolina.

De lo expuesto se deduce finalmente que M es la 4'-O-diglucuronil-luteolina.

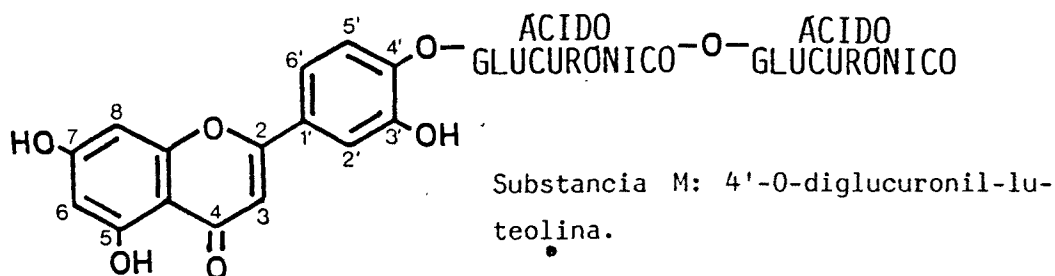
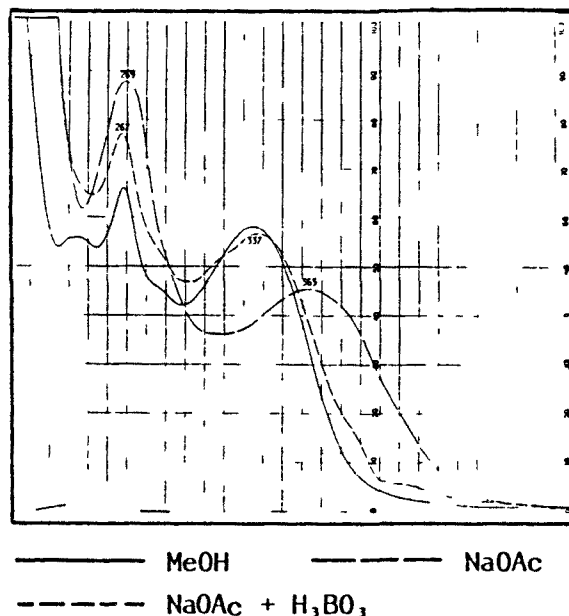
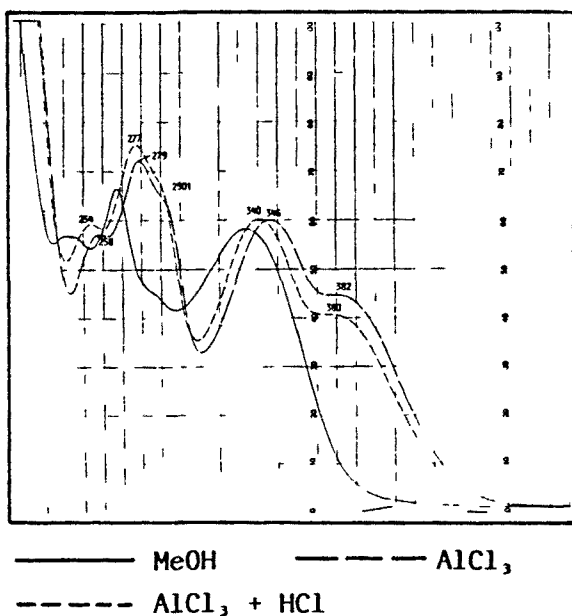
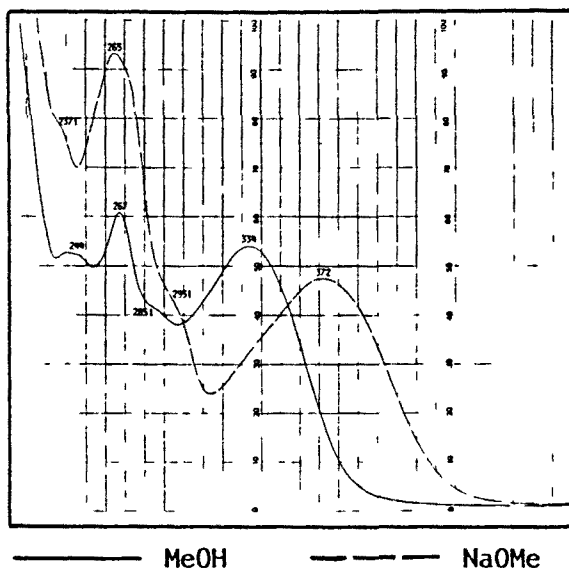
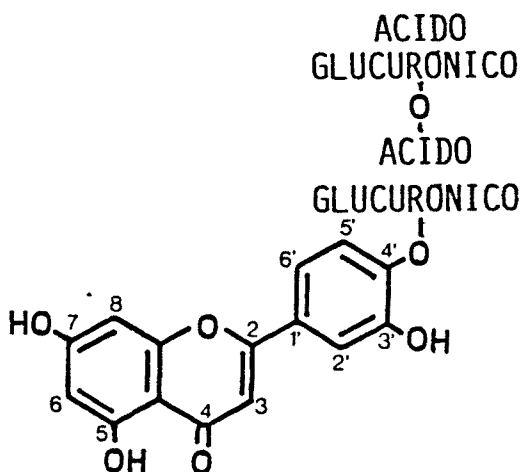




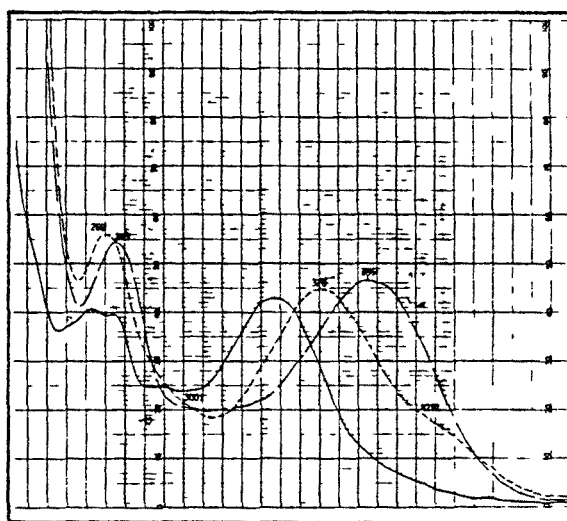
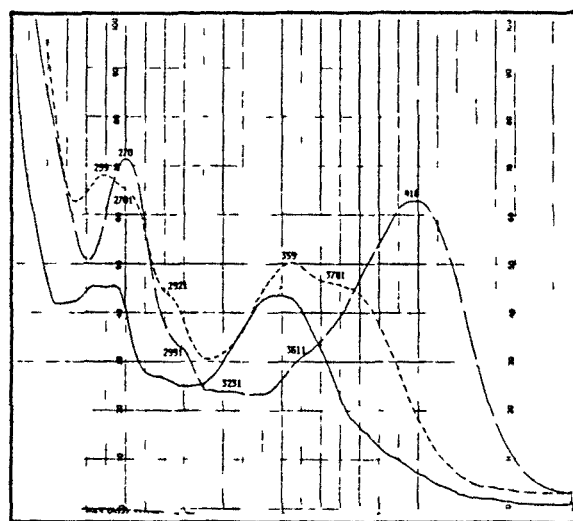
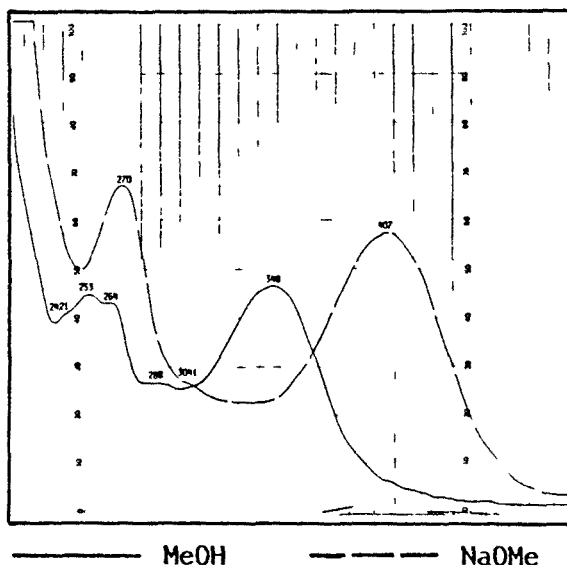
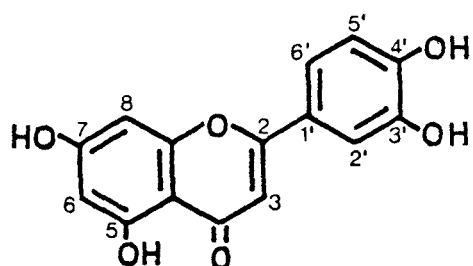
FIGURA V-46: Espectros UV-visible de la substancia M.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	244	267	285i	334	
NaOMe:	237i	265	295i	372	
AlCl <sub>3</sub> :	258	279	290i	346	382
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	254	277	290i	340	380
NaOAc:	269	363			
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	267	337			

FIGURA V-47: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia M.



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>  
 - - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl

———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	242i	253	264	288	348
NaOMe:	270	304i	407		
AlCl <sub>3</sub> :	270	299i	323i	361i	418
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	259	270i	292i	355	378i
NaOAc:	265	395			
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	260	300i	370	428i	

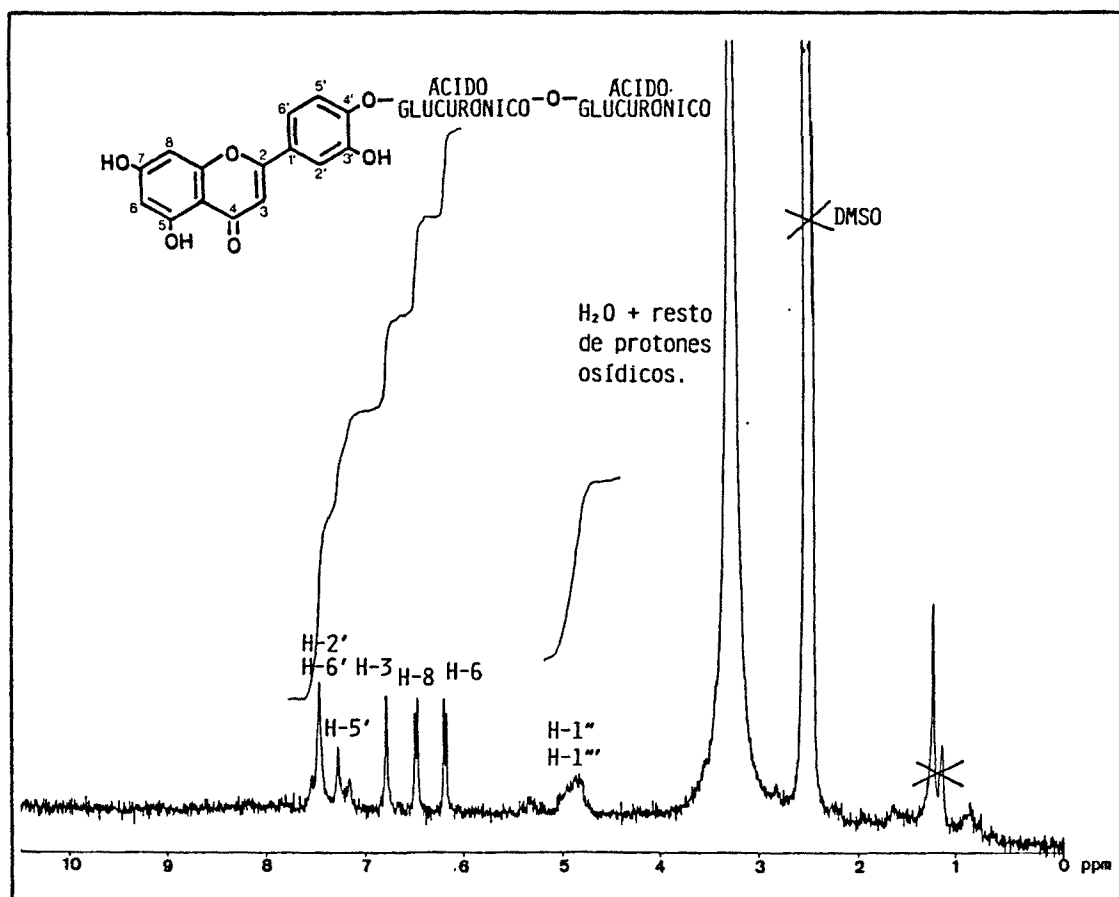


FIGURA V-48: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia M.

### V.5.15.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA N.

Este compuesto ha sido aislado del extracto metanólico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tablas V-2 (heterósido) y V-3 (aglicón)
- Espectroscopía UV-visible: figuras V-49 (heterósido) y V-50 (aglicón).
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura V-51.

La hidrólisis de la sustancia N proporciona luteolina (identificada cromatográficamente y por espectroscopía UV-visible) y dos monosacáridos, glucosa y ramnosa (identificados por HPTLC).

El estudio por espectroscopía UV-visible de N revela la existencia de una sola cadena osídica, unida al hidroxilo de la posición 7.

En el  $^1\text{H-NMR}$  se aprecian dos señales de H-1 osídico que integran un protón cada una, lo cual permite afirmar que N es un diglicósido. El H-1 de la glucosa aparece como doblete deformado con una J de aproximadamente 7 Hz (unión  $\beta$ ), entre 4,9 y 5,1 ppm.

El H-1 de la ramnosa se presenta como doblete a 4,5 ppm con una J de unos 2 Hz, característica de su unión  $\alpha$ . El metilo de la ramnosa aparece a algo más de 1 ppm, parcialmente sobrepuesto a señales debidas a impurezas de la muestra.

El azúcar unido directamente al aglicón es la glucosa, ya que su H-1 aparece a campos más bajos que el de la ramnosa. Finalmente, la situación de las señales de estos protones en el espectro  $^1\text{H-NMR}$  es característica de ramnoglicósidos con unión 1-6, correspondiente al rutinósido.

Todo lo expuesto permite concluir que la sustancia N es la 7-O-(6-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosil)-luteolina o luteolina-7-rutinósido.

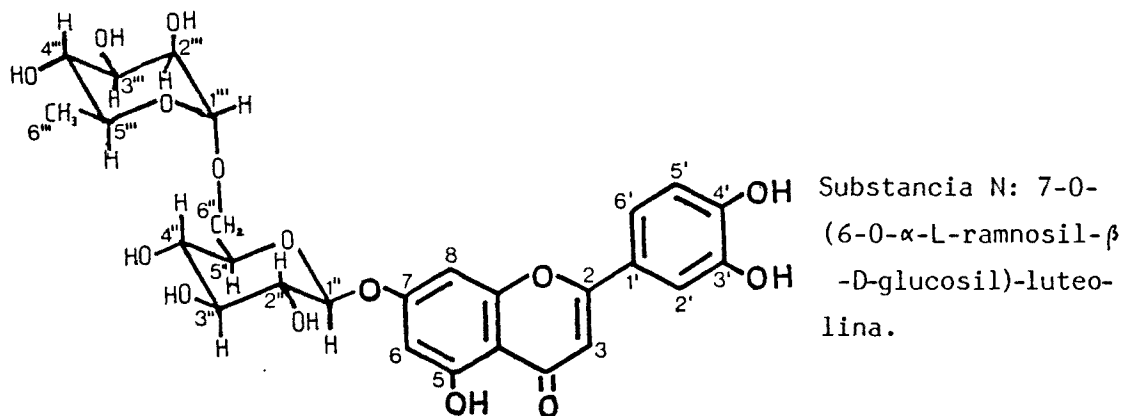
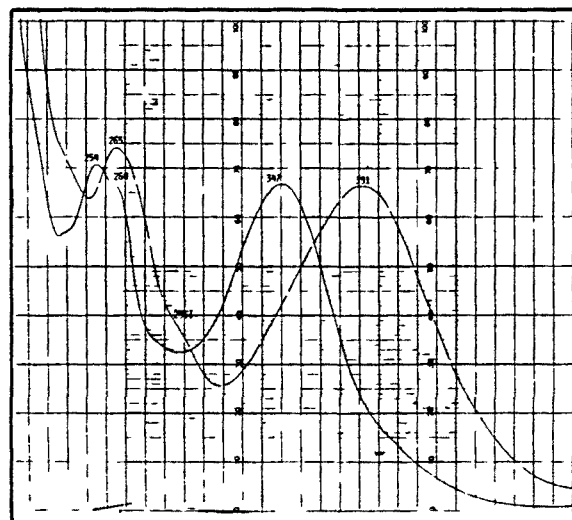
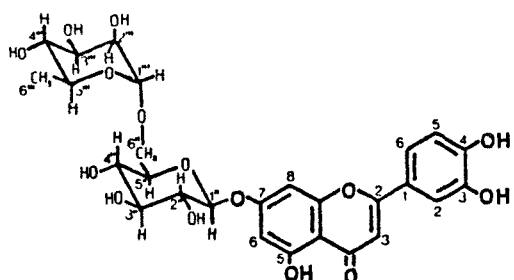
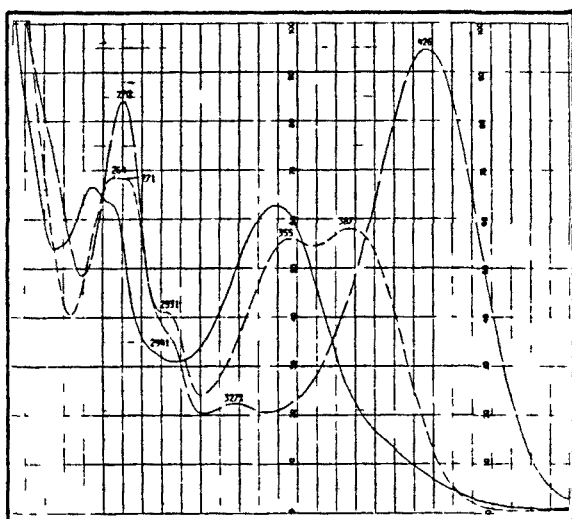


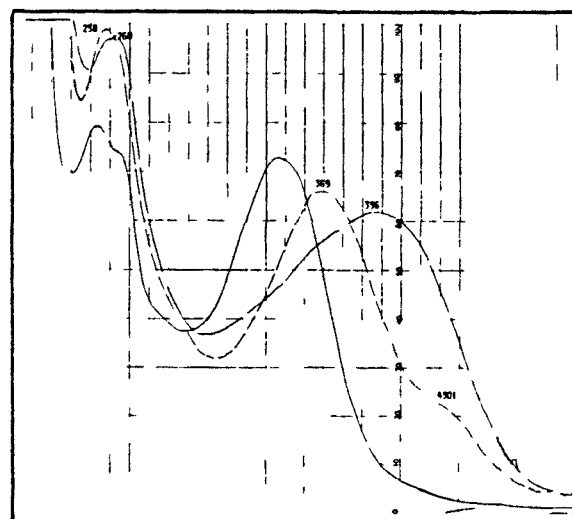
FIGURA V-49: Espectros UV-visible de la substancia N.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl

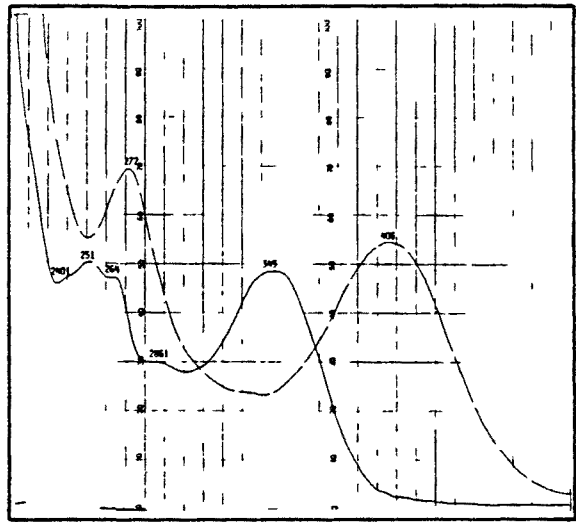
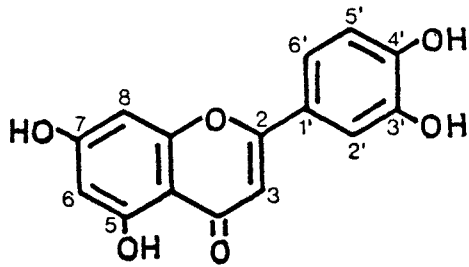


———— MeOH      - - - - NaOAc  
- - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

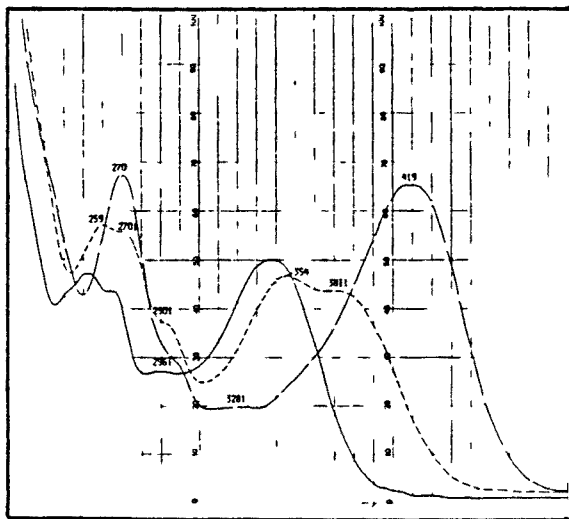
Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	254	264	347	
NaOMe:	265	295i	391	
AlCl <sub>3</sub> :	270	294i	327i	426
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	264	271	293i	355    387
NaOAc:	260	396		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	258	369	430i	

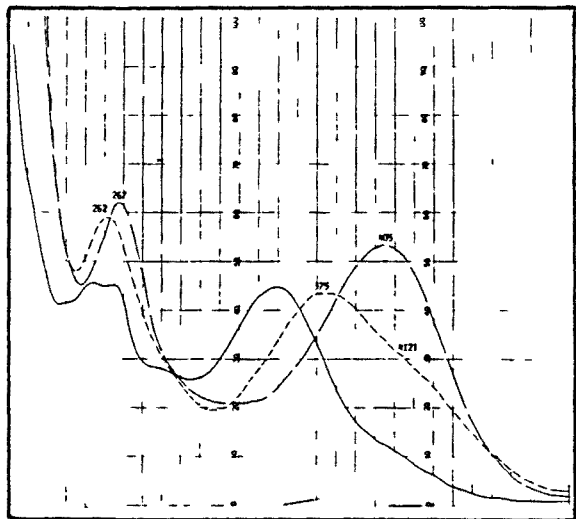
FIGURA V-50: Espectros UV-visible del aglicón de la sustancia N.



————— MeOH      - - - - - NaOMe



————— MeOH      - - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- · - · - AlCl<sub>3</sub>, + HCl



————— MeOH      - - - - - NaOAc  
- - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	251	264	286i	345
NaOMe:	272	406			
AlCl <sub>3</sub> :	270	296i	328i	419	
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	259	270i	290i	354	381i
NaOAc:	267	405			
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	262	375	412i		

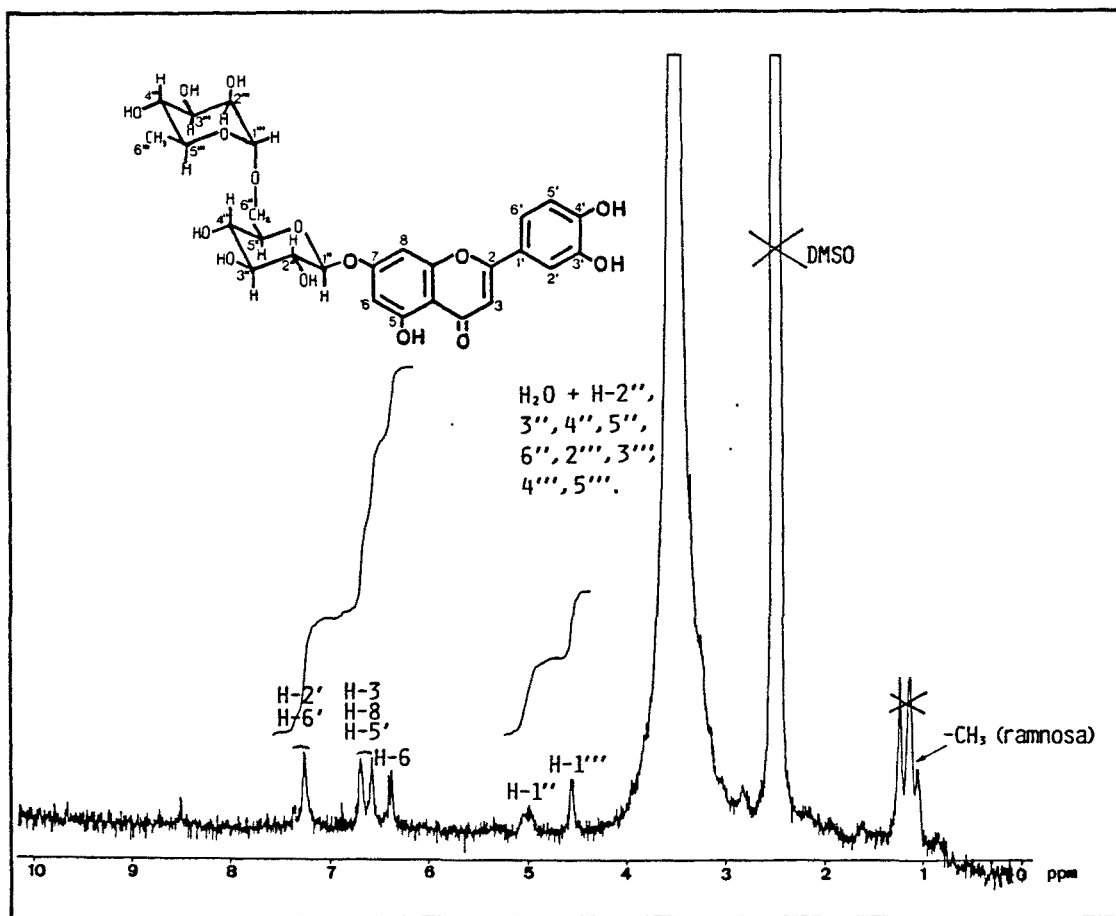


FIGURA V-51: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) de la substancia N.

Capítulo VI:

INVESTIGACION DE SALVIA CAN-  
DELABRUM BOISS.

1. *Extracción.*
2. *Investigación del extracto clo-  
rofórmico.*
3. *Investigación del extracto eté-  
reo.*
4. *Investigación del extracto "ace-  
tato de etilo + butanol".*
5. *Determinación estructural de las  
substancias aisladas.*





### VI.1.- EXTRACCIÓN.

El material utilizado han sido las hojas desecadas de *Salvia candelabrum* Boiss. (muestra nº19 de la tabla III-1), recolectada en junio de 1980 en la subida al Puerto de Albuñol (Granada). Un ejemplar testigo se halla depositado en el herbario BCF (pliego nº 32.591).

La extracción se ha efectuado mediante disolventes de polaridad creciente a partir de 194 g de material, tal como se ilustra en la figura VI-1. El rendimiento ha sido el siguiente:

Extracto "éter de petróleo" .....	11,11 g
Extracto clorofórmico .....	22,36 g
Extracto etéreo .....	2,10 g
Extracto "acetato de etilo + butanol" ...	16,40 g

El análisis por cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos ha dirigido la investigación hacia el aislamiento de las sustancias de los extractos clorofórmico, etéreo y "acetato de etilo + butanol", en la forma que se expone en los apartados que siguen.

### VI.2.- INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO.

Los 22,36 g de este extracto se someten primeramente a un desclorofilado parcial mediante cinco extracciones sucesivas con 100 ml de MeOH cada vez, en frío y con agitación. La fracción del extracto clorofórmico soluble en MeOH fué de 10 g. El marco se desechó una vez comprobada en él la ausencia de flavonoides.

Los 10 g de extracto soluble en MeOH se fraccionan en una columna de poliamida CC6 eluyendo con la siguiente serie de disolventes de polaridad creciente:

Hexano:CHCl<sub>3</sub> (99:1) a CHCl<sub>3</sub>.

CHCl<sub>3</sub>:MeCOEt (9:1).

CHCl<sub>3</sub>:MeOH:MeCOEt:Me<sub>2</sub>CO (40:5:5:1 a 40:20:5:1 a 10:20:5:1).

MeOH:MeCOEt:Me<sub>2</sub>CO (40:5:1 a 40:5:10).

Se obtienen 18 fracciones, cuya purificación por cromatografía en columna de silicagel y Sephadex LH-20, y cromatografía en papel Whatman 3 (ver fig. VI-2), proporciona tres sustancias.

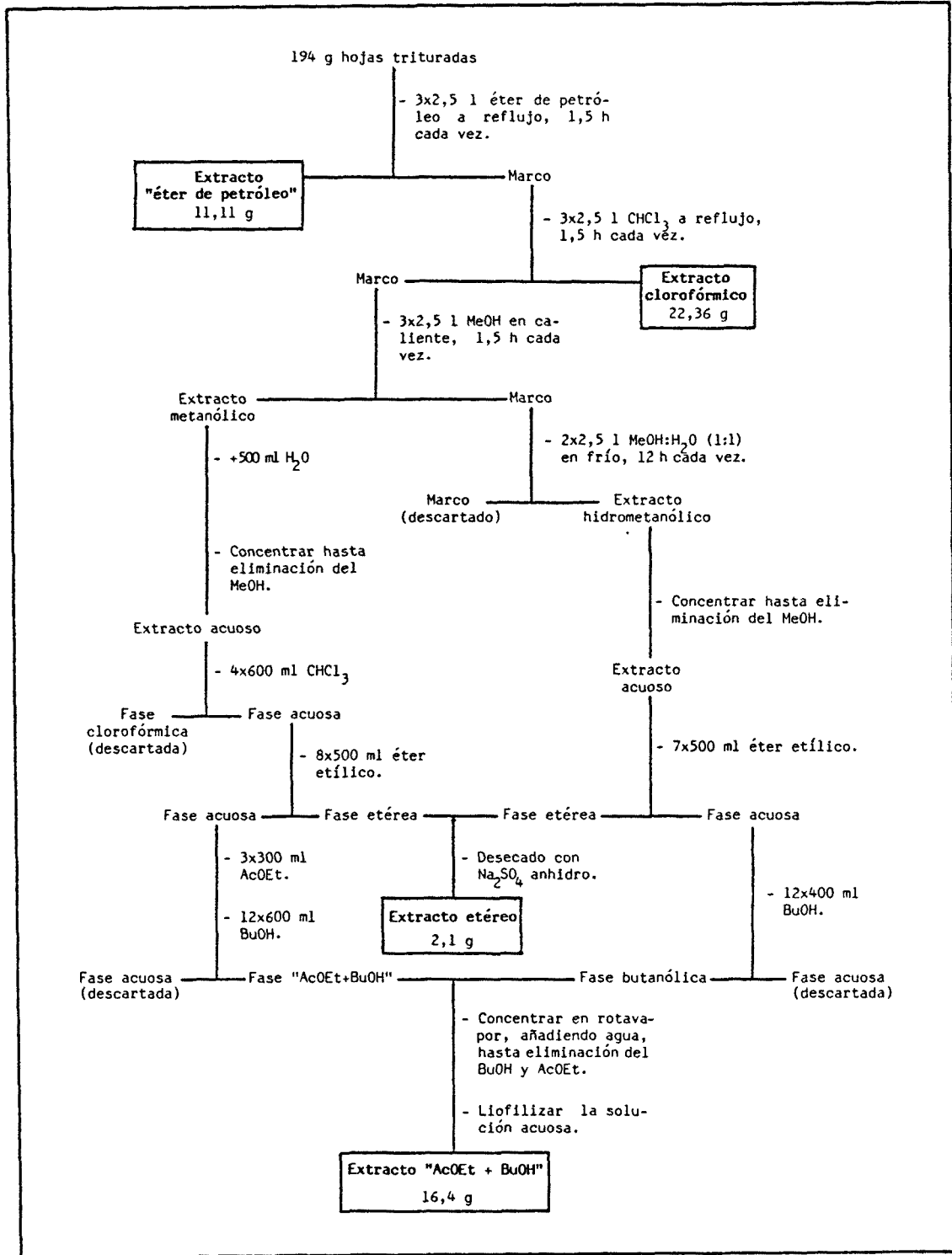


FIGURA VI-1: Pauta de extracción seguida para las hojas de *Salvia candelabrum* Boiss.

Las sustancias aisladas del extracto clorofórmico se identifican posteriormente como sigue:

Substancia B (3 mg): 7-O-Me-luteolina

Substancia E (5 mg): Genkwanina

Substancia F (140 mg): 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trien-3,7-diona.

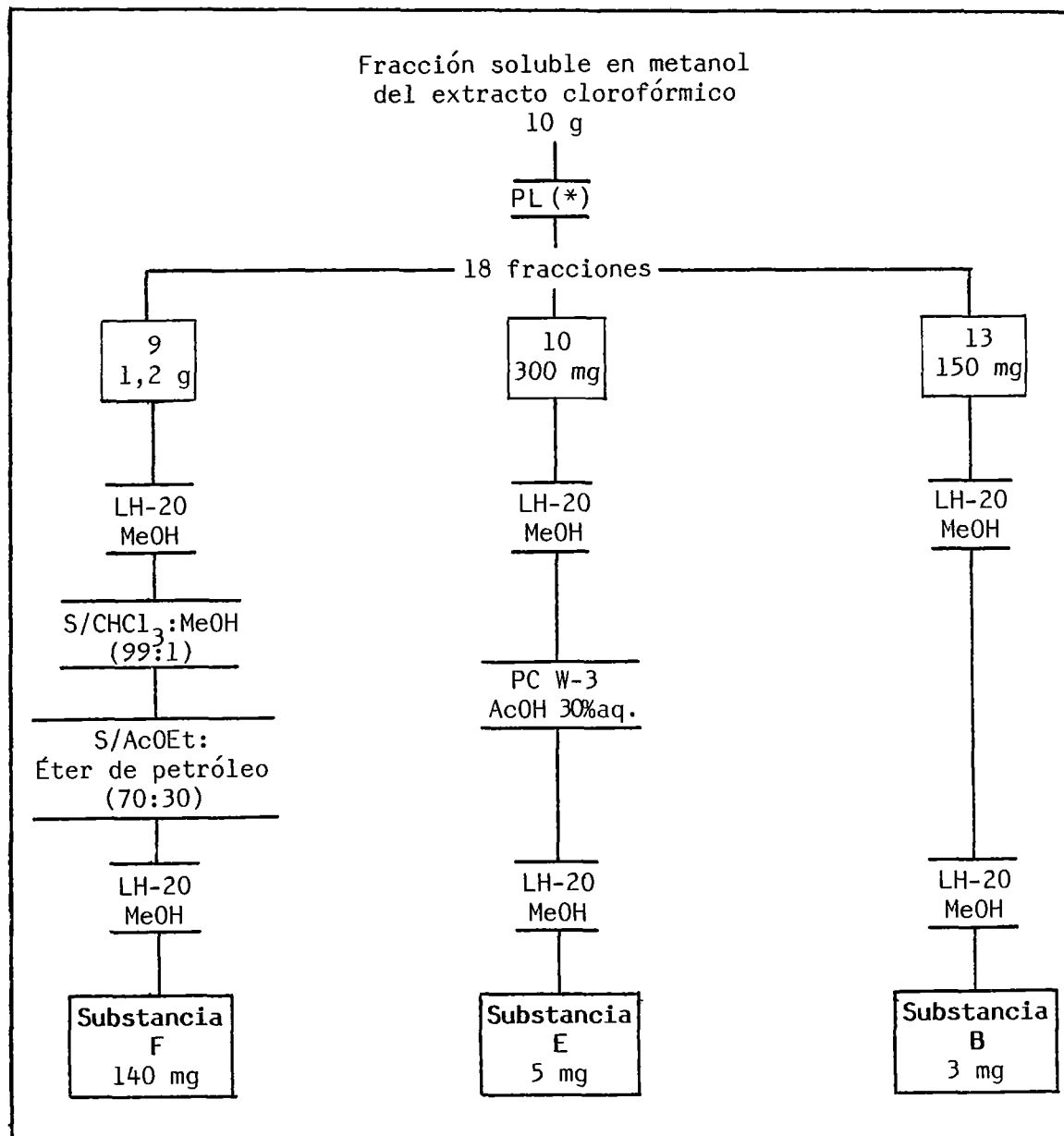


FIGURA VI-2: Aislamiento de las sustancias B,E y F, a partir del extracto clorofórmico de las hojas de *Salvia candelabrum* Boiss. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PC W-3: cromatografía en papel Whatman 3. PL: columna de poliamida. S: columna de silicagel. (\*): Para elución, ver texto.

### VI.3.- INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO ETÉREO.

El extracto etéreo (2,1 g) se fracciona en una columna de poliamida CC6 utilizando la serie de eluyentes siguiente:

$\text{CHCl}_3:\text{MeCOEt}:\text{Me}_2\text{CO}$  (40:5:1)

$\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{MeCOEt}:\text{Me}_2\text{CO}$  (40:5:5:1 a 40:20:5:1)

$\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{MeCOEt}:\text{Me}_2\text{CO}$  (35:20:5:1)

Se obtienen ocho fracciones, cuyas sustancias se purifican por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y cromatografía en papel Whatman 3, siguiendo el esquema de la figura VI-3.

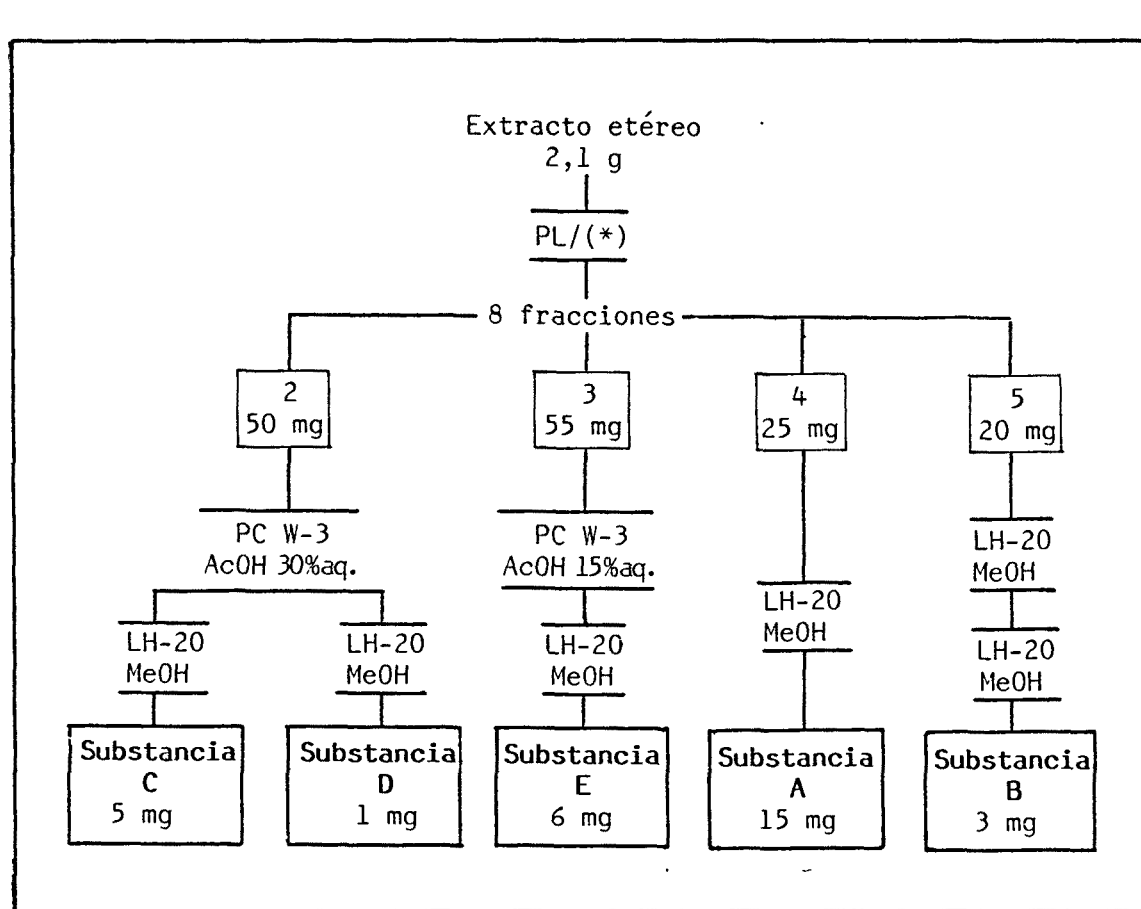


FIGURA VI-3: Esquema del aislamiento de las sustancias A, B, C, D y E a partir del extracto etéreo de las hojas de *Salvia candellabrum* Boiss. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PC W-3: cromatografía en papel Whatman 3. PL: columna de poliamida. (\*): Para elución, ver texto.

De esta forma, se aislan del extracto etéreo cinco sustancias, más tarde identificadas como sigue:

- Substancia A (15 mg): Luteolina
- Substancia B (3 mg): 7-0-Me-luteolina
- Substancia C (5 mg): Apigenina
- Substancia D (<1 mg): 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7,3'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona (?)
- Substancia E (6 mg): Genkwanina

#### VI.4.- INVESTIGACIÓN DEL EXTRACTO "ACETATO DE ETILO + BUTANOL".

Para el aislamiento de las sustancias de este extracto, 15,2 g del mismo se fraccionan en una columna de poliamida CC6 con mezclas hidrometanólicas de concentración alcohólica creciente. Se obtienen doce fracciones, que previa purificación por cromatografía en columna de Sephadex LH-20 y silicagel y cromatografía en papel Whatman 3 proporcionan tres sustancias que, una vez identificadas, resultaron ser las siguientes:

- Substancia G (13 mg): 7-0-β-D-glucosil-luteolina
- Substancia H (20 mg): 7-0-diglucuronil-luteolina
- Substancia I (17 mg): 7-0-(glucosil-glucuronil)-apigenina

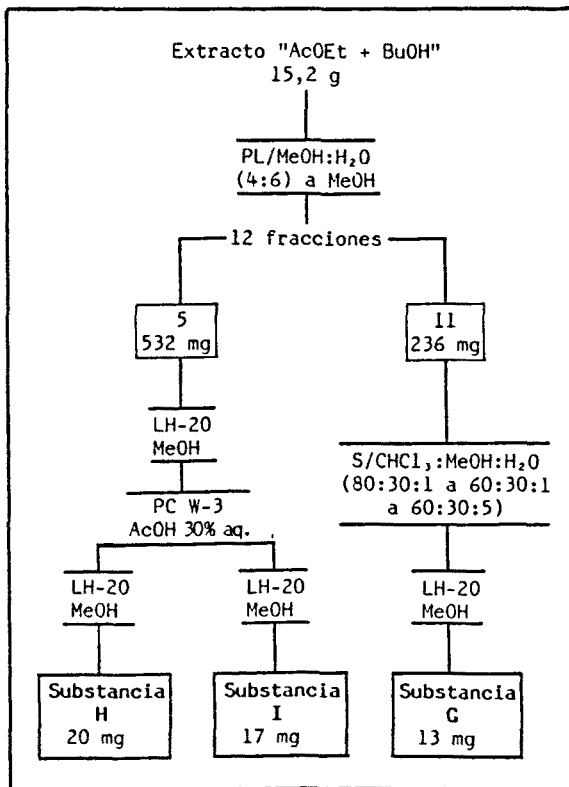


FIGURA VI-4: Aislamiento de las sustancias G, H e I a partir del extracto "AcOEt+BuOH" de las hojas de *Salvia candelabrum* Boiss. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PL: columna de poliamida CC6. S: columna de silicagel.

**VI.5.- DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SUBSTANCIAS AISLADAS.**

**VI.5.1.- COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO.**

En las tablas VI-1 (aglicones flavónicos y sustancia F), VI-2 (heterósidos flavónicos) y VI-3 (aglicones liberados en la hidrólisis de los heterósidos con HCl 2N, 120 min a 100°C) se resumen las características de revelado y Rf de las sustancias aisladas de las hojas de *Salvia candelabrum*.

Las abreviaturas utilizadas para el revelado, son las siguientes:

A = Amarillo                      AV = Amarillo verdoso              N = Naranja  
 AO = Amarillo oscuro              VO = Violáceo oscuro

Y para los sistemas cromatográficos:

CL-1 = TLC celulosa/AcOH 50%aq.      CL-2 = TLC celulosa/AcOH 50%aq.  
 CL-3 = TLC celulosa/H<sub>2</sub>O  
 PC-1 = Cromatografía en papel Whatman 1/AcOH 50%aq.  
 PC-2 = Cromatografía en papel Whatman 1/AcOH 30%aq.  
 S-2 = TLC silicagel/Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)  
 S-4 = TLC silicagel/AcOEt:MeCOEt:AcOH:H<sub>2</sub>O (5:3:1:1)  
 S-5 = TLC silicagel/CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (65:45:12)  
 S-6 = TLC silicagel/Tolueno:MeOH:AcOH (40:3:2)  
 S-7 = TLC silicagel/Hexano:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (40:40:3)

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100					
	UV366nm	NH <sub>3</sub> <sup>UV</sup> 366nm	AlCl <sub>3</sub> <sup>UV</sup> 366nm	NEU <sup>UV</sup> 366nm	PC-1	PC-2	CL-1	CL-2	S-6	S-7
A	VO	A	A	N	47	20	48	22	5	0
Lut.	VO	A	A	N	46	19	48	21	5	0
B	VO	A	A	N	52	21	60	24	29	7
C	VO	AO	A	AV	60	30	64	30	10	4
Api.	VO	AO	A	AV	60	30	65	30	10	4
D	VO	-	A	-	-	-	-	36	-	-
E	VO	A	A	A	68	34	72	39	34	46
F	A	N	N	AV	88	82	86	59	31	31

**TABLA VI-1:** Características cromatográficas de los aglicones flavónicos y la sustancia F aislados de *S. candelabrum*. Api.: apigenina. Lut.: luteolina. Para otras abreviaciones, ver texto.

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC			
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-2	CL-3	S-4	S-5
G	V0	A	A	N	35	25	42	50
7GLu.	V0	A	A	N	36	25	42	50
H	V0	A	A	N	38	35	17	25
I	V0	AV	A	AV	53	51	24	31

TABLA VI-2: Características cromatográficas de los heterósidos flavóni-  
cos aislados de *Salvia candelabrum*. 7GLu: 7-glucosil-luteoli-  
na. Para otras abreviaturas, ver texto.

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC			
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /366nm	AlCl <sub>3</sub> /366nm	NEU/366nm	CL-1	CL-2	S-2	S-3
G-A	V0	A	A	N	56	21	14	1
Lut.	V0	A	A	N	56	21	14	1
H-A	V0	A	A	N	56	21	14	1
I-A	V0	A0	A	AV	70	29	26	3
Api.	V0	A0	A	AV	70	28	26	3

TABLA VI-3: Características cromatográficas de los aglicones liberados  
por hidrólisis (HCl 2N, 120 min, 100°C) de los heterósidos  
aislados de *Salvia candelabrum*. La letra del heterósido se-  
guida de A indica el aglicón correspondiente. Api.: apigeni-  
na. Lut.: luteolina. Para otras abreviaturas, ver texto.



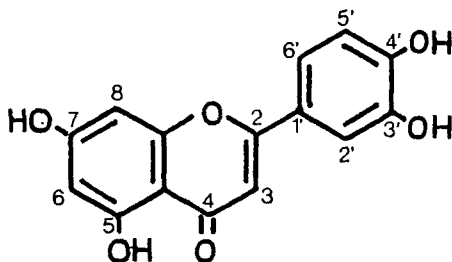
### VI.5.2.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA A.

El compuesto A ha sido aislado del extracto etéreo.

Datos analíticos:

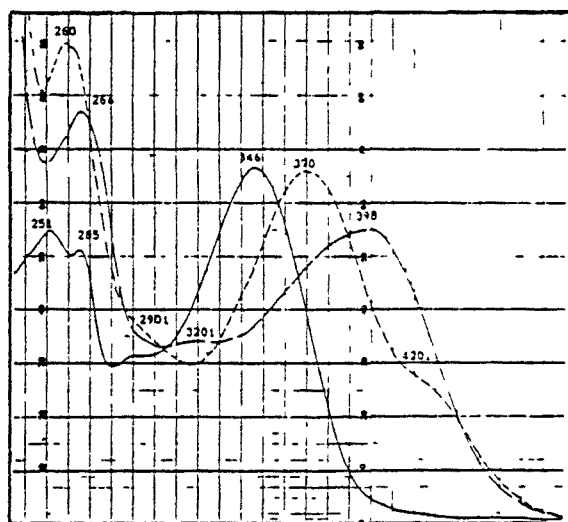
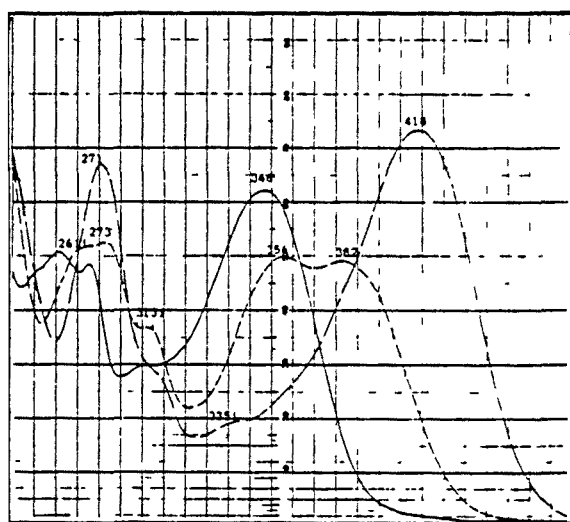
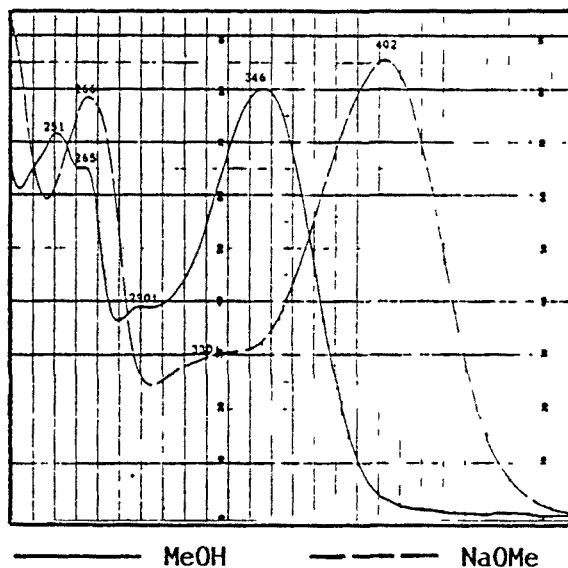
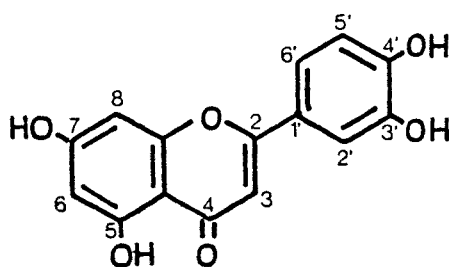
- Comportamiento cromatográfico: tabla VI-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura VI-5.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura VI-6.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura VI-7.

Su comportamiento cromatográfico, idéntico al de la luteolina, y el análisis espectroscópico indican que la estructura del compuesto A corresponde a la de este aglicón flavónico. La deducción se ha efectuado de forma similar a la de la sustancia H de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* expuesta en el apartado V.5.9., por lo que nos limitaremos aquí a dar los datos espectroscópicos.



Substancia A: 5,7,3',4'-(OH)<sub>4</sub>-flavona  
(luteolina).

FIGURA V-5: Espectros UV-visible de la substancia A.



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl

———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	251	265	290i	346	
NaOMe:	266	330i	402		
AlCl <sub>3</sub> :	271	300i	335i	418	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	261	273	313i	356	382
NaOAc:	266	320i	398		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	260	290i	370	420i	

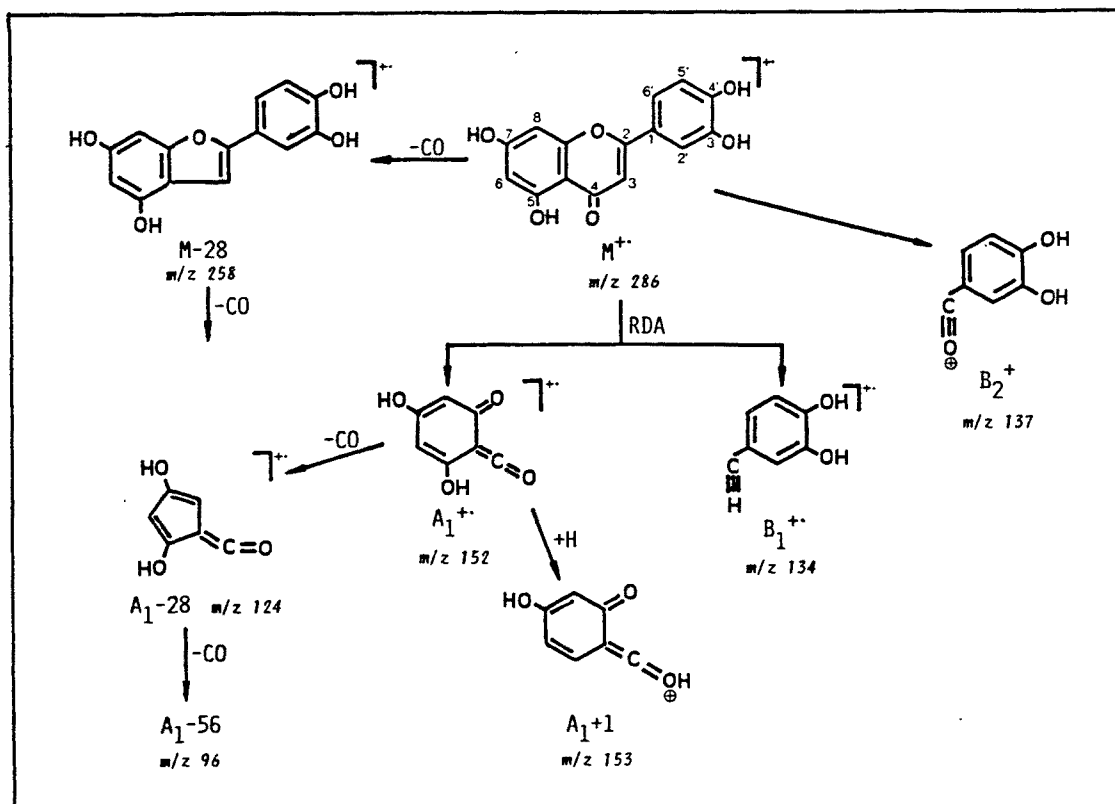
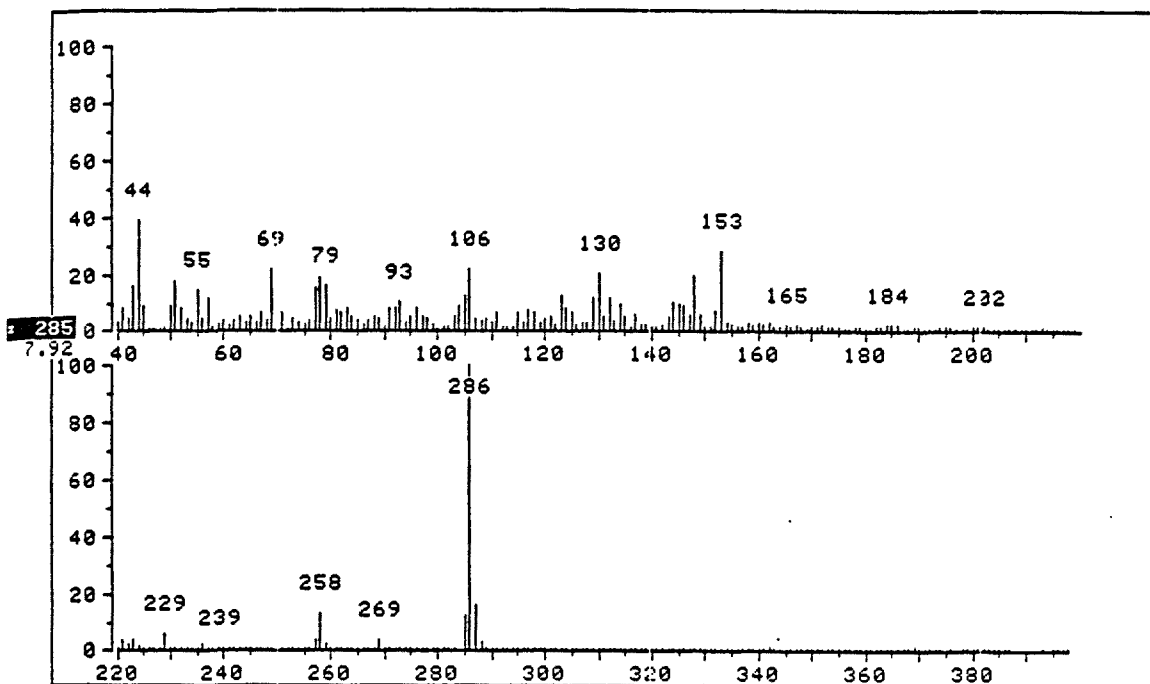


FIGURA VI-6: Espectro EI-MS y fraccionamiento del compuesto A.

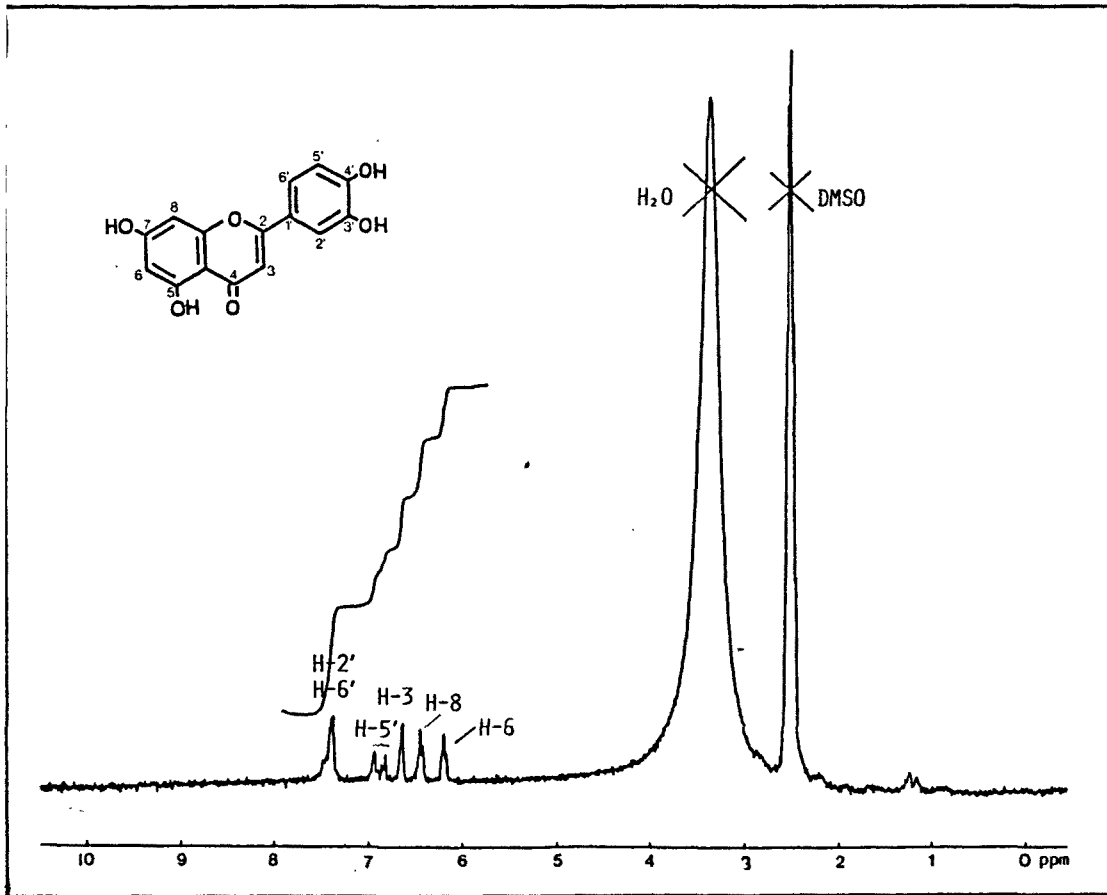


FIGURA VI-7: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia A.

### VI.5.3.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA B.

Esta sustancia ha sido aislada tanto del extracto clorofórmico como del etéreo.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla VI-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura VI-8.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura VI-9.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura VI-10.

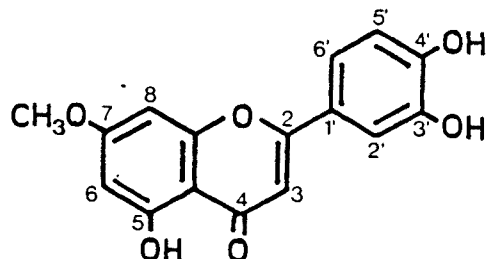
El comportamiento cromatográfico de B es el de una flavona más apolar que la luteolina y del mismo orden o algo más apolar que la apigenina.

El análisis por espectroscopía UV-visible permite deducir que se trata de una 5-OH-flavona, con el 7-OH substituido y con un grupo  $\text{o}-(\text{OH})_2$  en el anillo B. Se aprecia también la falta de substitución en 6 y 8.

El  $\text{M}^{+}$  a  $m/z = 300$  en el EI-MS responde a una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ , correspondiente a una trihidroximetoxiflavona. Los picos a  $m/z = 285$ , 271 y 257 (M-15, M-29 y M-43, respectivamente), característicos de flavonas metoxiladas, tienen baja intensidad, lo cual indica que el grupo -OMe no se encuentra en 6 ni en 8. Dado que los picos a  $m/z = 166$  y 167 ( $\text{A}_1^{+}$  y  $\text{A}_1+1$  respectivamente) demuestran que el grupo metoxilo se encuentra en el anillo A, y que por espectroscopía UV-visible se observa que el 5-OH está libre, el -OMe debe ocupar la posición 7.

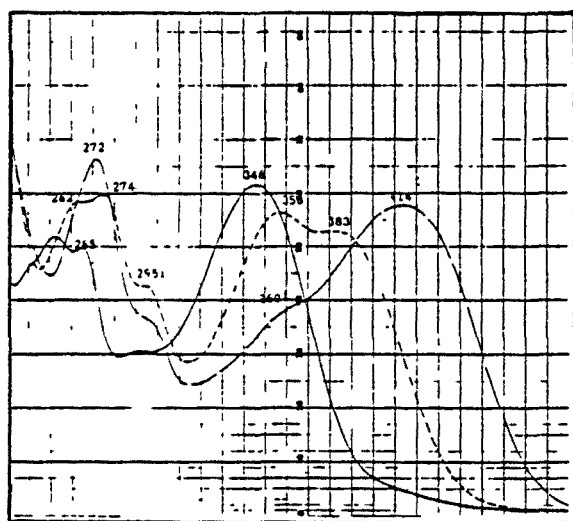
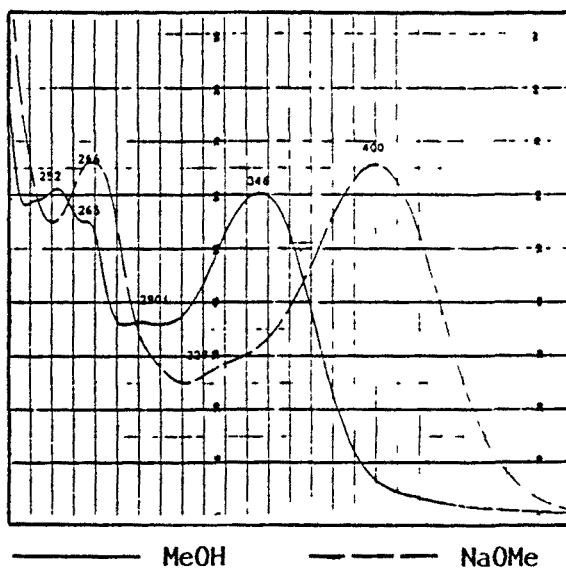
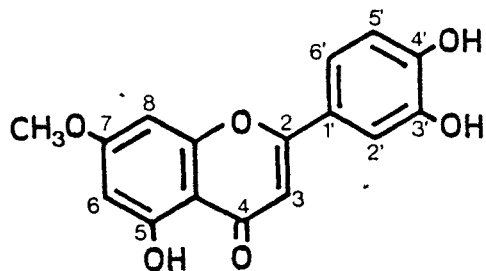
El anillo B debe contener dos hidroxilos, que gracias al  $^1\text{H-NMR}$  podemos situar en las posiciones 3' y 4'. En éste no se aprecia el metoxilo porque queda incluido en la señal debida al  $\text{H}_2\text{O}$  y al MeOH.

La estructura resultante es, pues, la de la 7-O-Me-luteolina o 5,3',4'-(OH) $_3$ -7-OMe-flavona.

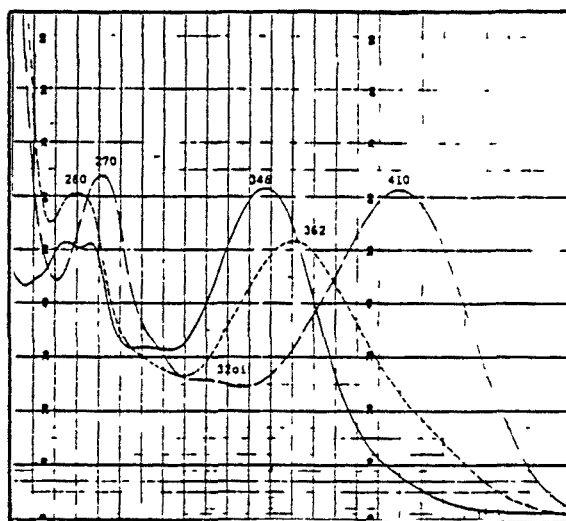


Substancia B: 5,3',4'-(OH) $_3$ -7-OMe-flavona (7-O-Me-luteolina).

FIGURA V-8: Espectros UV-visible de la substancia B.



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - · - · AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - · - · NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	252	265	290i	346
NaOMe:	266	327	400	
AlCl <sub>3</sub> :	272	295i	360i	414
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	262	274	295i	356    383
NaOAc:	270	320i	410	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	260	290i	362	

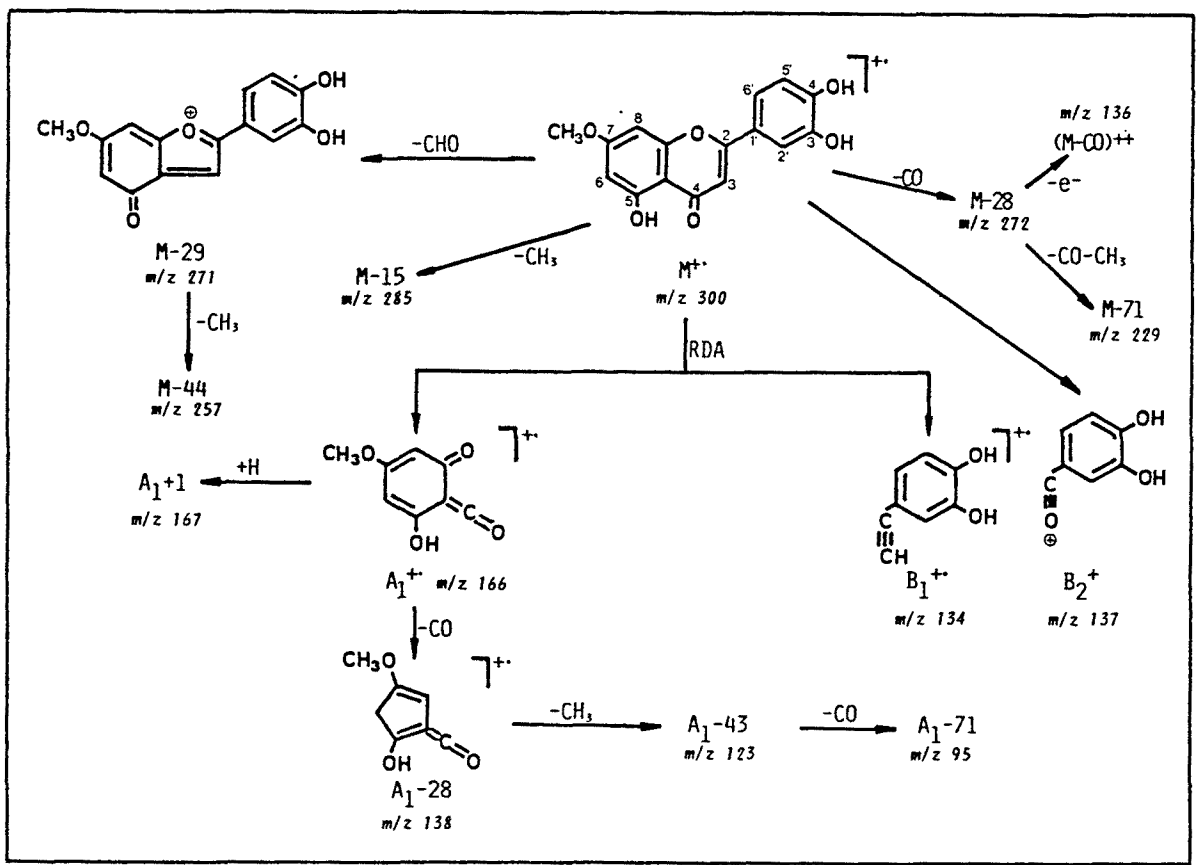
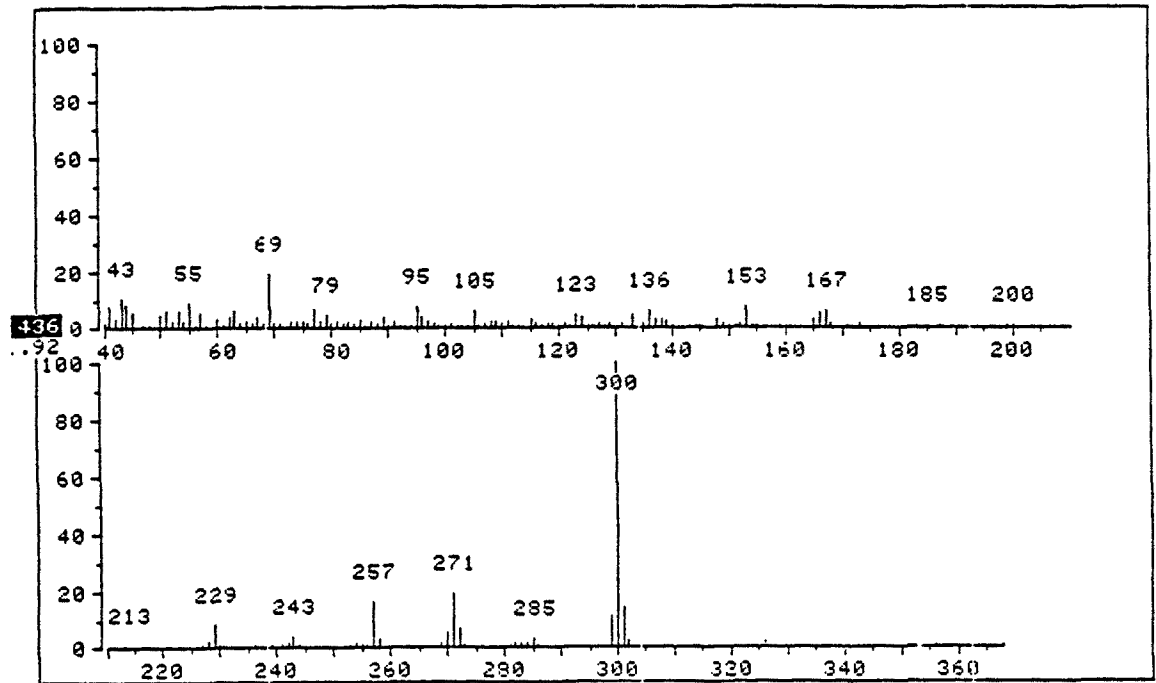


FIGURA VI-9: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia B.

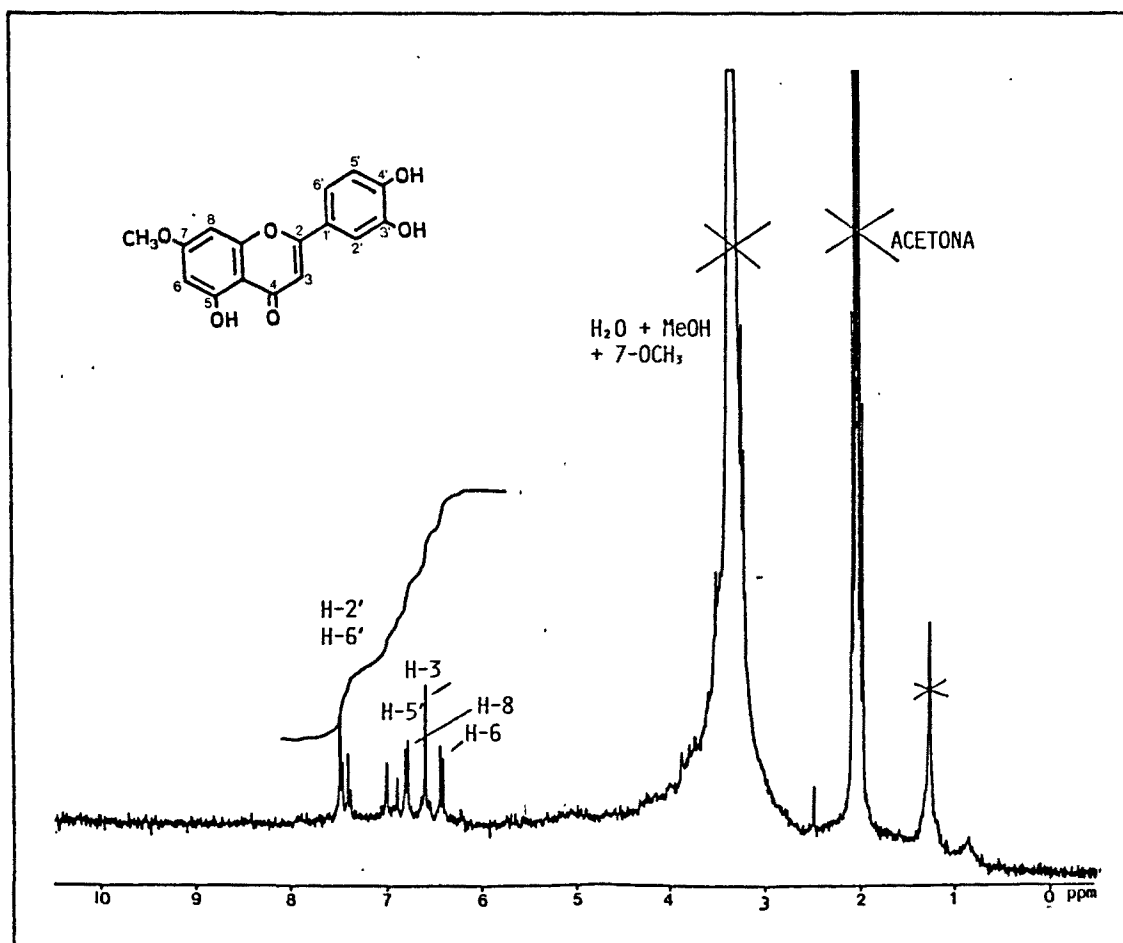


FIGURA VI-10: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  + acetona) de la sustancia B.



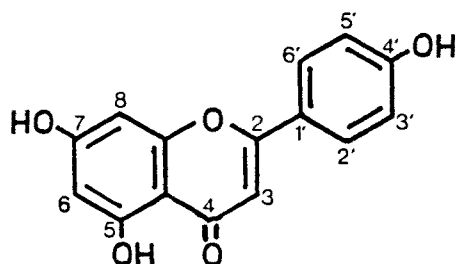
#### VI.5.4.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA C.

Este compuesto ha sido aislado del extracto etéreo.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla VI-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura VI-12.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura VI-13.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura VI-11.

De forma similar a como se ha explicado para la sustancia F de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*, se deduce que el compuesto C de *Salvia candelabrum*, por sus características cromatográficas y espectrales, es la apigenina o 5,7,4'-(OH) $_3$ -flavona.



Substancia C: 5,7,4'-(OH) $_3$ -flavona (apigenina)

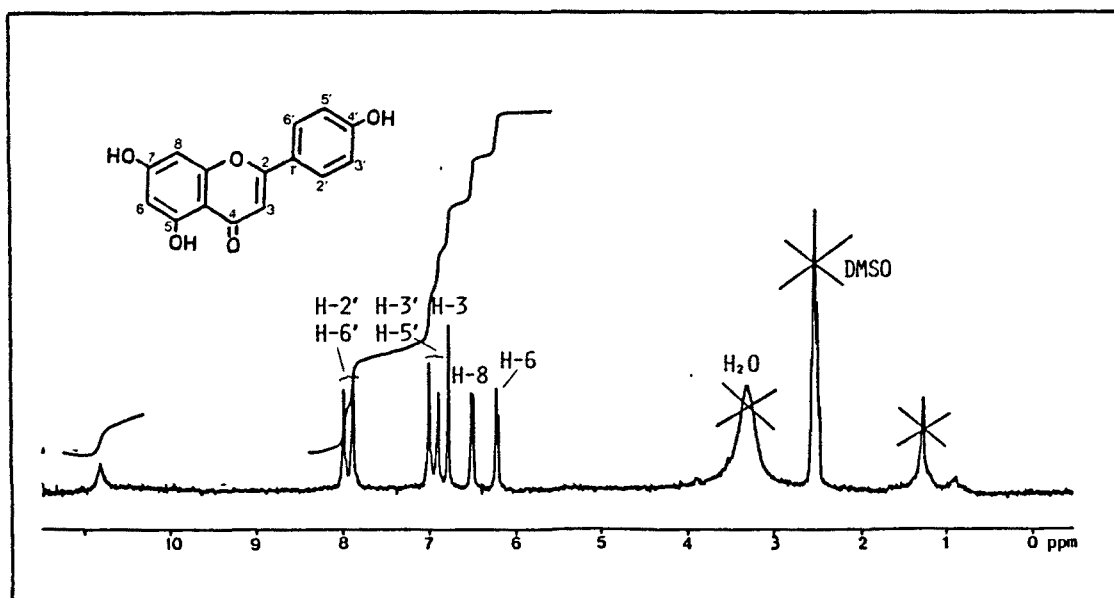
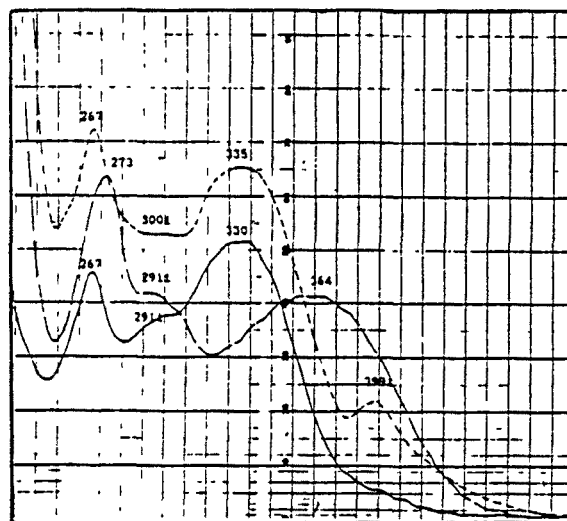
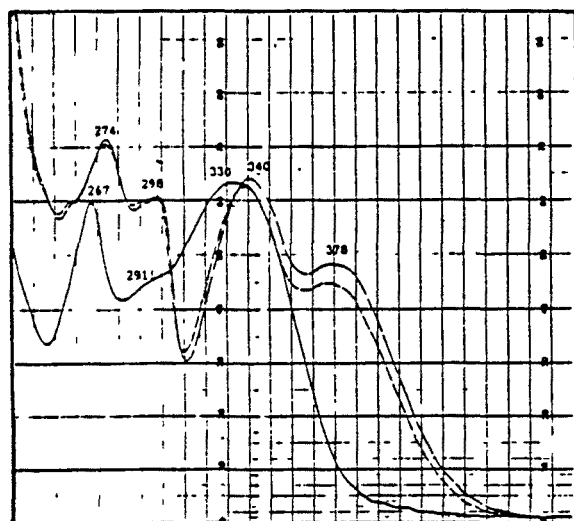
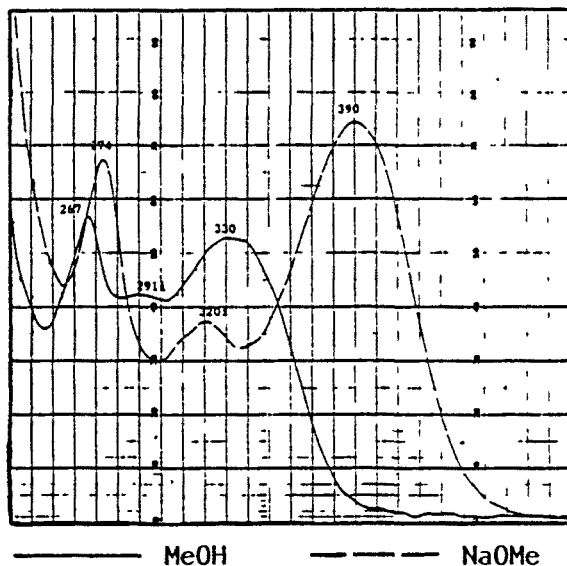
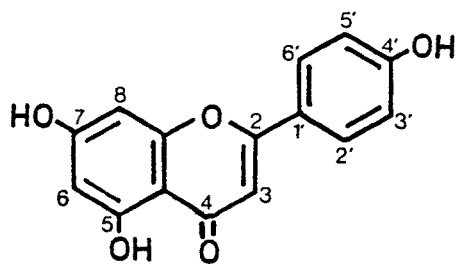


FIGURA VI-11: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6$ -DMSO) de la sustancia C.

FIGURA V-11: Espectros UV-visible de la sustancia C.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	267	291i	330	
NaOMe:	274	320i	390	
AlCl <sub>3</sub> :	274	298	340	378
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	274	297	339	377
NaOAc:	273	291i	364	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	267	300i	335	399i

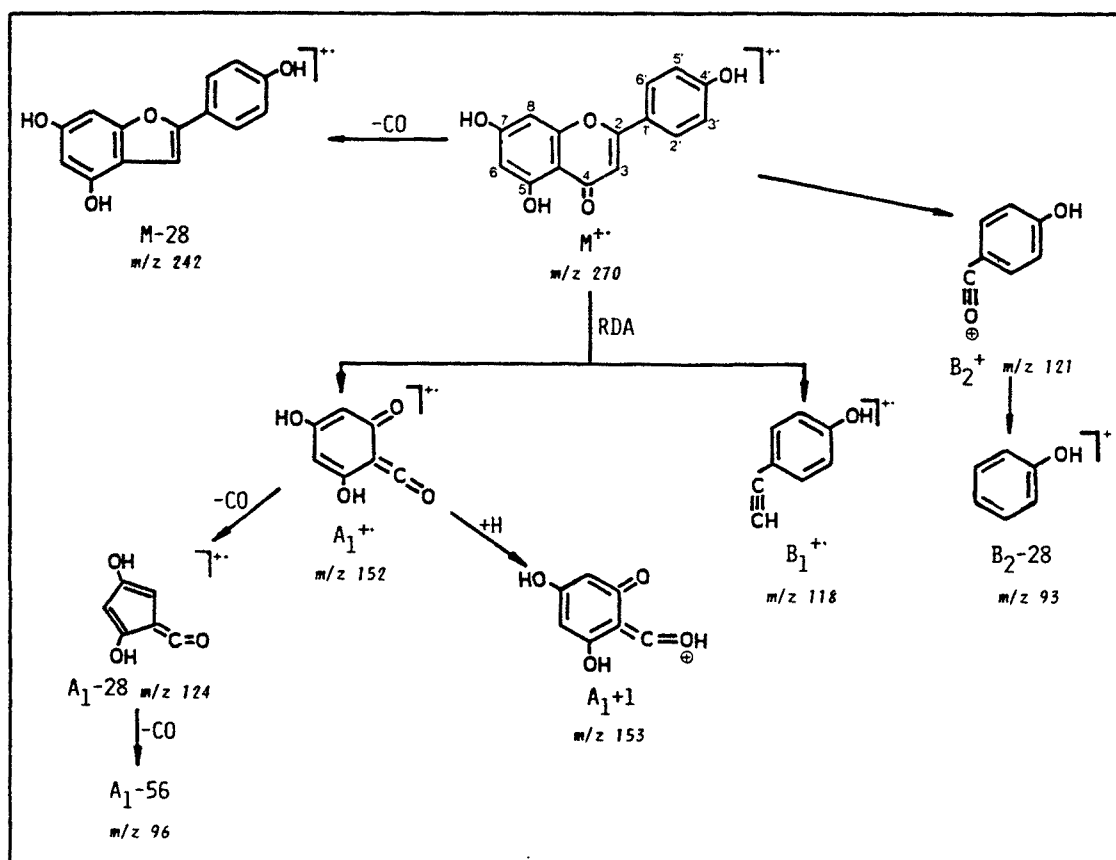
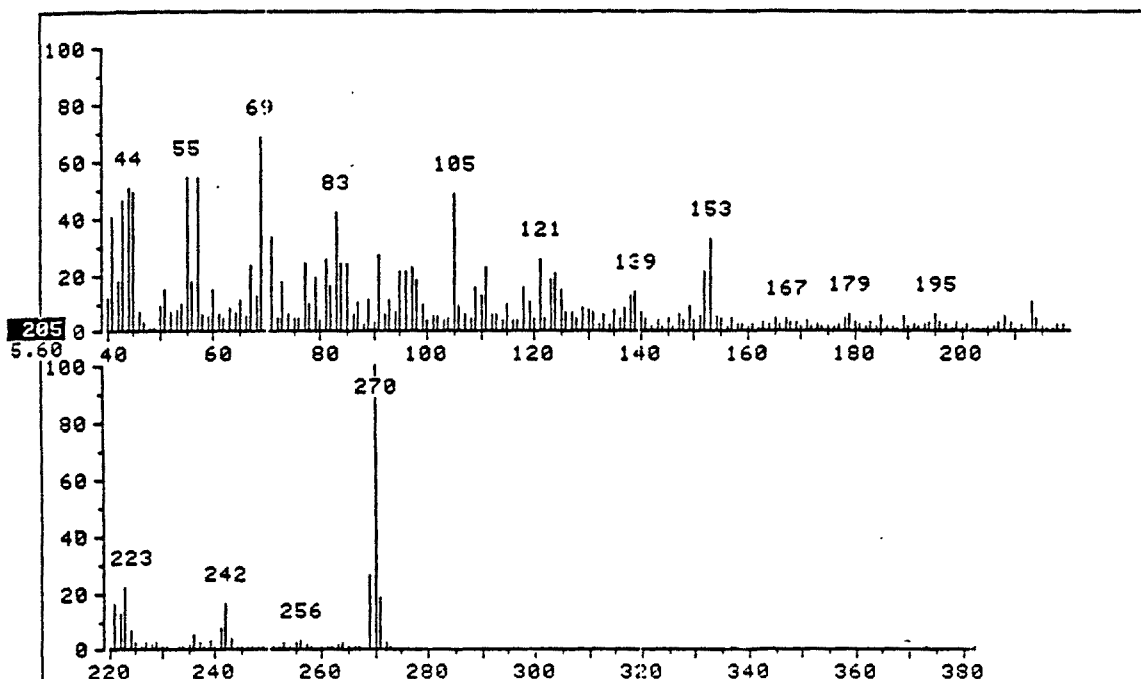


FIGURA VI-13: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia C.

### VI.5.5.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA D.

El compuesto D ha sido aislado a partir del extracto etéreo.

Datos analíticos:

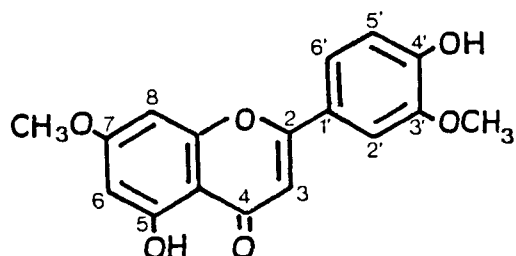
- Comportamiento cromatográfico: tabla VI-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura VI-14.

La sustancia D se comporta cromatográficamente como una flavona más apolar que la apigenina.

El análisis por espectroscopía UV-visible permite deducir las siguientes características estructurales:

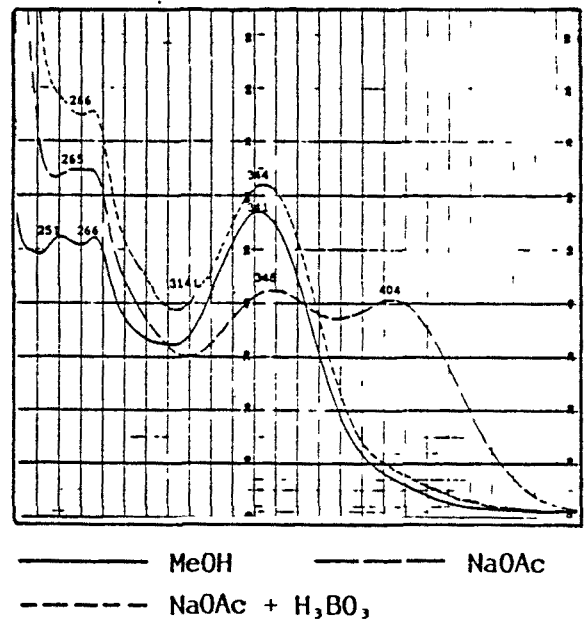
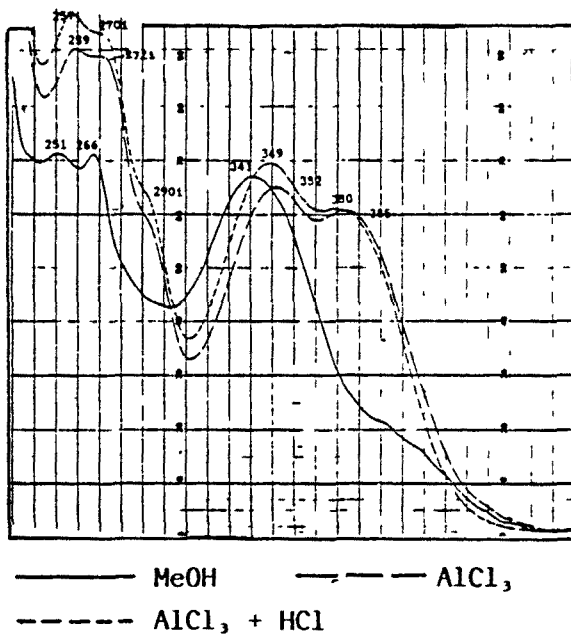
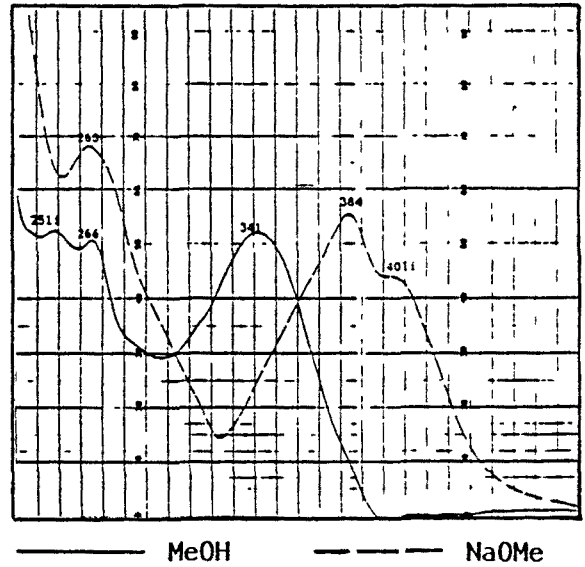
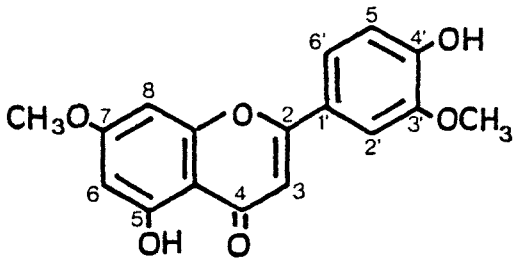
- 5-OH-flavona, ya que el espectro en  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  está constituido por cuatro bandas y el desplazamiento de la banda I en  $\text{AlCl}_3$  respecto al MeOH (39 nm) se conserva al añadir HCl.
- 4'-OH libre, por el desplazamiento de la banda I producido al añadir NaOMe a la solución metanólica de D.
- Anillo B disustituido (forma de la banda II en el espectro metanólico) por un grupo o-hidroxilo-metoxilo, por el pequeño desplazamiento hipsocromo producido en la banda I al añadir HCl, respecto al espectro registrado en  $\text{AlCl}_3$ .
- 7-OH sustituido, ya que no existe desplazamiento de la banda II al añadir NaOAc a la solución metanólica de D.
- Ausencia de sustitución en 6 y 8, por la forma de los espectros en  $\text{AlCl}_3$  (banda I) y metanólico (banda II), respectivamente.

Debido a la poca cantidad de sustancia aislada, no ha sido posible registrar sus espectros  $^1\text{H-NMR}$  y EI-MS que permitirían confirmar la estructura, por lo que la estructura del compuesto D se mantiene a nivel de **propuesta** como la de la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7,3'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona.



5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7,3'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona

FIGURA V-14: Espectros Uv-visible de la substancia D.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	251	266	341		
NaOMe:	263	384	401i		
AlCl <sub>3</sub> :	259	272i	290i	352	385
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	257	270i	290i	349	380
NaOAc:	265	348	404		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	266	314i	344		

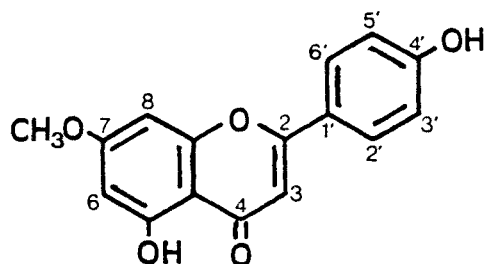
### VI.5.6.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA E,

El compuesto E ha sido aislado tanto del extracto etéreo como del clorofórmico.

Datos analíticos:

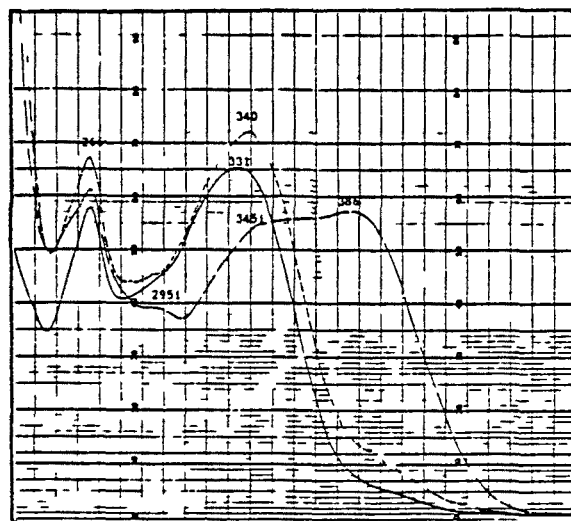
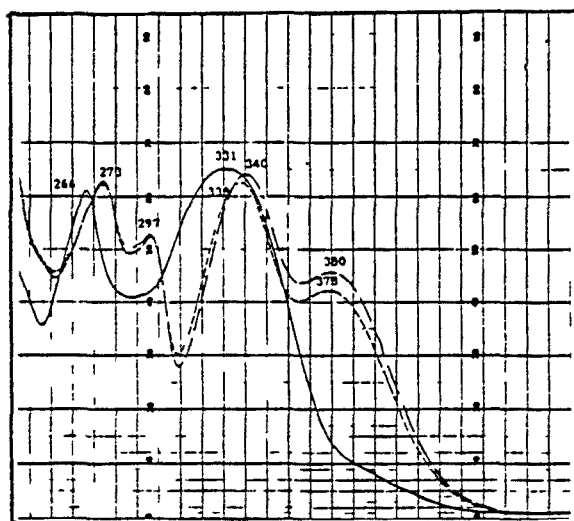
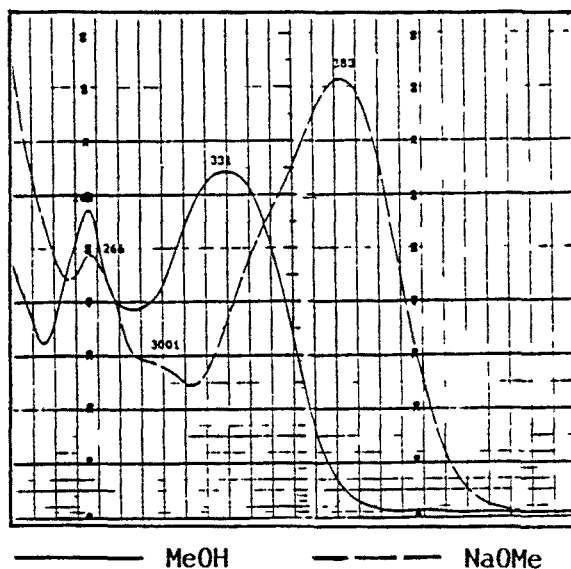
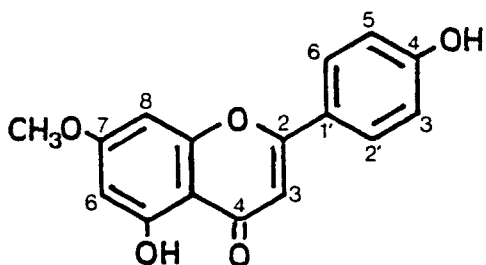
- Comportamiento cromatográfico: tabla VI-1.
- Espectroscopía UV-visible: figura VI-15.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura VI-16.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura VI-17.

El análisis cromatográfico y espectroscópico de esta sustancia permite deducir, de forma similar a como se ha efectuado para la sustancia E de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* en el apartado V.5.6., que el compuesto E de *Salvia candelabrum* es la genkwanina o 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7-OMe-flavona.



Substancia E: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7-OMe-flavona  
(genkwanina).

FIGURA V-15: Espectros Uv-visible de la sustancia E.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	266	331		
NaOMe:	266	300i	383	
AlCl <sub>3</sub> :	273	297	340	380
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	273	297	338	378
NaOAc:	265	295i	345i	386
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	266	340		

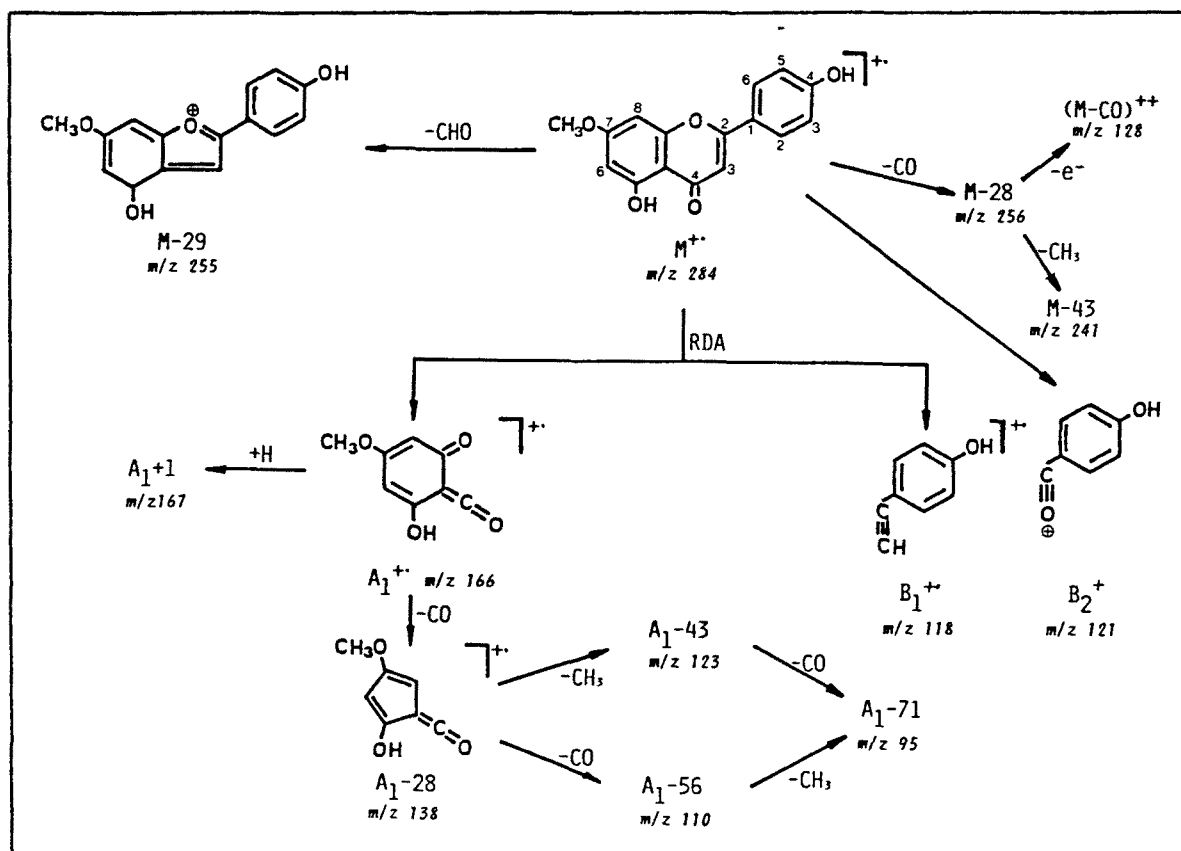
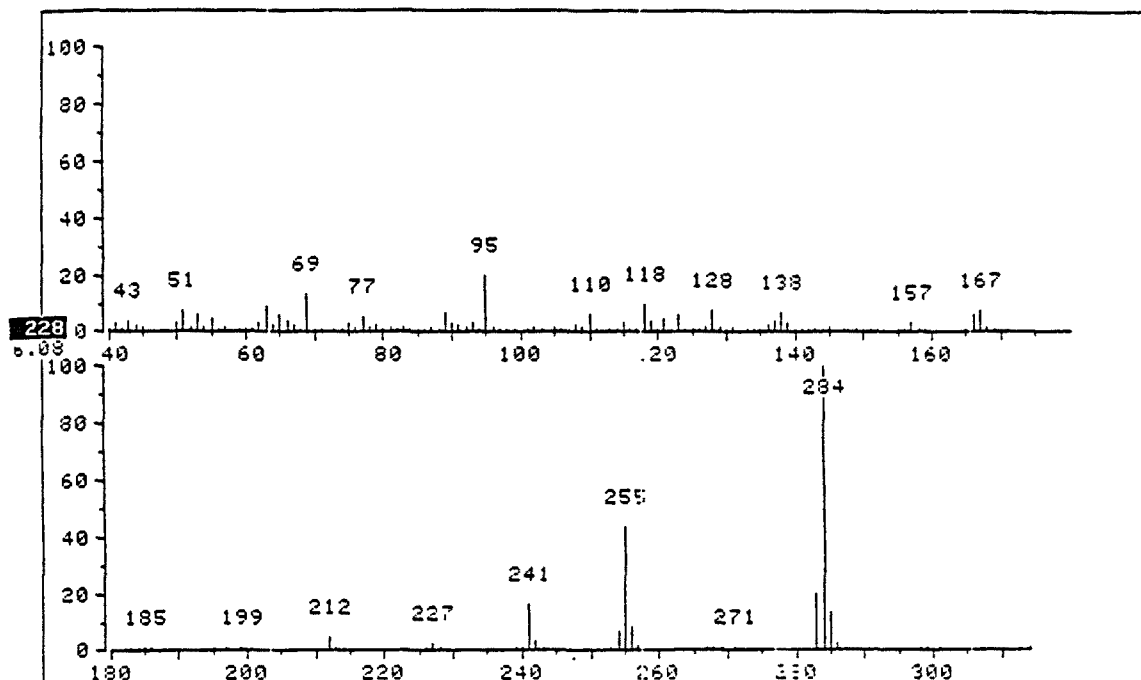


FIGURA VI-16: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia E.



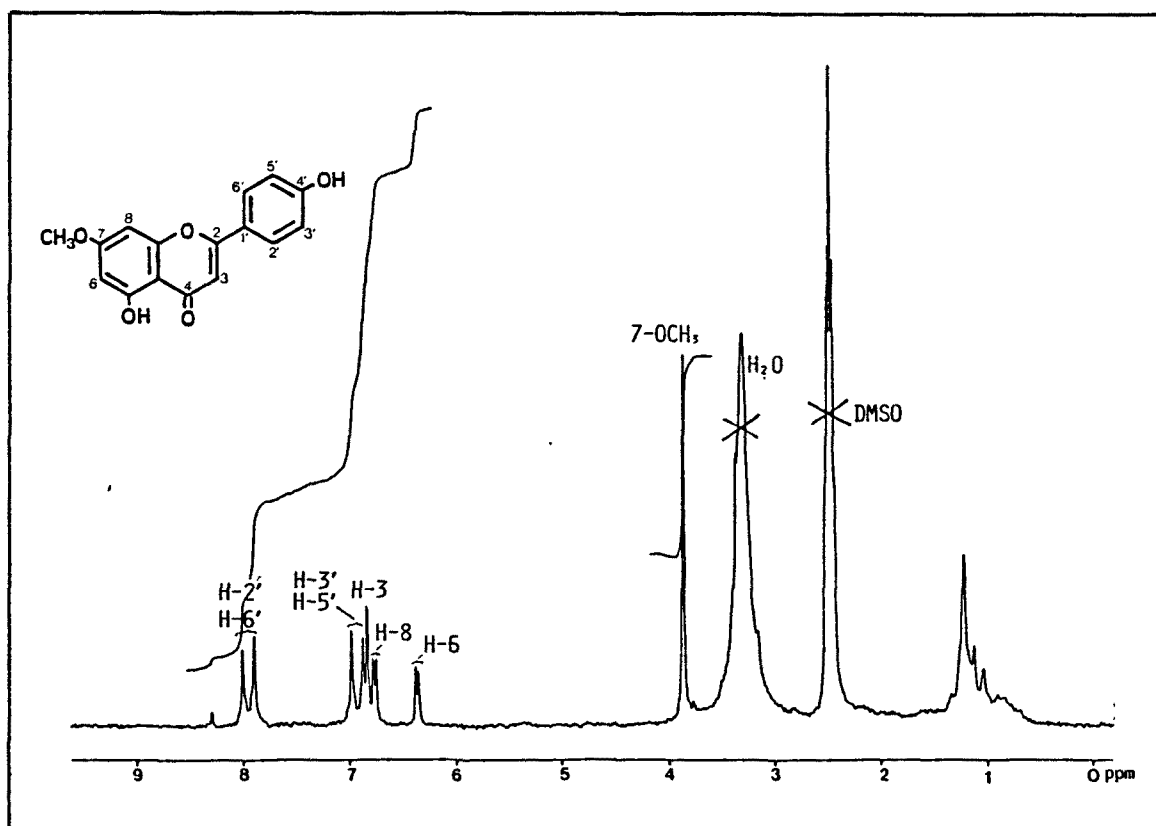


FIGURA VI-17: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia E.

#### VI.5.7.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA F.

Esta sustancia no flavónica fue aislada del extracto clorofórmico y reclamó nuestro interés por aparecer cuantitativamente importante en los análisis cromatográficos de dicho extracto.

##### Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla VI-1.
- Punto de fusión (Kofler): 224-226°C.
- Composición elemental por combustión: 68,89% C, 7,5% H y ausencia de N.
- Espectroscopía infrarroja: figura VI-18.
- Espectroscopía UV-visible: figura VI-19.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura VI-20.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura VI-21 ( $\text{CDCl}_3$ ), figura VI-22 (simulación), figura VI-23 (bidimensional) y tabla VI-4 (asignación).
- Espectroscopía  $^{13}\text{C-NMR}$ : figuras VI-24 (espectro normal) y VI-25 (experimento SEFT).

El peso molecular de F es, según el EI-MS, de 346. No se aprecian en el espectro señales características de halógenos que, por otra parte, son elementos raros en los compuestos orgánicos naturales, ni azufre. Atendiendo a ello y al análisis por combustión, se obtiene para la sustancia F una fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$ , con unos porcentajes teóricos del 69,32% de C, el 7,55% de H y el 23% de O, similares a los valores experimentales obtenidos en el análisis elemental (68,98% de C, 7,5% de H y 23,61% de O).

El compuesto presenta ocho insaturaciones. Este número y la situación de las bandas en el espectro UV-visible descartan la posibilidad de que se trate de un flavonoide.

En el espectro infrarrojo las principales bandas son las siguientes:  $3.250\text{ cm}^{-1}$  ancha (alargamiento -OH),  $2.970\text{ cm}^{-1}$  (alargamiento C-H alifático),  $1.690\text{ cm}^{-1}$  (alargamiento C=O) y  $1.600\text{ cm}^{-1}$  (alargamiento C=C aromático).

En el espectro UV-visible los desplazamientos de la banda metanólica a 289 nm, al añadir NaOMe ( $\Delta\lambda = 51\text{ nm}$ ) y NaOAc ( $\Delta\lambda = 44\text{ nm}$ ), sugieren la existencia de hidroxilos ácidos ionizables de carácter fenólico. El desplazamiento batocrómico de las bandas al añadir  $\text{AlCl}_3$  indica la existencia de grupos formadores de quelatos, normalmente o-(OH)<sub>2</sub> o un grupo

carbonilo suficientemente cercano a un hidroxilo (típicamente  $\alpha$  o  $\beta$  carbonílicos).

El espectro de masas presenta un pico base, coincidente con el molecular, a  $m/z = 346$ , y otro muy intenso (76,5%) a  $m/z = 331$  (M-15), lo cual indica la presencia de grupos metilo. Se observan, además, diferencias de 14 y 28 unidades de masa, debidas a pérdidas de metilos y carbonilos. El M-43 ( $m/z = 303$ ) es característico, también, de la pérdida de un grupo isopropilo.

En el espectro  $^1\text{H-NMR}$  registrado en  $\text{CDCl}_3$  (fig. VI-21) se aprecia:

- Tres señales hidroxílicas, puesto que desaparecen al añadir  $\text{D}_2\text{O}$  (debido al intercambio con el medio), que integran un protón cada una. Sus desplazamientos químicos a 5, 5,9 y 13,5 ppm indican que son hidroxilos aromáticos y que el último de ellos está formando un puente de hidrógeno.
- Tres señales a 1,15 ppm (6-H), 1,3 ppm (3-H) y 1,4 ppm (6-H), debidos a cinco grupos metílicos.
- Dos multipletes centrados a 2,6 y 3,25 ppm que integran ocho protones alifáticos.
- Ausencia de protones aromáticos, de lo que se deduce que, de haber un anillo aromático, debe estar totalmente substituido.

En el espectro  $^1\text{H-NMR}$  registrado en metanol (ver parte superior de la figura VI-23) los grupos metílicos aparecen a 1,15 ppm (6-H, singulete), 1,44 (3-H, singulete) y 1,30 (6-H, doblete,  $J = 7$  Hz). La irradiación a 3,15 ppm colapsa este último doblete a singulete, lo cual confirma la existencia de un grupo isopropílico.

El espectro de  $^{13}\text{C-NMR}$  (fig. VI-24) presenta dos señales carbonílicas (a 205,17 y 219,5 ppm) y seis características de carbonos aromáticos, entre 100 y 170 ppm, lo que confirma la existencia de un anillo bencénico totalmente substituido. Éste y los dos carbonilos suponen seis insaturaciones, restando dos más, que deben asignarse a la existencia de otros dos anillos en la molécula, ya que ésta no da señales de insaturaciones no aromáticas.

En la zona entre 10 y 60 ppm aparecen los doce carbonos restantes. En el experimento SEFT (fig. VI-25) éstos proporcionan seis señales con fases positivas (una de las cuales es doble) correspondientes a los cinco metilos y dos carbonos metínicos, y cinco negativas, de-

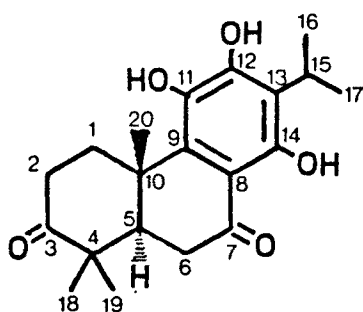
bidas a dos carbonos cuaternarios (señales débiles) y tres grupos CH<sub>2</sub> (señales intensas).

Lo expuesto hasta ahora, atendiendo además al tipo de sustancias diterpénicas descritas por otros autores en especies de *Salvia* L. (ver tabla VIII-2), nos permitió proponer para la sustancia F la estructura de la 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trien-3,7-diona. Ésta ha podido ser confirmada gracias a un estudio más profundo de la molécula por <sup>1</sup>H-NMR a 400 MHz y por <sup>1</sup>H-NMR-2D a 250 MHz.

La zona de protones metilénicos y metínicos del espectro <sup>1</sup>H-NMR, dada su complejidad, no es interpretable, incluso ni a 400 MHz. Por ello, la disposición de estos protones en la molécula (a excepción del H-15 del -CH isopropílico) ha debido ser confirmada mediante simulación (fig. VI-22), utilizando el programa PANIC. Con este fin, se ha introducido en el ordenador el sistema formado por los protones H-1 α y β y H-2 α y β, más el formado por los H-5α y H-6 α y β. El espectro creado en estas condiciones por el ordenador es similar al experimental, como se muestra en la figura VI-22.

Por último, el espectro NMR bidimensional (COSY) homonuclear de protón de F (figura VI-23) confirma la conectividad de los protones de la molécula. Las asignaciones del <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) figuran en la tabla VI-4.

La estructura de la sustancia F queda así establecida como la de la 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trien-3,7-diona.



Substancia F: 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trien-3,7-diona.

Este compuesto, con estructura diterpénica derivada del abietano, según nuestros conocimientos, no había sido aún descrita en la naturaleza.

H	$\delta$ (*)	Acoplamiento
1 $\beta$	3,40 (m)	$J_{1\beta,1\alpha} = 13,9$ Hz $J_{6\beta,6\alpha} = 16,6$ Hz
1 $\alpha$	2,01 (m)	$J_{1\beta,2\beta} = 5,3$ Hz $J_{15,15(\text{CH}_3)_2} = 7,0$ Hz
2 $\beta$	2,64 (m)	$J_{1\beta,2\alpha} = 7,0$ Hz
2 $\alpha$	2,60 (m)	$J_{1\alpha,2\beta} = 8,6$ Hz
4-( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub>	1,15 (s)	$J_{1\alpha,2\alpha} = 8,3$ Hz
5 $\alpha$	2,42 (m)	$J_{2\beta,2\alpha} = 14,2$ Hz
6 $\beta$	2,78 (m)	$J_{5\alpha,6\beta} = 14,6$ Hz
6 $\alpha$	2,45 (m)	$J_{5\alpha,6\alpha} = 2,9$ Hz
10- $\text{CH}_3$	1,44 (s)	
15	3,33-3,50 (m)	
15-( $\text{CH}_3$ ) <sub>2</sub>	1,30 (d)	

TABLA VI-4: Asignaciones de los protones de la sustancia F en  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).  $\delta$  en ppm. (\*): multiplicidad.

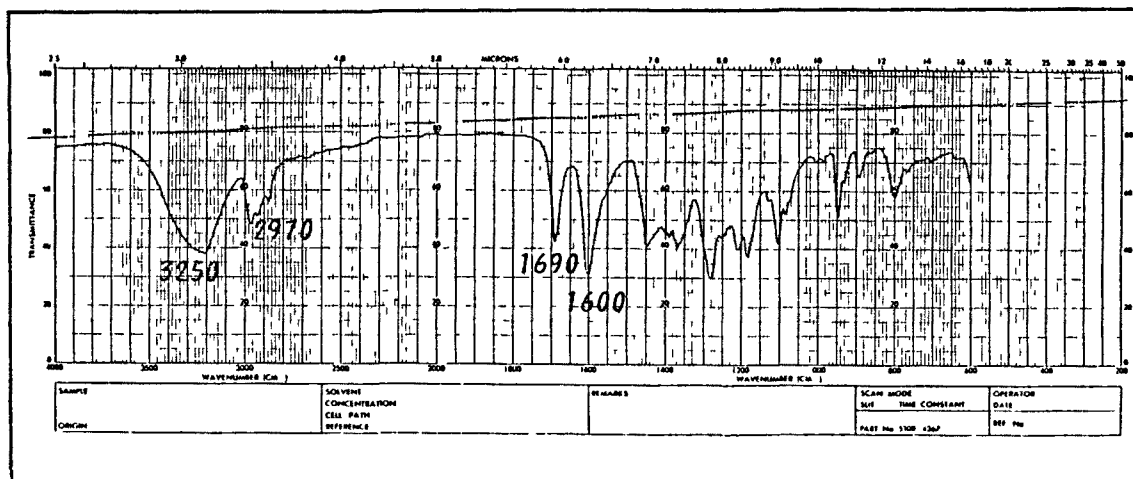
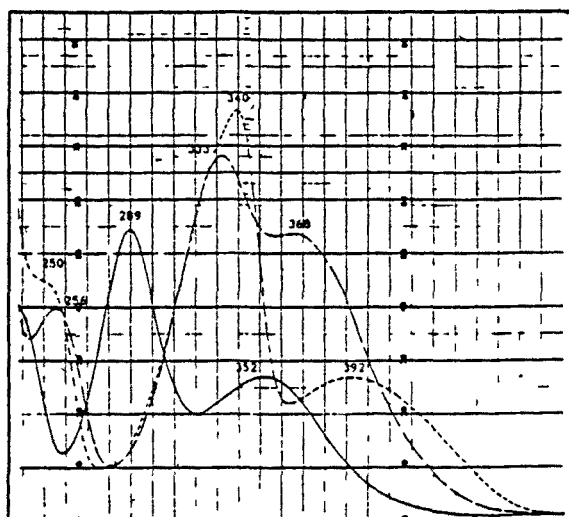
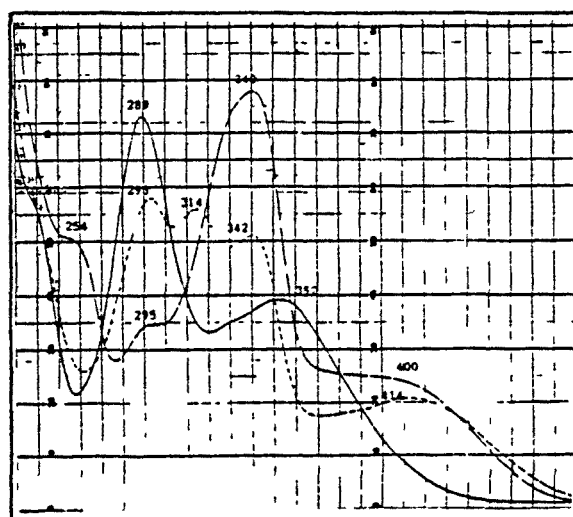
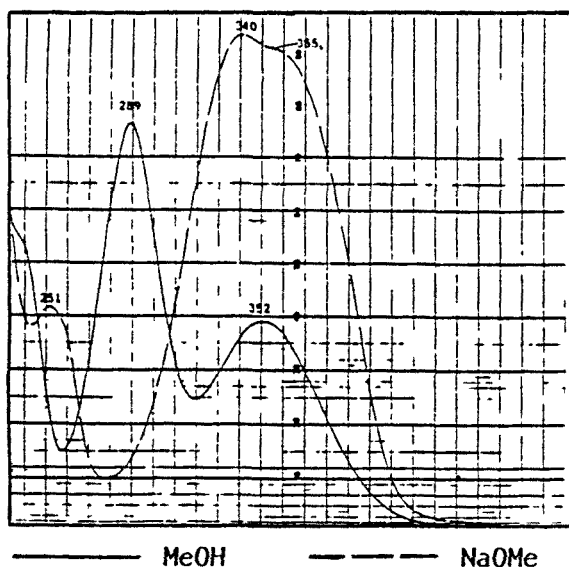
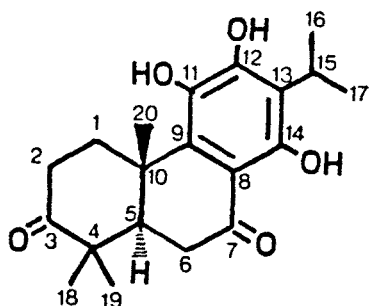


FIGURA VI-18: Espectro IR (pastilla de KBr) de la sustancia F.

FIGURA VI-19: Espectros UV-visible de la sustancia F.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	289	352		
NaOMe:	251	340	355i	
AlCl <sub>3</sub> :	254	295	340	400
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	293	314	342	414
NaOAc:	256	333	368	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	250	340	392	

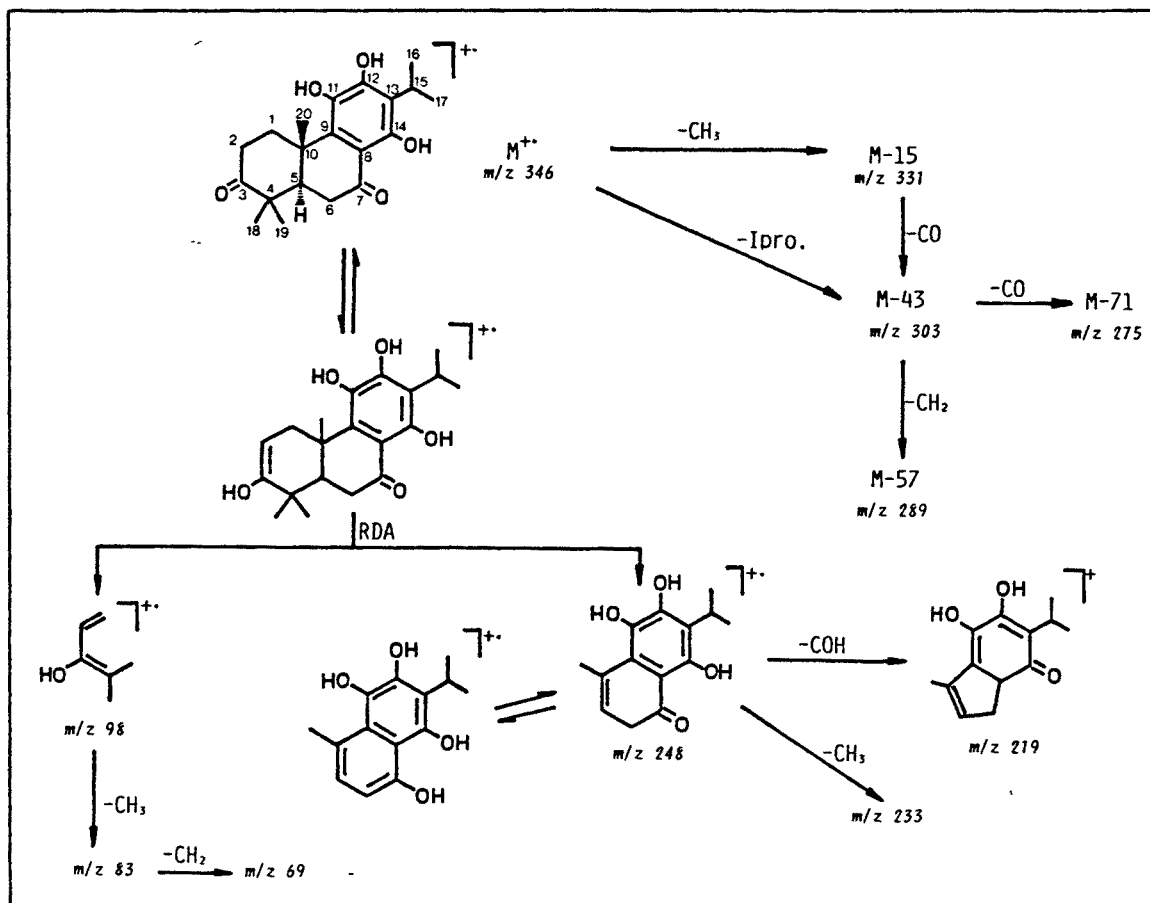
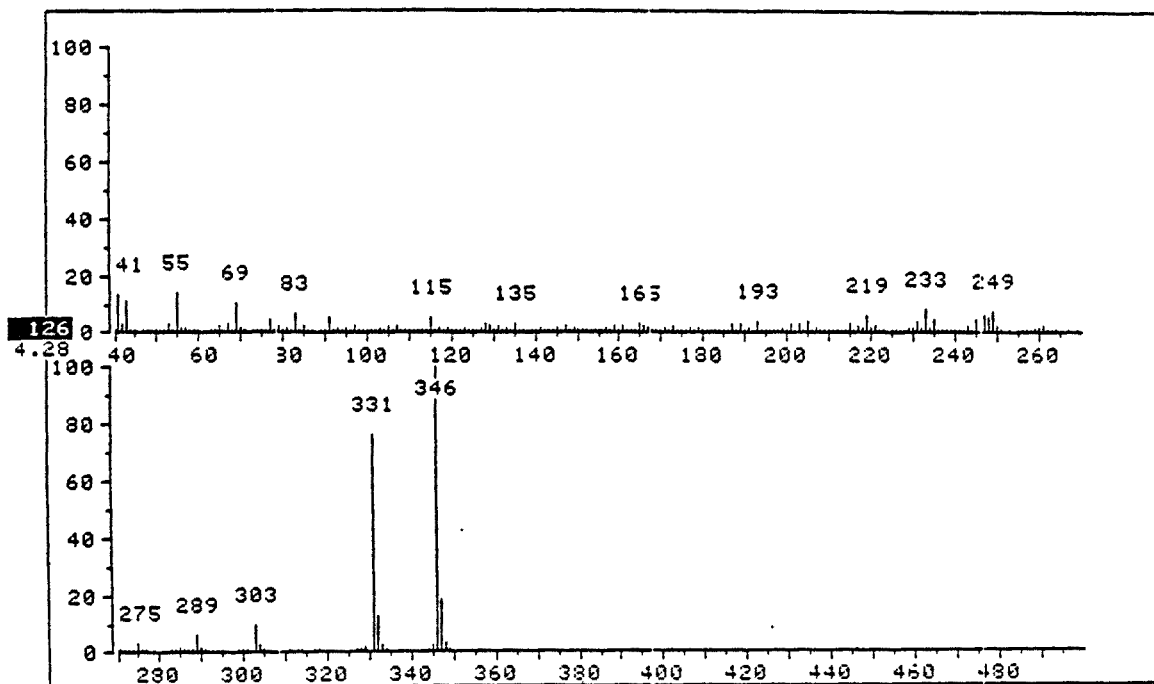


FIGURA VI-20: Espectro EI-MS de la sustancia F.

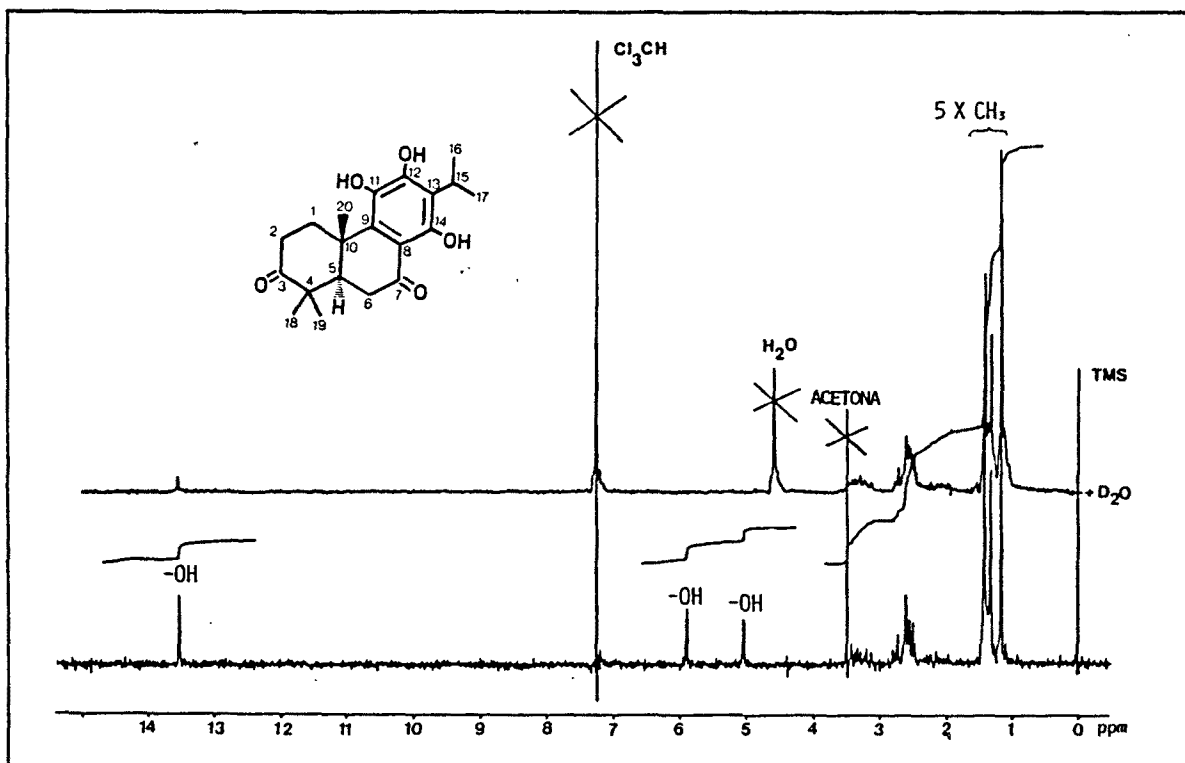


FIGURA VI-21: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz) de la substancia F disuelta en  $\text{CDCl}_3$ .

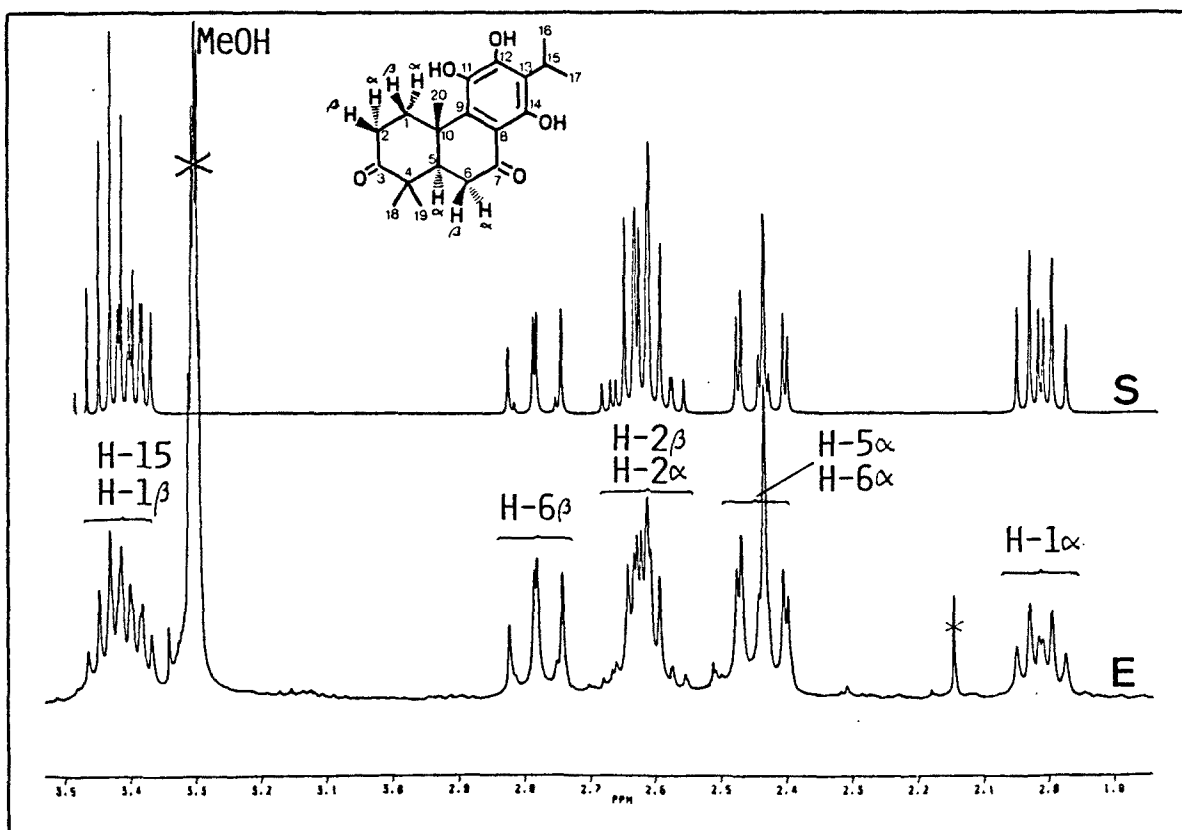


FIGURA VI-22: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la substancia F entre 1,9 y 3,5 ppm. E: experimental. S: Simulado por ordenador.



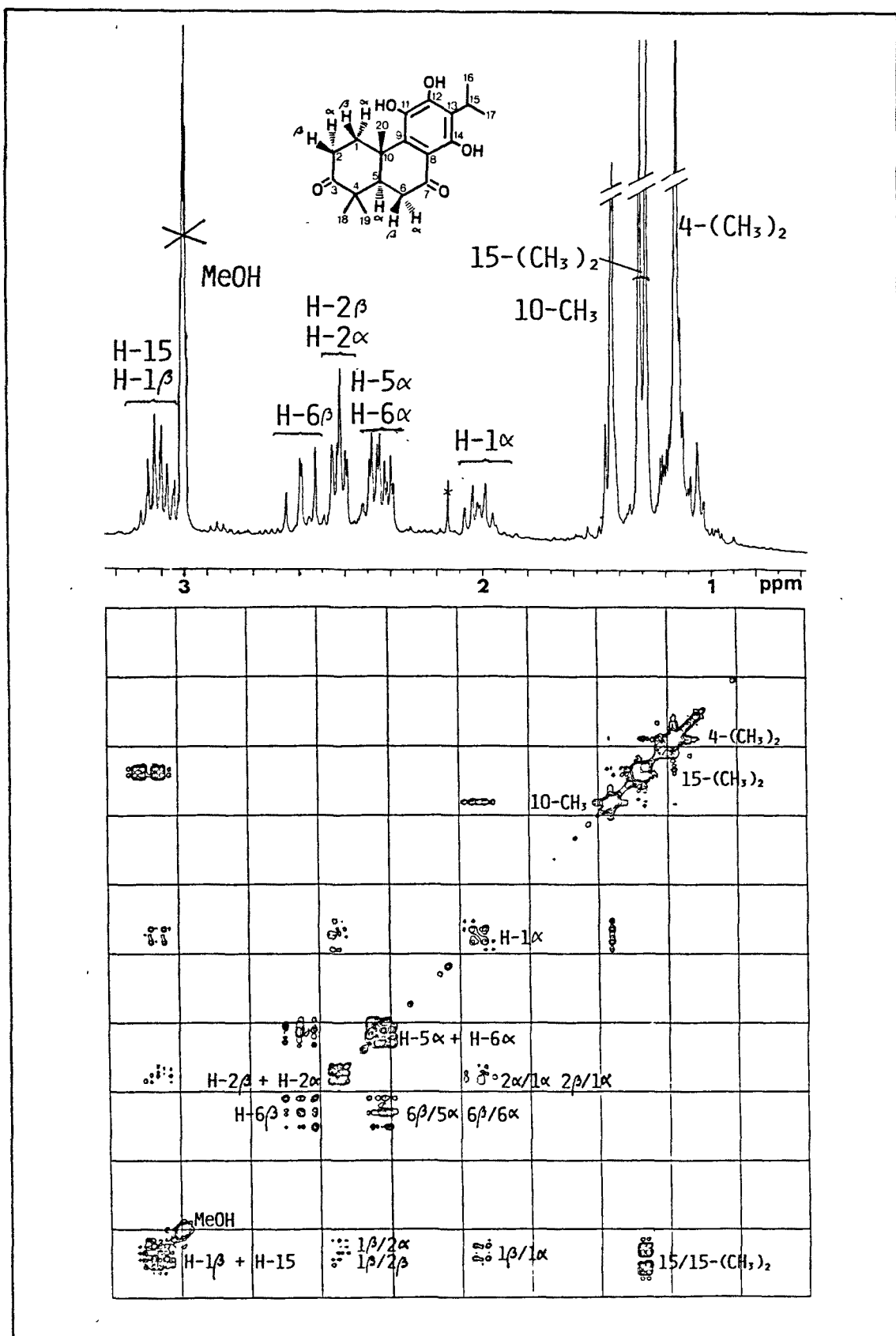


FIGURA VI-23: Espectro de <sup>1</sup>H-NMR bidimensional (COSY) (250MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la substancia F.

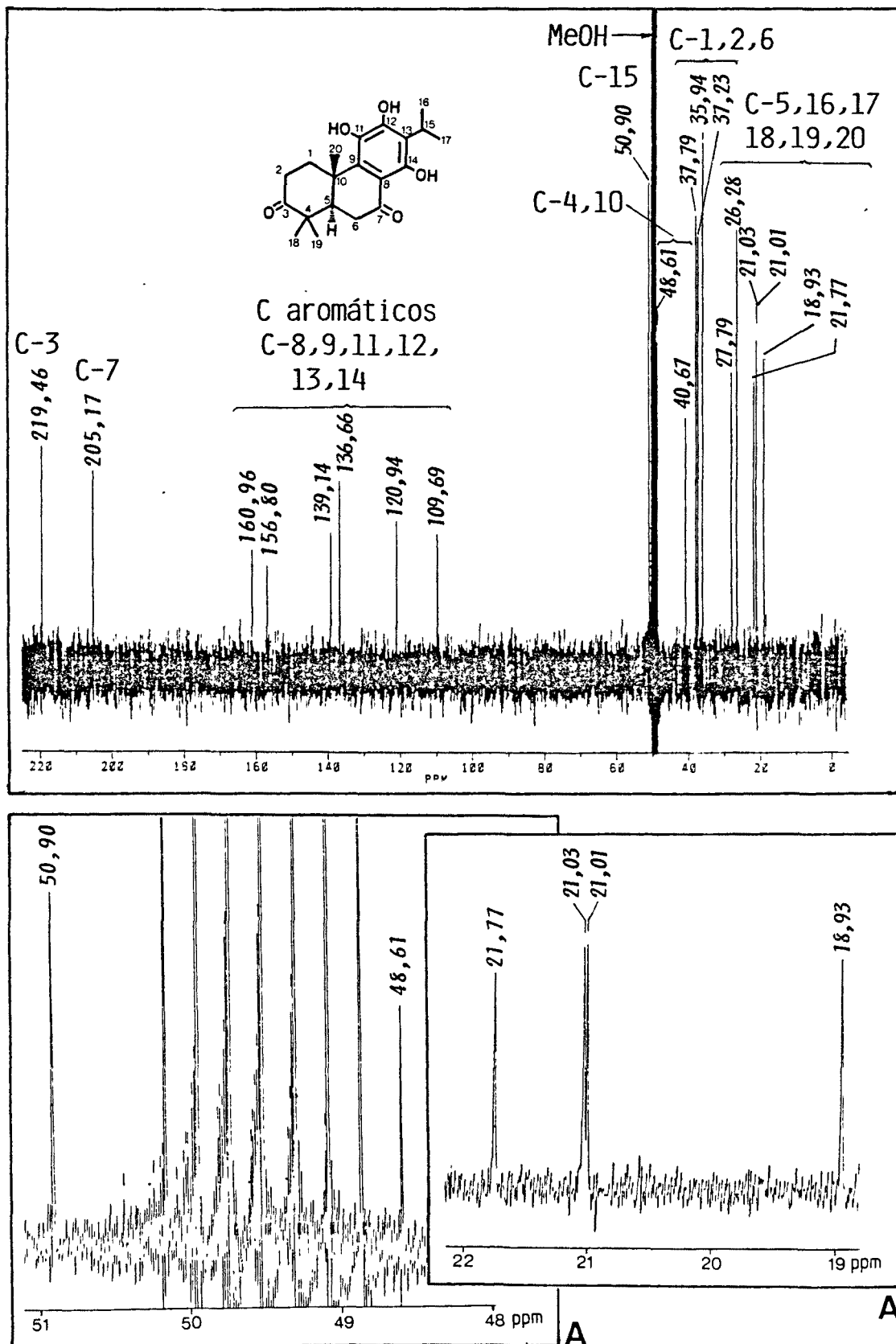


FIGURA VI-24: Espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR (100,57 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la substancia F.  
A: ampliaciones.

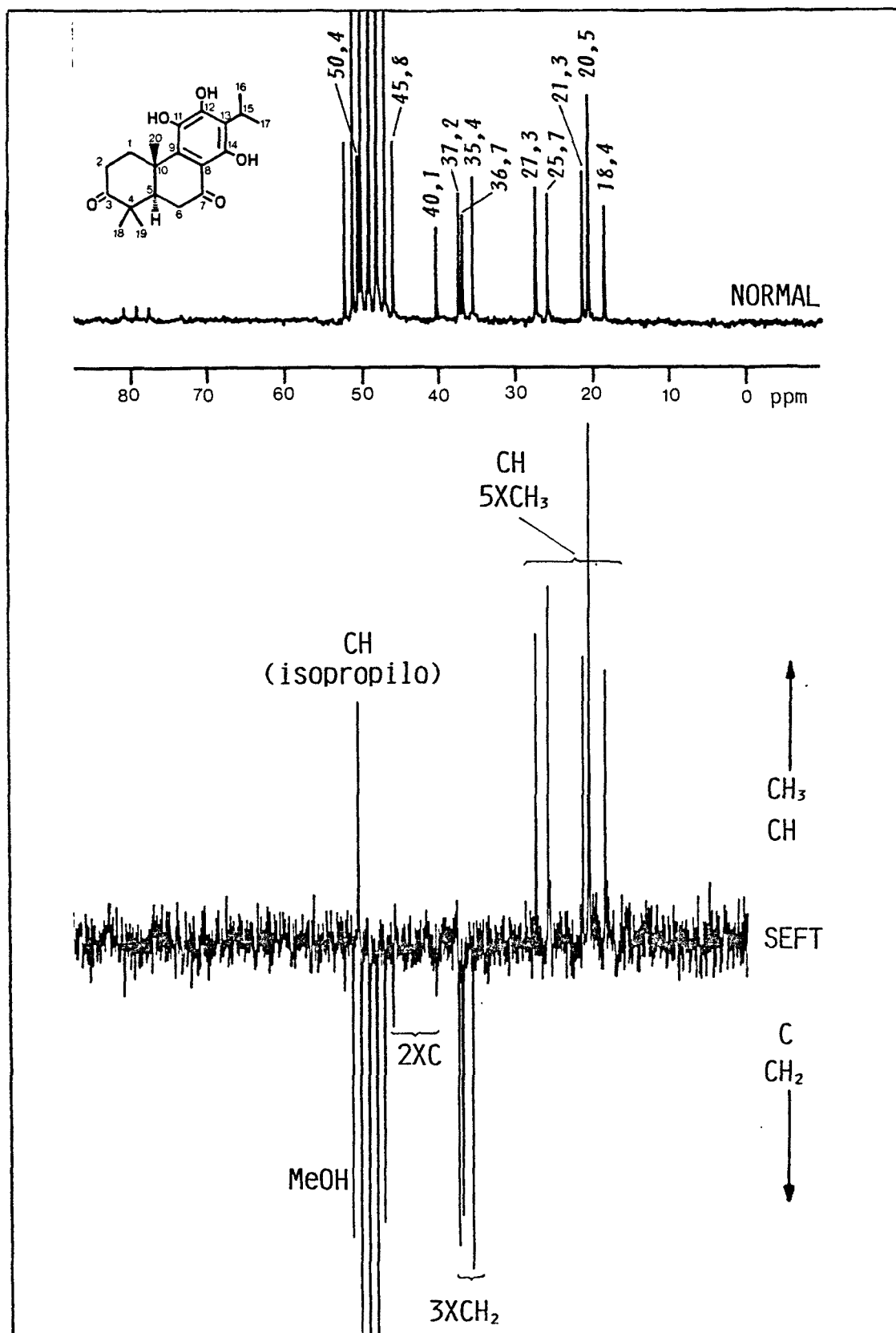


FIGURA VI-25: Experimento SEFT en  $^{13}\text{C}$ -NMR (20,14 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) realizado sobre la substancia F en la zona de 0 a 80 ppm.

### VI.5.8.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA G.

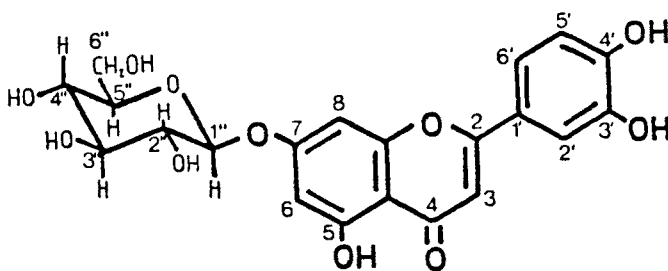
El compuesto G ha sido aislado del extracto "AcOEt + BuOH".

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tablas VI-2 (heterósido) y VI-3 (aglicón)
- Espectroscopía UV-visible: figuras VI-26 (heterósido) y VI-27 (aglicón)
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figuras VI-28 (heterósido) y VI-29 (aglicón).
- Espectro de masas (EI-MS) del aglicón: figura VI-30.

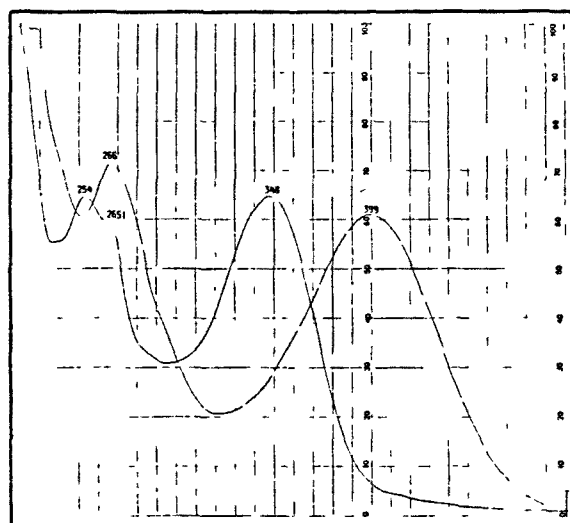
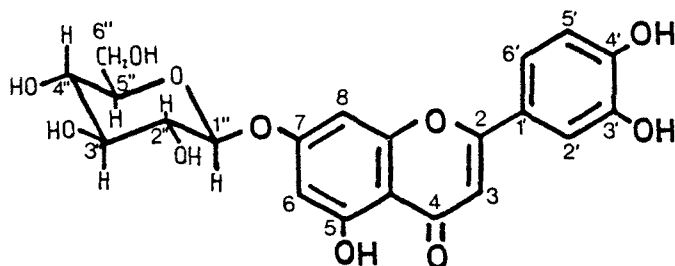
El análisis cromatográfico y espectroscópico de G y sus productos de hidrólisis permite concluir que su estructura es la de la 7-O- $\beta$ -D-glucosil-luteolina.

La estructura del compuesto G ha sido deducida de forma similar a la de la sustancia J de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* (apartado V.5.11). Para el registro del  $^1\text{H-NMR}$  del aglicón obtenido por la hidrólisis de G, se purificó previamente por una pequeña columna de Sephadex LH-20.

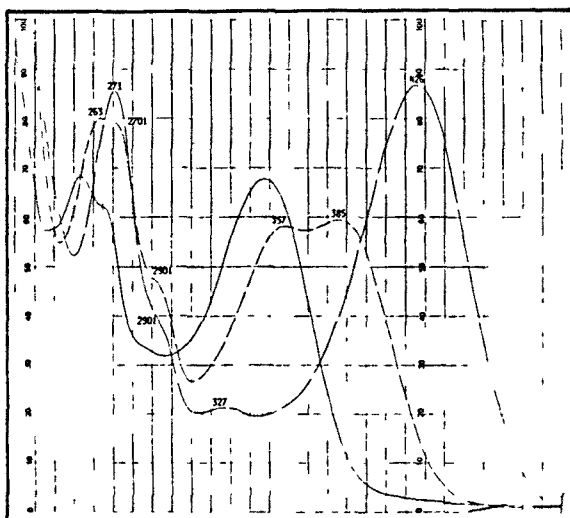


Substancia G: 7-O- $\beta$ -D-glucosil-luteolina

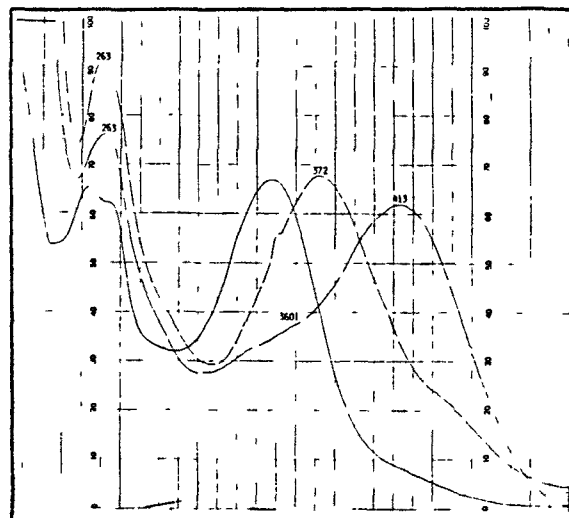
FIGURA V-26: Espectros UV-visible de la substancia G.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- · - · AlCl<sub>3</sub> + HCl

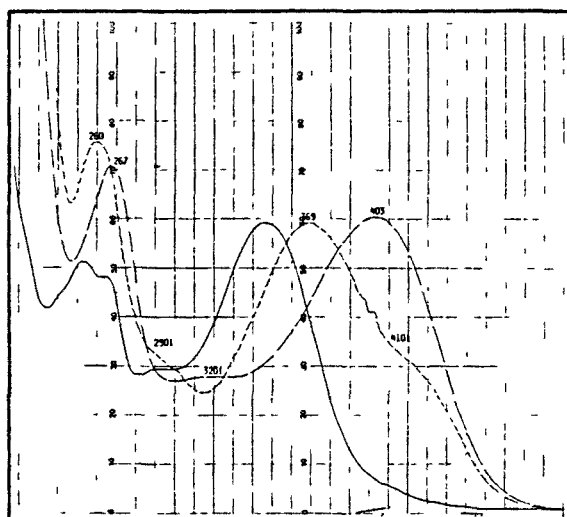
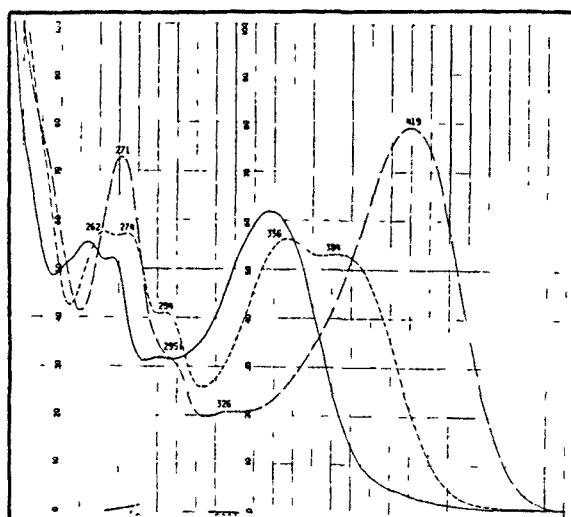
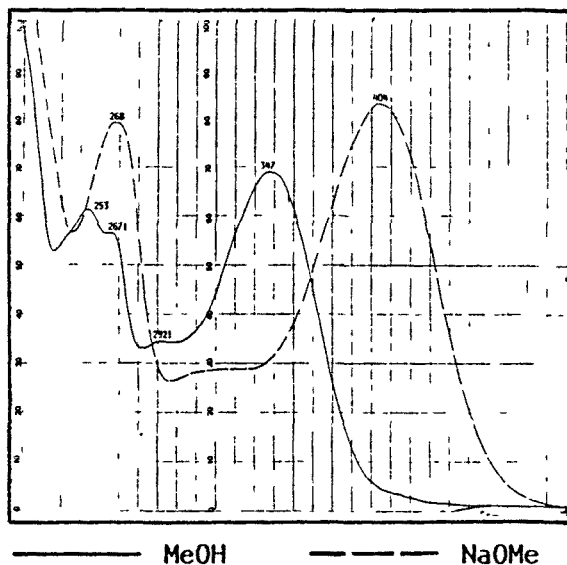
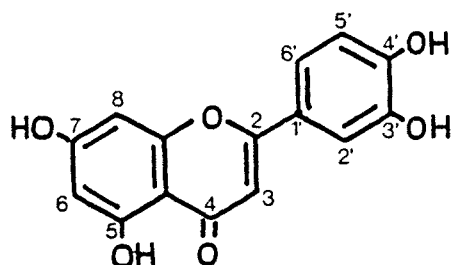


———— MeOH      - - - - NaOAc  
- - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	254	265i	348		
NaOMe:	266	399			
AlCl <sub>3</sub> :	271	290i	327	426	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	263	270i	290i	357	385
NaOAc:	263	360i	413		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	263	372			

FIGURA V-27: Espectros UV-visible del aglicón de la substancia G.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	267i	292i	347
NaOMe:	268	325i	404	
AlCl <sub>3</sub> :	271	295i	326	419
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	262	274	294	356    384
NaOAc:	267	320i	403	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	260	290i	369	410i

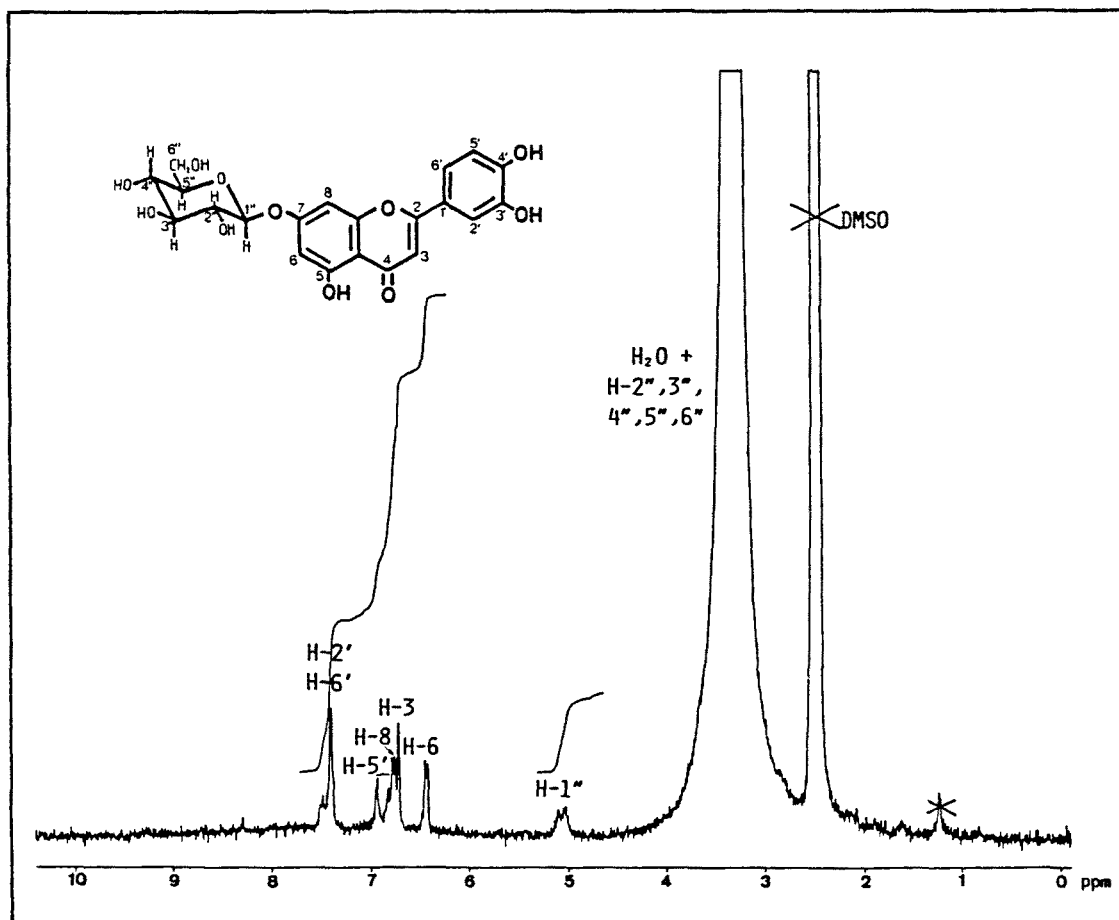


FIGURA VI-28: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia G.

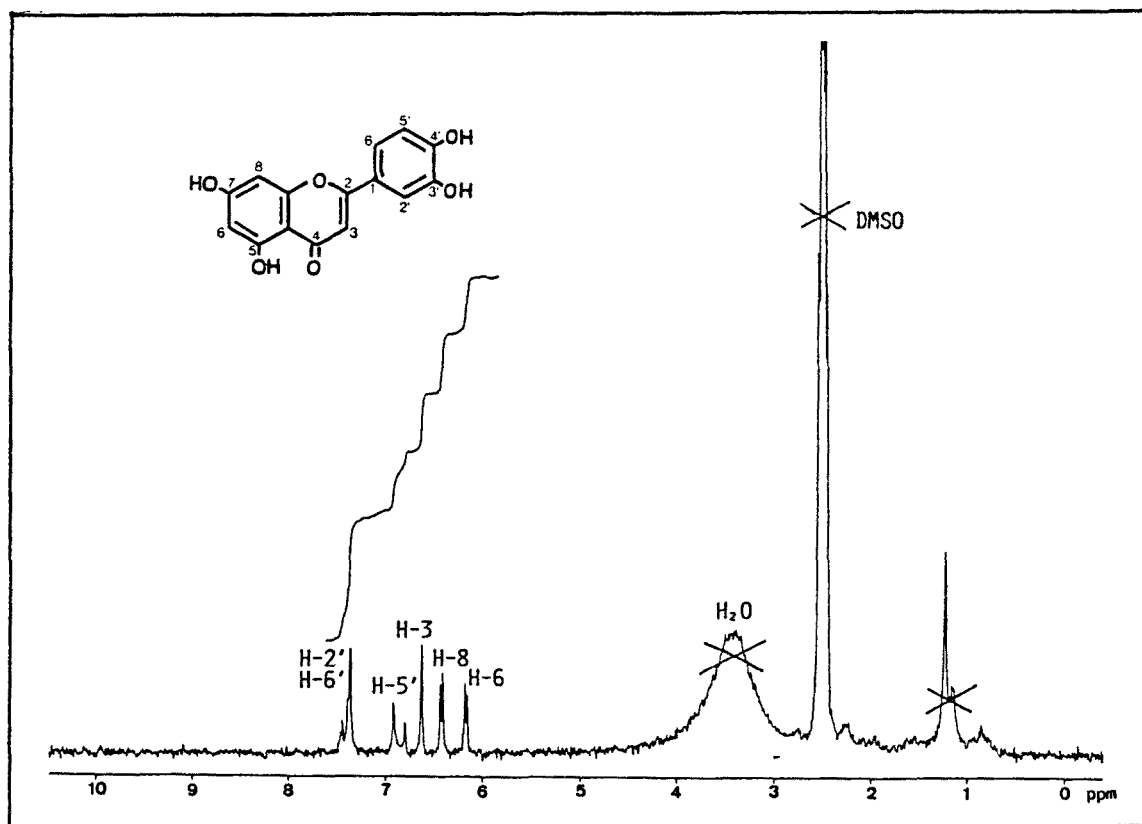


FIGURA VI-29: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ) del aglicón de la sustancia G.

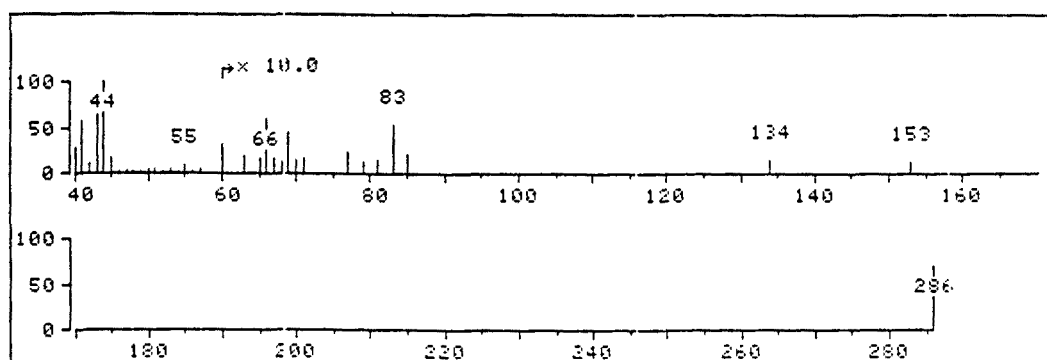


FIGURA VI-30: Espectro EI-MS del aglicón de la sustancia G.



### VI.5.9.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA H.

El compuesto H ha sido aislado a partir del extracto "AcOEt + BuOH".

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tablas VI-2 (heterósido) y VI-3 (aglicón).
- Espectroscopía UV-visible: figuras VI-31 (heterósido) y VI-32 (aglicón)
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$  del heterósido: figura VI-33.

El aglicón liberado por la hidrólisis de la substancia H es la luteolina (identificada cromatográficamente y por espectroscopía UV-visible).

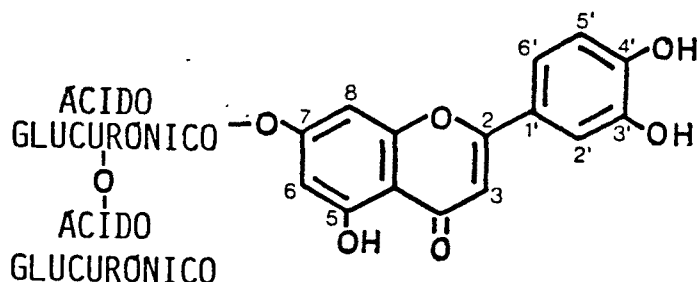
El análisis espectroscópico UV-visible y por  $^1\text{H-NMR}$  de H indica que la cadena osídica está unida al hidroxilo de la posición 7.

En el  $^1\text{H-NMR}$  del heterósido se observa un doblete deformado (5,0-5,2 ppm) característico del H-1 osídico que integra 2 protones. Se trata, pues, de un diglicósido.

Su alto  $R_f$  en capa fina de celulosa/ $\text{H}_2\text{O}$  y la no detección de azúcar después de la hidrólisis total indica que, probablemente, se trate de un glucurónido.

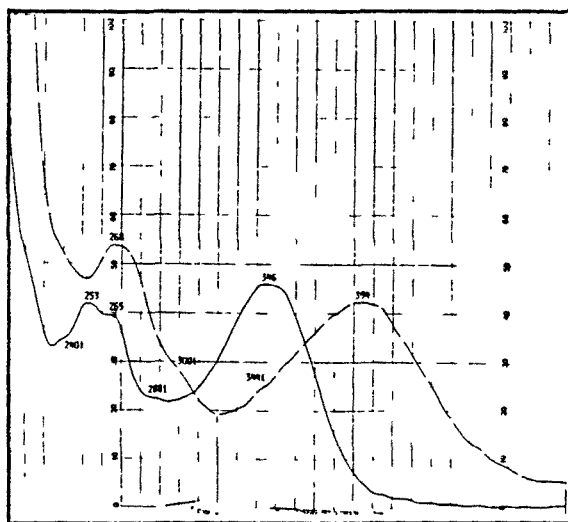
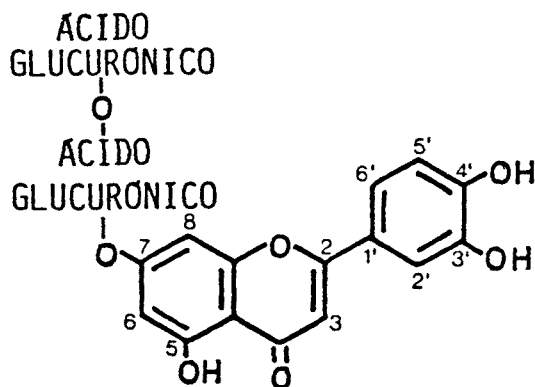
Esto se comprueba de forma similar a como se ha explicado para la substancia M de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* (ver apartado V.5.14), mediante hidrólisis parcial, aislamiento del heterósido intermediario (cuyo espectro UV-visible es idéntico al de H) e hidrólisis de éste, que permiten configurar la estructura de la cadena osídica como diglucuronil.

Por tanto, la substancia H es la 7-O-diglucuronil-luteolina.

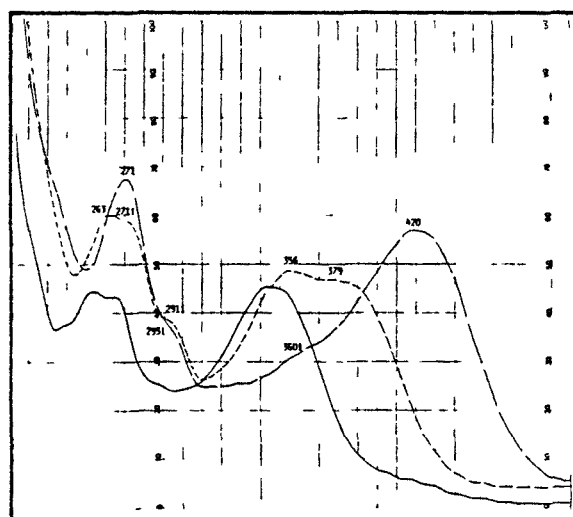


Substancia H: 7-O-diglucuronil-luteolina.

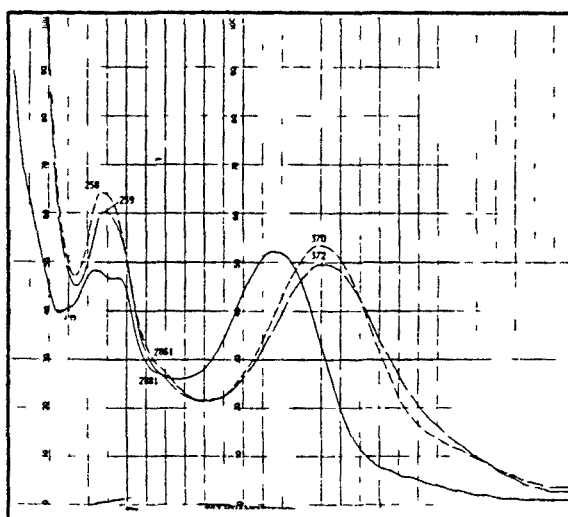
FIGURA V-31: Espectros UV-visible de la sustancia H.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>  
- . . . AlCl<sub>3</sub> + HCl

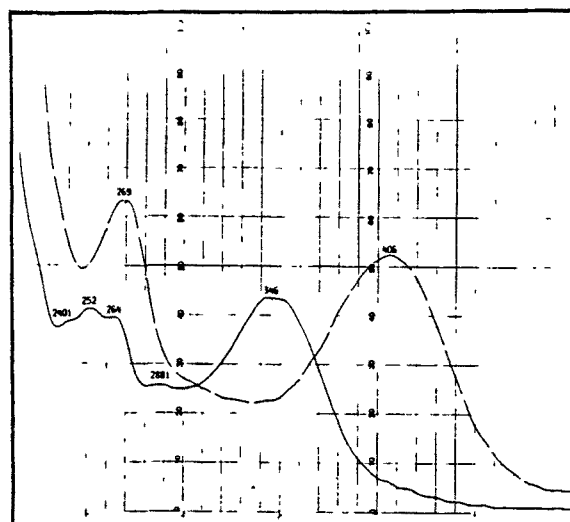
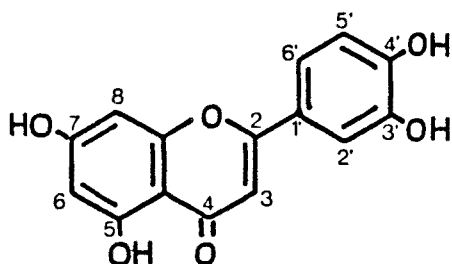


———— MeOH      - - - - NaOAc  
- - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

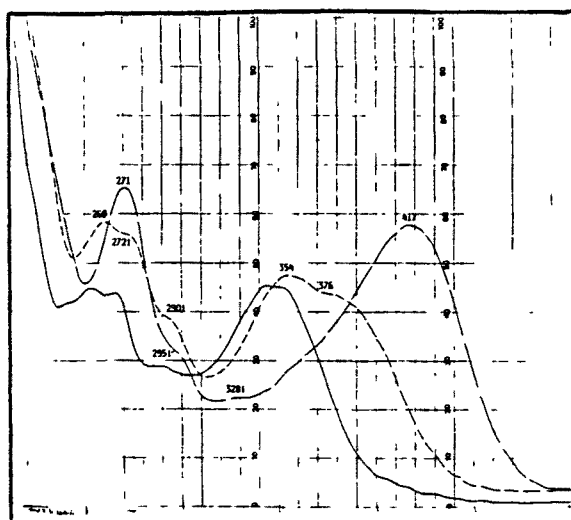
Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	253	265	288i	346
NaOMe:	268	300i	344i	394	
AlCl <sub>3</sub> :	271	295i	360i	420	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	263	271i	291i	356	379
NaOAc:	259	288i	372		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	258	286i	370		

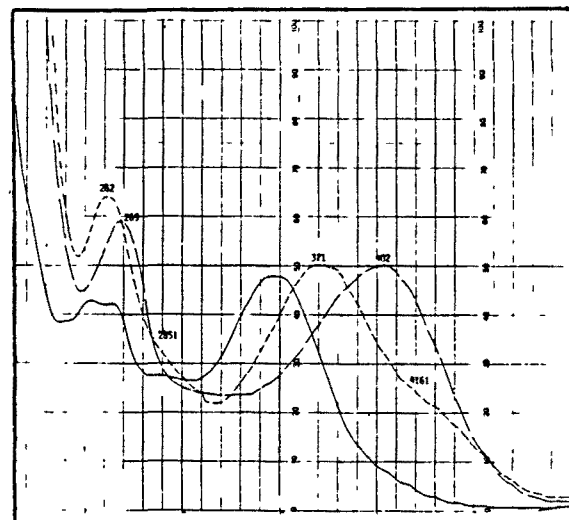
FIGURA V-32: Espectros UV-visible del aglicón de la substancia H.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
- . . . AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
- . . . NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	252	264	288i	346
NaOMe:	269	406			
AlCl <sub>3</sub> :	271	295i	328i	417	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	260	272i	290i	354	376
NaOAc:	269	402			
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	262	285i	371	416i	

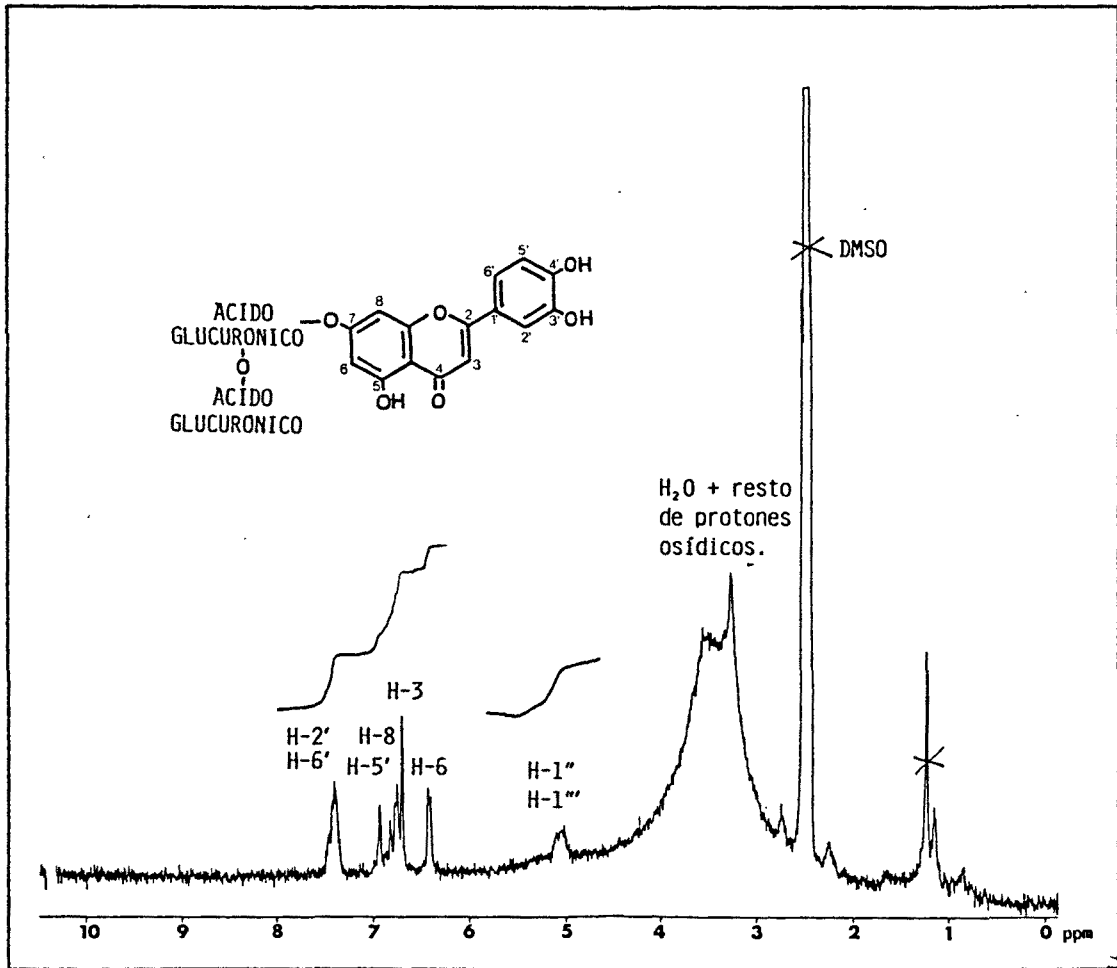


FIGURA VI-33: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ ) de la substancia H.

### VI.5.10.- ESTRUCTURA DE LA SUBSTANCIA I.

Esta sustancia ha sido aislada del extracto "AcOEt + BuOH".

Datos analíticos:

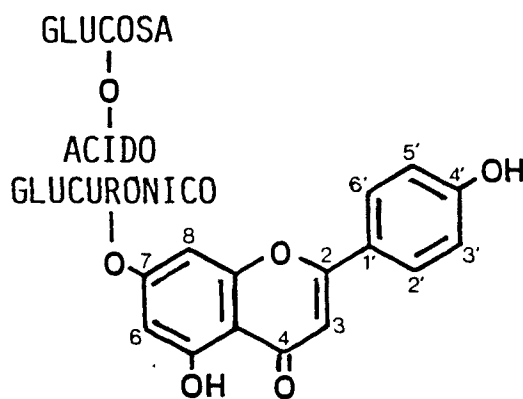
- Comportamiento cromatográfico: tablas VI-2 (heterósido) y VI-3 (aglicón)
- Espectroscopía UV-visible: figuras VI-34 (heterósido) y VI-35 (aglicón)
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$  del heterósido: figura VI-36.

El aglicón liberado por la hidrólisis del compuesto I, una vez estudiado cromatográficamente y por espectroscopía UV-visible, resulta ser la apigenina.

Del análisis por espectroscopía UV-visible de I, se deduce que la cadena glicosídica se halla unida a través del hidroxilo de la posición 7.

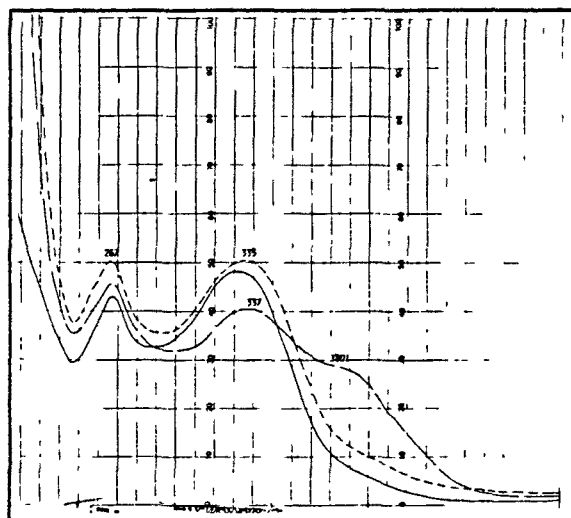
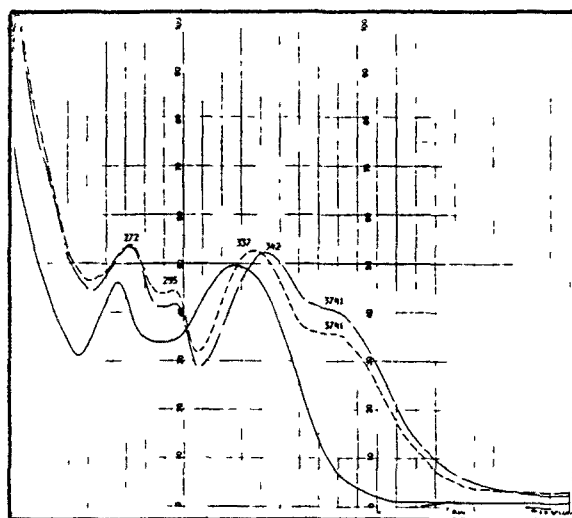
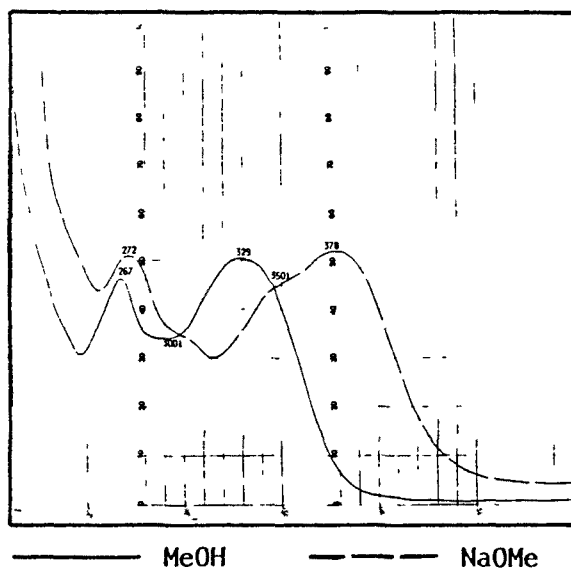
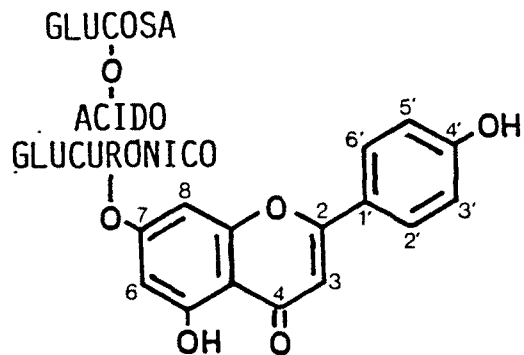
El  $^1\text{H-NMR}$  de I confirma este punto e indica que se trata de un diglicósido (doblete deformado entre 4,9 y 5,2 ppm que integra 2H correspondientes a H-1'' y H-1''').

La hidrólisis total proporciona glucosa (identificada por HPTLC) como único azúcar. Sin embargo, el comportamiento cromatográfico de I permite sospechar que contiene un ácido urónico. Por ello, la molécula se estudia utilizando la misma secuencia hidrolítica que para la sustancia M de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* (ver apartado V.5.14). La primera hidrólisis libera glucosa y un heterósido intermediario (I'). Éste presenta un espectro UV-visible idéntico al de I, y su hidrólisis proporciona apigenina y ácido glucurónico. I' es, pues, la 7-O-glucuronil-apigenina, por lo que la estructura de I debe ser la de la 7-O-(glucosil-glucuronil)-apigenina.



Substancia I: 7-O-(glucosil-glucuronil)-apigenina.

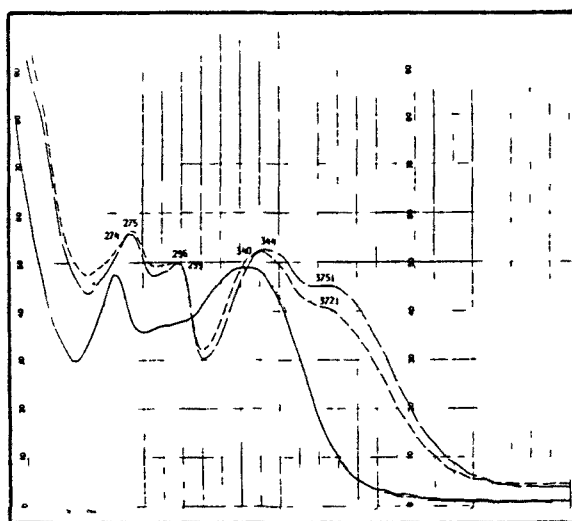
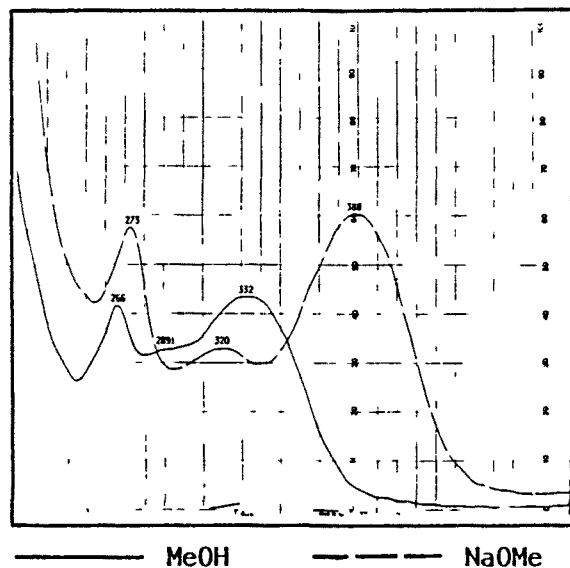
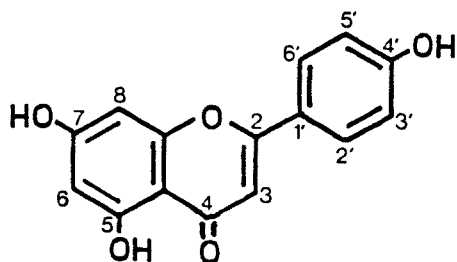
FIGURA V-34: Espectros UV-visible de la sustancia I.



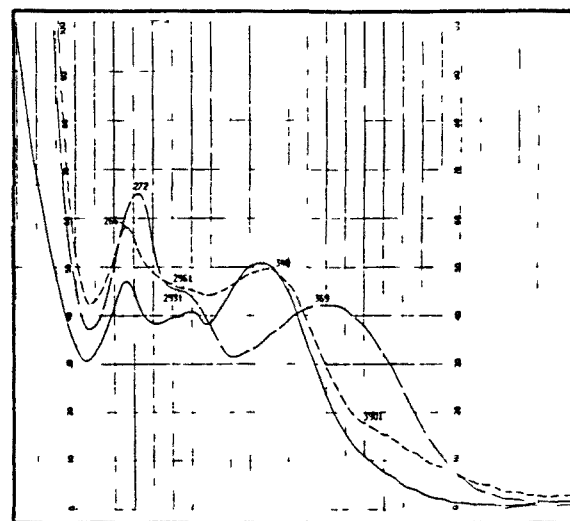
Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	267	329		
NaOMe:	272	300i	350i	378
AlCl <sub>3</sub> :	272	295	342	374i
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	272	295	337	374i
NaOAc:	267	337	380i	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	267	335		

FIGURA V-35: Espectros UV-visible del aglicón de la substancia I.



— MeOH      - - - AlCl<sub>3</sub>  
 ····· AlCl<sub>3</sub> + HCl



— MeOH      - - - NaOAc  
 ····· NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	266	289i	332	
NaOMe:	273	320	388	
AlCl <sub>3</sub> :	274	299	344	375i
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	275	296	340	372i
NaOAc:	272	293i	369	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	266	296i	340	390i

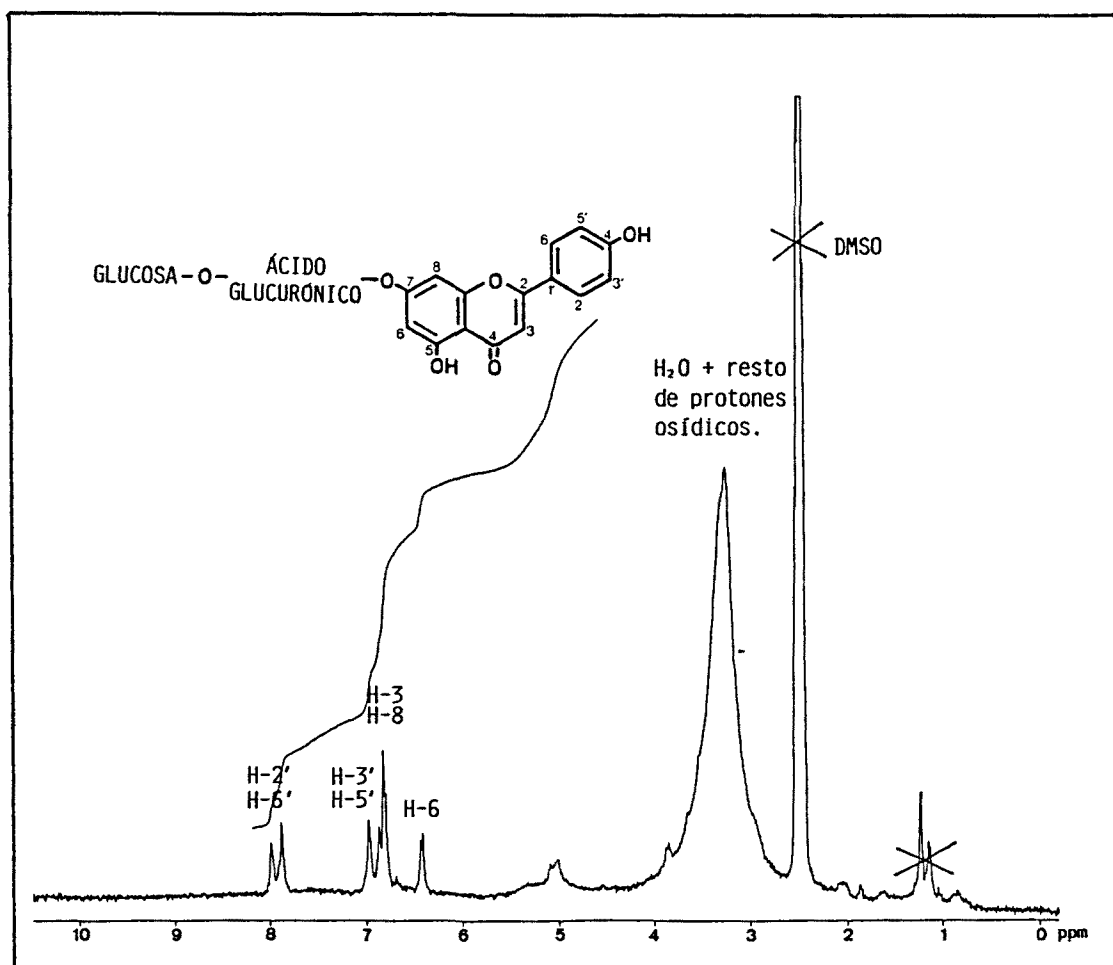


FIGURA VI-36: Espectro  $^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ) de la sustancia I.





Capítulo VII:

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA  
COMPOSICION POLIFENOLICA DE  
ESPECIES DE SALVIA.

1. *Introducción.*
2. *Obtención y purificación de extractos.*
3. *Análisis de los extractos.*
4. *Resultados.*



### VII.1.- INTRODUCCIÓN.

En el presente capítulo se realiza un análisis comparativo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y diversos sistemas de cromatografía en capa fina (TLC) de la composición en aglicones flavónicos libres, ácido caféico y ácido rosmarínico de diversos táxones del género *Salvia*.

Para ello, los extractos de las hojas, obtenidos y purificados en la forma expuesta en el apartado VII.2., se analizan cromatográficamente en los sistemas descritos en el apartado VII.3., frente a sustancias patrón cuya estructura y procedencia se resumen en la tabla VII-1.

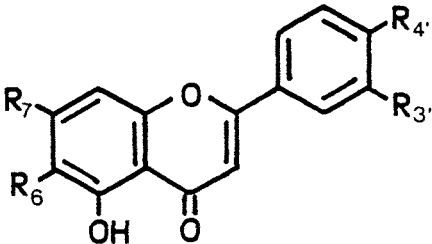
No se ha podido incluir entre las mismas la 7-O-Me-luteolina (sustancia B, aislada de *Salvia candelabrum*) debido a la degradación que sufrió en las etapas de estudio de su estructura.

Se han analizado, también, los extractos de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* y *Salvia candelabrum*, cuyo estudio más profundo se describe en los capítulos V y VI, respectivamente, para apreciar el nivel de detección de los sistemas y condiciones utilizados.

### VII.2.- OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS.

Los extractos han sido obtenidos a partir de 10 g de hojas desecadas, según la pauta esquematizada en la figura VII-1, tomada de MARTÍNEZ-VERGÉS (1980) y modificada. En síntesis, se trata de efectuar una extracción hidrometanólica, eliminar el metanol y fraccionar la solución acuosa así obtenida con éter de petróleo y éter etílico. Este último extracto se divide en dos porciones iguales, una de las cuales se fracciona con bicarbonato sódico, que ioniza los ácidos fenoles y se consigue, así, eliminarlos con la fase acuosa. Todos los extractos se purifican, finalmente, por filtración, a través de un cartucho de fase inversa C-18, que retiene la mayoría de clorofilas y gran parte de las sustancias más apolares que entorpecen el análisis cromatográfico. Los cartuchos se acondicionan previamente pasando unos 15 ml de MeOH 90% aq. y después de cada filtrado se lavan con unos 20 ml de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1) y unos 15 ml de MeOH 90% aq. dejándolos listos para un nuevo filtrado.

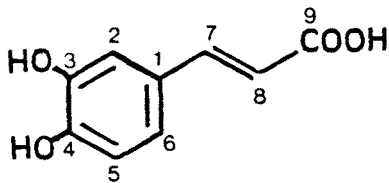
A) Flavonas



	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	Nombre trivial	Procedencia
1	-H	-OH	-H	-OH	Apigenina	1, 2, 3
2	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	Genkwanina	1, 2
3	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	4'-O-Metilgenkwanina.	3
4	-H	-OH	-OH	-OH	Luteolina	1, 2, 3
5	-H	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	Diosmetina	4
6	-H	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	Crisoeriol	5
7	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	Hispidulina	1
8	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	Cirsimaritina	1
9	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	Salvigenina	1, 3
10	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	Nepetina	1
11	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	Eupatorina	1

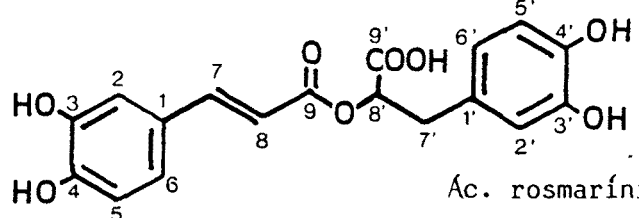
B) Ácidos fenoles.

12



Ác. caféico 6

13



Ác. rosmarínico 1, 7

TABLA VII-1: Estructura y origen de las sustancias patrón utilizadas en el estudio comparativo de especies de *Salvia*. 1: Aislado de la muestra nº20 (*Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*). 2: Aislado de la muestra nº19 (*S. candelabrum*). 3: Aislado de *S. verbenaca* [CAÑIGUERAL, 1982]. 4: Sarsyntex<sup>R</sup>. 5: Dr. Wagner (Munich). 6: Fluka<sup>R</sup>. 7: Dr. Andary (Montpellier).

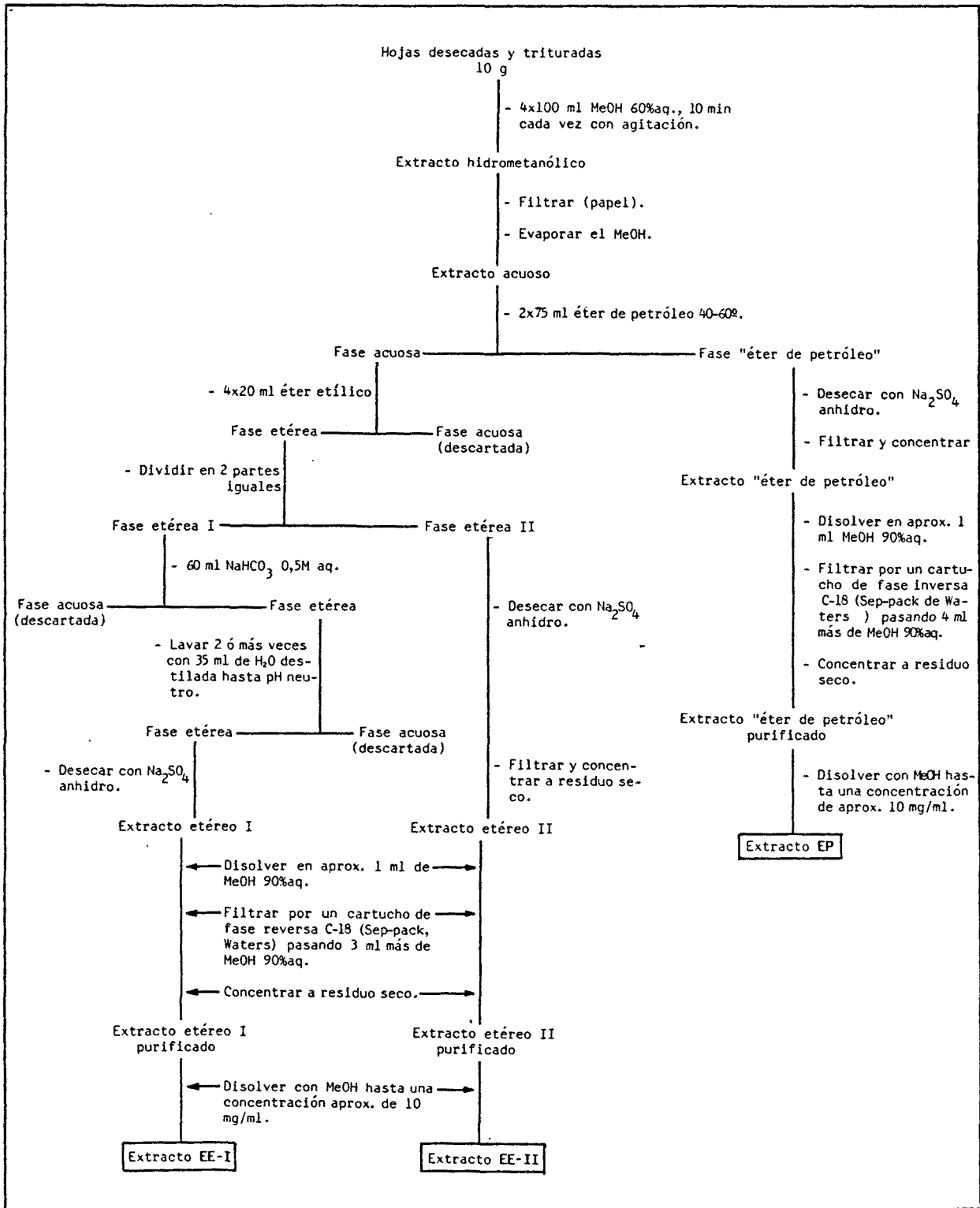


FIGURA VII-1: Obtención y purificación de extractos para el análisis comparativo de salvias.

No puede despreciarse el extracto "éter de petróleo", que algunos autores utilizaban únicamente para desengrasar y desechaban, porque en nuestro caso extrae los aglicones flavónicos más apolares. Hemos observado que este extracto concentra de forma bastante selectiva la salvigenina y la 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona.

En el caso del extracto etéreo, el tratamiento de parte del mismo con NaHCO<sub>3</sub> es interesante por dos motivos:

- Permite eliminar sustancias ácidas (principalmente ácidos fenoles) que podrían interferir en los análisis por TLC. Resulta útil cromatografiar paralelamente los extractos tratados y no tratados.
- En los análisis por HPLC, la notable disminución de intensidad e incluso eliminación de un pico en el cromatograma del extracto tratado con NaHCO<sub>3</sub> respecto al del no tratado, es un elemento diagnóstico más sobre la estructura ácida de las sustancias correspondientes, resultando de gran ayuda en la interpretación de los análisis (ver figura VII-3).

### VII.3.- ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS.

Los extractos han sido analizados por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución.

Los sistemas utilizados en cromatografía en capa fina han sido los siguientes:

CL-1: Celulosa/AcOH 50%aq.

CL-2: Celulosa/AcOH 30%aq.

S-1: Silicagel/CHCl<sub>3</sub>:MeOH (93:7)

S-2: Silicagel/Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)

S-3: Silicagel/CHCl<sub>3</sub>:Hexano:MeOH (40:40:3)

El desarrollo cromatográfico ha sido de 18-19 cm en las placas de celulosa y de 8-9 cm en las de silicagel.

En cada placa, paralelamente a los extractos se han sembrado las sustancias patrón. En la tabla VII-2 se dan las características de revelado y R<sub>f</sub> de los patrones utilizados.

Para cada extracto se han efectuado 2 (extractos EP) ó 3 (extractos EE-I y EE-II) siembras contiguas con distintos volúmenes de extracto (aproximadamente, 10 a 100 μl).

•

	REVELADO		Rf X 100 TLC					HPLC
	UV366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	CL-1	CL-2	S-1	S-2	S-3	tr (min)
1 Apigenina	VO	A	70	28	26	25	7	19,96
2 Genkwanina	VO	A	81	29	42	41	19	25,79
3 5-OH-7,4'-(OMe) <sub>2</sub> - flavona	VO	A	81	26	73	65	58	27,45
4 Luteolina	VO	A	56	21	16	13	4	15,62
5 Diosmetina	VO	A	67	25	32	29	10	21,70
6 Crisoeriol	VO	A	67	26	31	32	10	21,03
7 Hispidulina	VO	VO	79	37	29	33	10	21,03
8 Cirsimaritina	VO	VO	89	49	40	35	16	24,13
9 Salvigenina	VO	VO	92	46	72	58	52	26,47
10 Nepetina	VO	VO	65	28	19	18	5	17,01
11 Eupatorina	VO	VO	87	46	56	39	24	24,66
12 Ácido caféico	AF	AF	75	68	5	17	0	2,30
13 Ácido rosmarínico	AF	ALF	84	78	0	2	0	6,27

TABLA VII-2: Comportamiento cromatográfico de las sustancias patrón.  
A: Amarillo; AF: Azul fluorescente; ALF: Azul-lila fluorescente; VO: violáceo oscuro. Para los sistemas de TLC y condiciones de HPLC, ver texto.

Las placas ya eluidas se han observado a la luz UV de 254 nm y 366 nm y a 366 nm después de revelar con AlCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub>O al 6% en MeOH.

Los análisis por HPLC se han llevado a cabo en las siguientes condiciones:

- Columna: 250 x 4,6 mm, rellena de Spherisorb ODS-2 (fase inversa tipo C-18) de 5 m.
- Eluyente: Bomba A: MeOH  
Bomba B: AcOH 5% en H<sub>2</sub>O
- Elución: Temperatura: 40°C  
Flujo: 2,4 ml/min  
Presión de trabajo: entre 3700 psi (inicial) y 1700 psi (final)



t = 0-8 min 30% A, isocrática.  
t = 8-9 min gradiente de 9%A/min.  
t = 9-15 min isocrática (39% A).  
t = 15-16 min gradiente de 9%A/min.  
t = 16-20 min isocrática (48% A)  
t = 20 min gradiente de 9%A/min hasta llegar al 99% A, (aprox.  
t = 25,67 min), momento en el que se mantiene la isocrática hasta el final del cromatograma.

Duración del cromatograma: 30 min.

- Detección: 340 nm.
- Volumen inyectado: 3-5  $\mu$ l (extracto EP) y 5-10  $\mu$ l (extractos EE-I y EE-II). Las muestras han sido filtradas, previamente a su inyección, a través de filtros Millipore de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro.

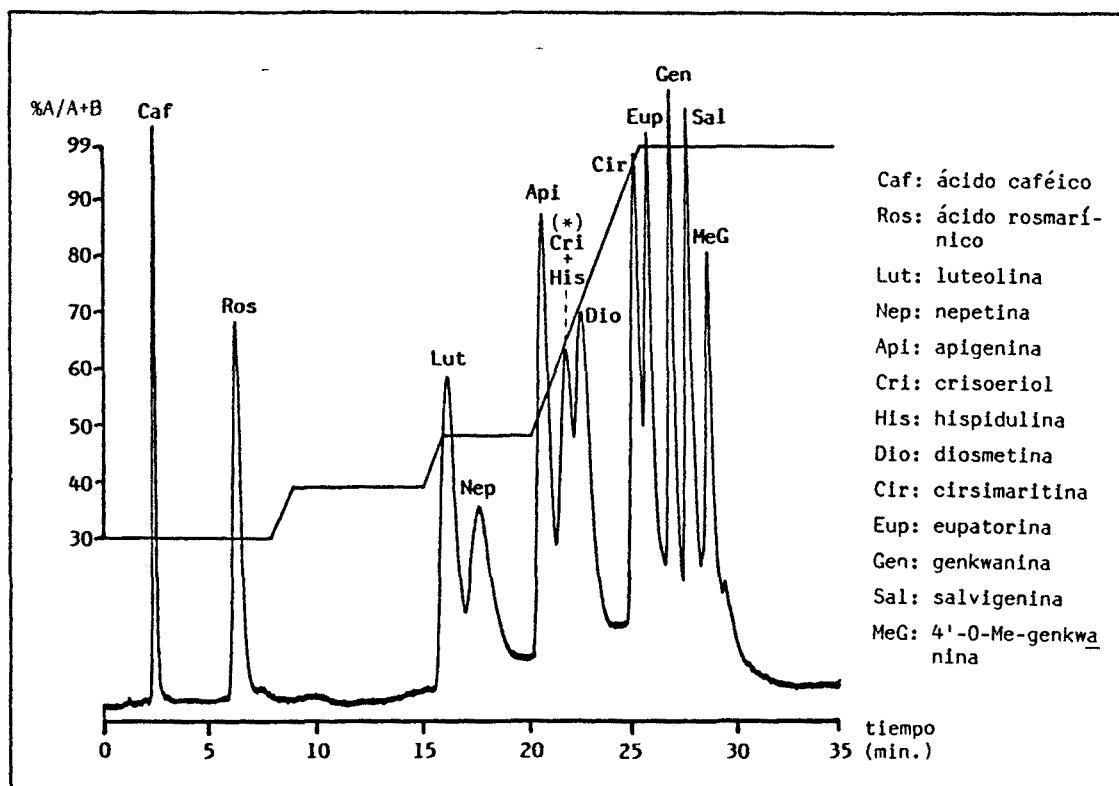


FIGURA VII-2: Cromatograma HPLC de las sustancias patrón y composición del eluyente durante el mismo. A: MeOH; B: AcOH 5% en H<sub>2</sub>O. (\*): Crisoeriol e hispidulina dan un solo pico en HPLC, pero se distinguen una de otra en TLC, principalmente por su revelado.

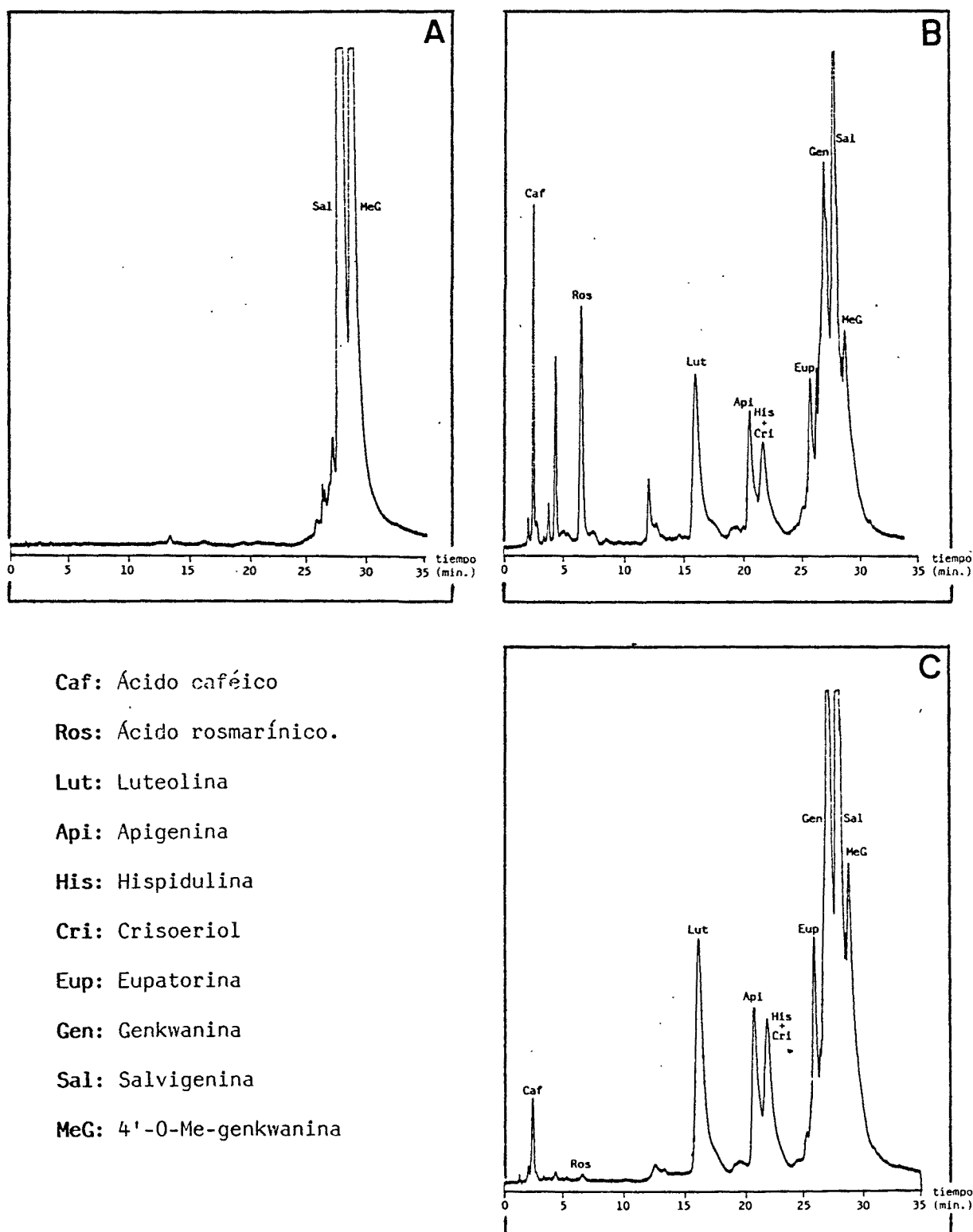


FIGURA VII-3: Cromatogramas HPLC de los extractos EP (A), EE-II (B) y EE-I (C) de *Salvia argentea* L. subsp. *patula* (Desf.) Maire (muestra nº 4).

En la tabla VII-2 se resumen los tiempos de retención de las sustancias patrón en las condiciones analíticas descritas. En la figura VII-2 se muestra el cromatograma de las sustancias patrón y la composición del eluyente durante el mismo, y en la figura VII-3, los cromatogramas de los tres extractos analizados de *Salvia argentea* subsp. *patula* (muestra nº4). En él se observa como:

- La salvigenina y la 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona se concentran especialmente en el extracto EP, donde la cantidad de otras flavonas apolares es muy reducida o inapreciable.
- Los picos de los ácidos caféico y rosmarínico, apreciables en el cromatograma del extracto EE-II, disminuyen y casi desaparecen en el del EE-I, debido al tratamiento con NaHCO<sub>3</sub>.

#### VII.4.- RESULTADOS.

Los resultados del análisis de los táxones relacionados en la tabla III-1 (capítulo III) se resumen en la tabla VII-3.

Para cada taxon, la presencia de una sustancia determinada se indica con un número de cruces (de 1 a 5) que dan una idea de la abundancia de la misma, juzgada por el área del pico correspondiente en el cromatograma de HPLC y por la intensidad de la fluorescencia de la mancha que se observa en TLC.

**TABLA VII-3:** Resultados del estudio comparativo de la composición polifenólica de táxones del género *Salvia* L. En los nombres botánicos se han omitido los autores de las subespecies por razones de espacio; pueden consultarse, sin embargo, en la tabla III-1. Api: apigenina; Gen: genkwanina; MeG:4'-O-Me-genkwanina (5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona); Lut: luteolina; Dio: diosmetina; Cri: crisoeriol; His: hispidulina; Cir: cirsimaritina; Sal: salvigenina; Nep: nepetina; Eup: eupatorina; Caf: ácido caféico; Ros: ácido rosmarínico. -: no detectado; + a +++++: detectado en cantidades de menor a mayor. (\*): Se han detectado otros flavonoides, de los cuales no disponíamos de patrones.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	Api	Gen	MeG	Lut	Dio	Cri	His	Cir	Sal	Nep	Eup	Caf	Ros	
Sección <i>Aethiopsis</i> Bentham														
1	<i>S. aethiopsis</i> L.	++	+++	+++	++	-	++	+	-	++++	-	++	+++	++
2	<i>S. argentea</i> L.	+	++	++	++	-	++	+	-	++++	-	++	+++	+
3	<i>S. argentea</i> L.	++	+	+	++	-	++	+	-	++++	-	+	++++	+++
4	<i>S. argentea</i> L. subsp. <i>patula</i>	++	++	++++	+++	-	++	+	-	++++	-	++	+	++
5	<i>S. phlomoides</i> Asso	++	+	-	+++	-	+	-	-	+	-	-	++++	++++
6	<i>S. sclarea</i> L.	++	+	+++	++	-	+	-	-	+++	-	-	++++	++++
Sección <i>Hemisphace</i> Bentham														
7	<i>S. verticillata</i> L.	++	+	+	++	-	+	-	+	+++	-	++	+++	++++
8	<i>S. verticillata</i> L.	++	+	++	+	-	+	-	-	++	-	+	+++	++++
Sección <i>Horminum</i> Dumort														
9	<i>S. viridis</i> L.	++	-	-	++	-	+++	-	-	+	-	-	++	+
Sección <i>Hymenosphace</i> Bentham														
10	<i>S. canariensis</i> L.	+	+	-	++++	-	+++	-	-	+	-	+	+	+
Sección <i>Plethiosphace</i> Bentham														
11	<i>S. bicolor</i> Lam.	++	+	+	++++	-	-	-	-	+	-	-	+++	++
12	<i>S. nemorosa</i> L.	+	+	+	+	-	-	-	+	++	-	+	+++	++++
13	<i>S. nemorosa</i> L.	+	+	+	+	-	-	-	+	+++	-	+	++	+++
14	<i>S. verbenaca</i> L.	+	+	+++	+	-	-	-	-	++++	-	-	+++	++++
15	<i>S. valentina</i> L.	+	++	+	++	-	-	-	+(?)	+++	-	++	+++	++++
16	<i>S. virgata</i> Jacq.	+	-	+	+	-	-	-	-	++++	-	+	+++	+++
17	<i>S. viscosa</i> Jacq.	++	+	+	+++	-	++	-	+	++++	-	++	++++	++++
Sección <i>Potiles</i>														
18	<i>S. hispanica</i> L. (*)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+++	++++
Sección <i>Salvia</i> ( <i>Eusphace</i> Bentham)														
19	<i>S. candelabrum</i> Boiss.	++	+++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	++
20	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>lavandulifolia</i>	++	+	+	++	-	+	+	+++	++++	+	+++	++	+++
21	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i>	+	+	+	++	-	+	+	++	++++	+	+	+++	++++
22	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i>	+	+	-	++	-	+	+	+	++++	+	++	+++	++++
23	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i>	+	+++	+	++	-	-	+	+++	++++	+	++	+++	++++
24	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>oxyodon</i>	+	++	+	++	-	+	+	+++	++++	+	++	++	++++
25	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>pyrenaeorum</i>	+	+	-	++	-	+	+	+++	++++	+	+++	+++	+++
26	<i>S. lavandulifolia</i> Vahl subsp. <i>gallica</i>	+	++	+	+++	-	+	+	+++	++++	+	+++	++	++
Sección <i>Tiliifoliae</i>														
27	<i>S. tiliifolia</i> Vahl (*)	-	-	-	-	-	-	-	+(?)	+	-	-	++	+

TABLA VII-3: Resultados del estudio comparativo. Ver leyenda en la página anterior.



## Capítulo VIII:

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

1. *Introducción.*
2. *Investigación de *Salvia lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia*.*
3. *Investigación de *Salvia candelebrum* Boiss.*
4. *Estudio comparativo.*
5. *Características flavónicas del género.*



### VIII.1.- INTRODUCCIÓN.

Para la discusión de los resultados será útil conocer los trabajos realizados por otros autores sobre la composición flavónica de especies del género *Salvia* L., que se resumen en la tabla VIII-1. Las estructuras de los aglicones flavónicos que en ella se mencionan quedan recogidos en la tabla VIII-3 del apartado VIII-5.

La discusión de los resultados va a efectuarse siguiendo el orden en que han sido expuestos en la parte experimental.

### VIII.2.- INVESTIGACIÓN DE SALVIA LAVANDULIFOLIA VAHL SUBSP. LAVANDULIFOLIA.

Se han aislado de las hojas de esta subespecie, cuyos polifenoles no habían sido investigados anteriormente, 14 sustancias: 9 aglicones flavónicos (luteolina, apigenina, genkwanina, 4'-O-Me-genkwanina, salvigenina, cirsimaritina, eupatorina, nepetina e hispidulina), 4 heterósidos (7-O- $\beta$ -D-glucosil-luteolina, 3-O- $\beta$ -D-glucosil-quercetina, 7-O-(6-O- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosil)-luteolina, y 4'-O-diglucuronil-luteolina) y un derivado del ácido caféico, el ácido rosmarínico.

Los 9 aglicones habían sido citados ya en otras especies de *Salvia* (ver tabla VIII-1); algunos, en pocas ocasiones. Así, la eupatorina, que anteriormente había sido hallada en *S. lavanduloides* HBK por RODRÍGUEZ et al. (1974), es la segunda vez que se aísla en el género. La 4'-O-Me-genkwanina (5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona), que fue obtenida por primera vez de *Salvia* en nuestro laboratorio a partir de las hojas de *S. verbenaca* [CAÑIGUERAL, 1982; CAMARASA et al., 1982], fue aislada posteriormente de *S. palestina* Bentham por MISKI et al. (1983). También, la hispidulina había sido obtenida de especies de *Salvia* solamente en dos ocasiones: de *S. officinalis* L. [BRIESKORN & BIECHELE, 1971a] y de *S. plebeia* [TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972].

Por lo que se refiere a los tipos de substitución de estas flavonas, cabe señalar que siguen los rasgos característicos de las flavonas de la familia *Labiatae*, descritos por ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981): metoxilaciones (7 de las 9 flavonas de *S. lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* presentan radicales de este tipo) y 6-OR substitución (5 de los 9 tienen un grupo metoxilo en la posición 6).



ESPECIE	FLAVONOIDE	REFERENCIA
1.- <i>S. aethiopsis</i> L.	Salvigenina 5-OH-7,3',4'-(OMe) <sub>3</sub> -flavona	ULUBELEN & UYGUR, 1976 ULUBELEN & UYGUR, 1976
2.- <i>S. argentea</i> L.	Ausencia de flavonoides	SEMRAU, 1958
3.- <i>S. coccinea</i>	Luteolina	SEMRAU, 1958
4.- <i>S. deserta</i>	7-O-glucosil-luteolina 7-O-β-D-glucosil-crisoeriol 7-O-β-D-xilosil-apigenina 7-O-β-D-xilosil-crisoeriol	SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974
5.- <i>S. fruticosa</i> Miller (= <i>S. triloba</i> L. fl.)	Salvigenina Jaceosidina 7-O-glucosil-apigenina 7-O-glucosil-luteolina 7-O-glucosil-hispidulina 7-O-glucosil-nepetina 7-O-glucuronil-apigenina 7-O-glucuronil-luteolina 7-O-glucuronil-hispidulina 7-O-glucuronil-nepetina 7-O-glucuronil-crisoeriol 7-O-diglucosil-luteolina 7-O-glucuronil-3'-O-glucosil-luteolina 6,8-di-C-glucosil-apigenina	ULUBELEN et al., 1968 BRIESKORN & BIECHELE, 1971b ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983 ABDALLA et al., 1983
6.- <i>S. glutinosa</i> L.	Apigenina Genkwanina Isokaempferidonina kumatakenina Aianina Retusina	WOLLENWEBER, 1974 WOLLENWEBER, 1974 WOLLENWEBER, 1974 WOLLENWEBER, 1974 WOLLENWEBER, 1974 WOLLENWEBER, 1974
7.- <i>S. grandiflora</i> Etlinger ( <i>S. tomentosa</i> Mill.)	Cirsimaritina Luteolina Diosmetina Nepetina Jaceosidina Eupatilina Cirsilineol 5-OH-6,7,3',4'-(OMe) <sub>4</sub> -flavona 7-O-glucosil-luteolina 7-O-glucosil-nepetina 7-O-β-D-glucosil-6-OH-luteolina 5-O-β-D-glucosil-6-OH-luteolina	ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1981b ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1981b ULUBELEN et al., 1981b ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1979 ULUBELEN et al., 1981b ULUBELEN et al., 1981b
8.- <i>S. heerii</i>	Apigenina Luteolina	SEMRAU, 1958 SEMRAU, 1958
9.- <i>S. kopetdaghensis</i>	Apigenina Luteolina 7-O-glucosil-apigenina 7-O-glucosil-luteolina 7-O-β-D-glucuronil-crisoeriol 7-O-β-D-xilosil-apigenina 7-O-β-D-xilosil-crisoeriol	SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974 SMIRNOVA et al., 1974
10.- <i>S. kopolnoi</i>	Apigenina Luteolina 7-O-glucosil-luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972 SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972 SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
11.- <i>S. lavanduloides</i> HBK	Eupatorina 5-OH-6,7,3',4'-(OMe) <sub>4</sub> -flavona	RODRÍGUEZ et al., 1974 RODRÍGUEZ et al., 1974

TABLA VIII-1: Antecedentes en el estudio de flavonoides de especies del género *Salvia* L.

ESPECIE	FLAVONOIDE	REFERENCIA
12.- <i>S. limbata</i>	Apigenina	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
	Luteolina	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
	7-O-glucosil-apigenina	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
	7-O-glucosil-luteolina	SHAMSUDINOV & DZHUMYRKO, 1979
13.- <i>S. nemorosa</i> L.	Apigenina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
	Luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
	7-O-glucosil-luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972
14.- <i>S. nutans</i>	Luteolina	CELLA & PROKOSHEVA, 1970
	Diosmetina	CELLA & PROKOSHEVA, 1970
15.- <i>S. officinalis</i> L.	Apigenina	SEMRAU, 1958
	Luteolina	SEMRAU, 1958
	Genkwanina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	Hispidulina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	Cirsimaritina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	5,6,7,4'-(OMe) <sub>4</sub> -flavona	BRIESKORN & KAPADIA, 1979
	Nepetina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	Cirsiliol	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	Heterósido de luteolina	LALLEMENT-GUILBERT & BEZANGER-BEAUQUESNE, 1970
	Heterósido de apigenina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	Heterósido de nepetina	LALLEMENT-GUILBERT & BEZANGER-BEAUQUESNE, 1970
	Heterósido de 5,3',4'-(OH) <sub>3</sub> -7-OMe-flavona	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
	Heterósido de 6-OH-luteolina	BRIESKORN & BIECHELE, 1971a
16.- <i>S. palestina</i> Benth	Apigenina	MISKI et al., 1983
	Luteolina	MISKI et al., 1983
	Genkwanina	MISKI et al., 1983
	5-OH-7,4'-(OMe) <sub>2</sub> -flavona	MISKI et al., 1983
	Salvigenina	MISKI et al., 1983
	Eupatilina	MISKI et al., 1983
	Pillofina	MISKI et al., 1983
	Cirsimaritina	MISKI et al., 1983
	6,7,3',4'-(OMe) <sub>4</sub> -flavona	MISKI et al., 1983
	Crisoeriol	MISKI et al., 1983
	7-O-glucosil-apigenina	MISKI et al., 1983
	7-O-glucosil-luteolina	MISKI et al., 1983
	7-O-glucosil-crisoeriol	MISKI et al., 1983
	7-O-glucuronil-apigenina	MISKI et al., 1983
7-O-glucuronil-luteolina	MISKI et al., 1983	
7-O-glucuronil-crisoeriol	MISKI et al., 1983	
17.- <i>S. patens</i>	Apigenina	SEMRAU, 1958
	Luteolina	SEMRAU, 1958
18.- <i>S. pinnata</i> L.	Apigenina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984
	Luteolina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984
	Nepetina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984
	7-O-glucosil-luteolina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984
	7-O-glucosil-apigenina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984
	3-O-glucosil-quercetina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984
19.- <i>S. plebeia</i>	Hispidulina	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
	Salvitina	GUPTA et al., 1975
	Nepetina	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
	7-O-glucosil-hispidulina	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
	7-O-glucosil-nepetina	TSANG-HSIUNG & KUO-TUNG, 1972
20.- <i>S. pomifera</i> L. (= <i>S. calycina</i> Sibth. & Sm.)	Apigenina	DOGANIS, 1971
	Luteolina	DOGANIS, 1971

TABLA VIII-1 (continuación): Antecedentes en el estudio de flavonoides de especies del género *Salvia* L.

ESPECIE	FLAVONOIDE	REFERENCIA	
21.- <i>S. pratensis</i> L.	Existencia de 2 compuestos antociánicos	SAVIN & IVANIC, 1973	
22.- <i>S. sclarea</i> L.	Apigenina	SEMRAU, 1958	
	Luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972 SEMRAU, 1958	
	7-0-glucosil-luteolina	SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972 SAGDULLAEVA & KHAZANOVICH, 1972	
23.- <i>S. seravschanica</i>	Luteolina	SMIRNOVA et al., 1974	
	7-0-glucosil-luteolina	SMIRNOVA et al., 1974	
	7-0-glucosil-apigenina	SMIRNOVA et al., 1974	
	7-0-β-D-glucosil-crisoeriol	SMIRNOVA et al., 1974	
	7-0-β-D-glucuronil-luteolina	SMIRNOVA et al., 1974	
	7-0-β-D-glucuronil-crisoeriol	SMIRNOVA et al., 1974	
	7-0-β-D-xilosil-apigenina	SMIRNOVA et al., 1974	
24.- <i>S. splendens</i>	Luteolina	SEMRAU, 1958	
	Pelargonidina	ASEN, 1961	
	Cianidina	SHIBATA et al., 1966 ASEN, 1961	
	Delfinidina	SHIBATA et al., 1966 ASEN, 1961	
	3,5-0-diglucosil,malonil-delfinidina	SHIBATA et al., 1966	
	3,5-0-diglucosil,p-cumaroil-delfinidina	SHIBATA et al., 1966	
	3,5-0-diglucosil,p-cumaroil-cianidina	SHIBATA et al., 1966	
	3,5-0-diglucosil,p-cumaroil-pelargonidina:	SHIBATA et al., 1966	
	25.- <i>S. verbenaca</i> L.	Apigenina	CAÑIGUERAL, 1982
		Luteolina	CAÑIGUERAL, 1982
5-OH-7,4'-(OMe) <sub>2</sub> -flavona		CAÑIGUERAL, 1982	
Salvigenina		CAÑIGUERAL, 1982	
Cirsiliol		SALEH & NAZMI, 1980	
26.- <i>S. verticillata</i> L.	5-0-glucosil-cirsiliol	SALEH & NAZMI, 1980	
	Existencia de 2 compuestos antociánicos	SAVIN & IVANIC, 1973	
	Cirsimaritina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984	
	7-0-glucosil-luteolina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984	
27.- <i>S. viridis</i> L. ( <i>S. horminum</i> L.)	5-0-glucosil-6-OH-luteolina	ULUBELEN & TOPÇU, 1984	
	Quercetina	CORNU & PAYNOT, 1969	
	Kaempferol	CORNU & PAYNOT, 1969	
	3-0-(p-cumaroil-glucosil)-5-0-glucosil-pelargonidina	CORNU & PAYNOT, 1969	
	3-0-(p-cumaroil-glucosil)-5-0-glucosil-cianidina	CORNU & PAYNOT, 1969	
	3-0-(p-cumaroil-glucosil)-5-0-glucosil-delfinidina	CORNU & PAYNOT, 1969	
	3-0-(p-cumaroil-glucosil)-5-0-glucosil-petunidina	CORNU & PAYNOT, 1969	
3-0-(p-cumaroil-glucosil)-5-0-glucosil-malvidina	CORNU & PAYNOT, 1969		
3-0-(p-cumaroil-glucosil)-5-0-glucosil-paeonidina	CORNU & PAYNOT, 1969		
28.- <i>S. virgata</i> Jacq.	Salvigenina	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975	
	5-OH-7,3',4'-(OMe) <sub>3</sub> -flavona	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975	
	5-0-glucosil-salvigenina	ULUBELEN & AYANOGLU, 1975	

TABLA VIII-1 (continuación): Antecedentes en el estudio de flavonoides de especies del género *Salvia* L.

En cuanto a los heterósidos flavónicos, la 7-0- $\beta$ -D-glucosil-luteolina es el más frecuente no sólo en el género *Salvia*, sino en la familia *Labiatae*.

La 3-0- $\beta$ -D-glucosil-quercetina es la segunda vez que se aísla de especies de *Salvia*, ya que recientemente lo ha sido por ULUBELEN & TOPÇU (1984) de *S. pinnata* L.

Sin embargo, en el presente trabajo se identifican por primera vez en el género *Salvia* la 7-0-(6-0- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosil)-luteolina y la 4'-0-diglucuronil-luteolina, si bien la primera ha sido citada en otros géneros de *Labiatae* (*Mentha aquatica*, *Mentha longifolia*, *Satureia obovata*, *Teucrium gnaphaloides* y *Sideritis montana* [BARBERÁN, 1986]).

En cambio, la 4'-0-diglucuronil-luteolina, no figura en la reciente revisión de flavonoides de *Labiatae* de BARBERÁN (1986) ni en las listas de heterósidos de flavonas y flavonoles conocidos de HARBORNE & WILLIAMS (1975 y 1982). Se trata, pues, de un nuevo heterósido para esa familia y quizás de un nuevo producto natural, hecho que deberá ser confirmado, en su caso, por una profunda revisión de los heterósidos descritos en los últimos años en otras familias.

Por último, el ácido rosmarínico, presente en muchas Labiadas hasta el punto de ser llamado el "tanino de las Labiadas", fue ya descrito por Herrmann en *S. officinalis* L., que lo contiene en proporciones del 2 al 3% [HERRMANN, 1960].

### VIII.3.- INVESTIGACIÓN DE SALVIA CANDELABRUM BOISS.

Nueve polifenoles, a saber, ocho flavonoides (cinco aglicones y tres heterósidos) y un diterpeno abietánico, han sido aislados por nosotros de esta especie, de la cual, hasta ahora, sólo había sido parcialmente estudiada su esencia [GARCÍA-VALLEJO et al., 1975].

De los cinco aglicones, cuatro han sido identificados como luteolina, apigenina, genkwanina y 7-0-Me-luteolina. Los tres primeros son ya conocidos en otras especies de *Salvia* (ver tabla VIII-1) y su presencia es frecuente en *Labiatae*, principalmente la luteolina y la apigenina.

La 7-0-Me-luteolina, sin embargo, es la primera vez que se obtiene en forma libre en el género y la segunda en la familia (la

primera recientemente en *Thymus membranaceus* Boiss. [FERRERES. et al., 1985], aunque un heterósido de la misma fue aislado de *Salvia officinalis* L. por BRIESKORN & BIECHELE (1971a).

La estructura que se propone para el quinto aglicón es la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7,3'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona. Sin embargo, su confirmación precisará un nuevo aislamiento.

Los heterósidos se han identificado como la 7-0-β-D-glucosil-luteolina, la 7-0-diglucuronil-luteolina y la 7-0-(glucosil-glucuronil)-apigenina.

El primero, la 7-0-β-D-glucosil-luteolina, está ampliamente distribuido en la familia **Labiatae**.

En cambio, la 7-0-diglucuronil-luteolina es nueva para el género *Salvia*, aunque no para las Labiadas, donde ha sido citada en una única ocasión por Husain et al. [citado en BARBERÁN, 1986] en especies de *Origanum*.

Por lo que se refiere a la 7-0-(glucosil-glucuronil)-apigenina, atendiendo a la revisión de BARBERÁN (1986), es nuevo para la familia **Labiatae**, y dado que no figura en las listas de heterósidos de flavonas y flavonoles conocidos de HARBORNE & WILLIAMS (1975 y 1982), bien podría tratarse de un nuevo producto natural. Existen pocos heterósidos que contengan la combinación azúcar-ácido urónico, siendo la más frecuente la ramnosil-glucuronil-. Por lo que se refiere a la de nuestro heterósido, únicamente conocemos la 7-glucosil-glucuronil-luteolina (hallada en *Digitalis purpurea*) y el 7-p-cumaroil-glucosil-glucuronil-crisoeriol (aislado de *Tanacetum corymbosum*) [HARBORNE & WILLIAMS, 1975 y 1982].

Finalmente, el diterpeno abietánico ha sido identificado como el 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trien-3,7-diona, resultando ser a la luz de nuestros conocimientos a partir de una profunda búsqueda bibliográfica, un nuevo producto natural.

Numerosos diterpenos se han hallado en especies de *Salvia*. Sus esqueletos son diversos: pimarano, clerodano, neoclerodano, abietano; siendo los dos últimos los más frecuentes. En la tabla VIII-2 se resumen las especies de *Salvia* donde se habían citado diterpenos de núcleo abietánico. Muchos de ellos presentan un anillo aromático hidroxilado (son

<i>S. aethiopsis</i> L.	BOYA & VALVERDE (1981) RODRÍGUEZ et al. (1984)
<i>S. ballotaeflorae</i> Benth.	DOMÍNGUEZ et al. (1976) TAIRA & WATSON (1976) WATSON et al. (1976)
<i>S. canariensis</i> L.	GONZÁLEZ et al. (1973 y 1975) SAVONA & BRUNO (1983) FRAGA et al. (1985 y 1986)
<i>S. fruticosa</i> Mill. (= <i>S. triloba</i> L.)	· ULUBELEN et al. (1968)
<i>S. lanata</i> Roxb.	· MUKHERJEE et al. (1981 y 1983)
<i>S. lonigera</i> Poir.	AL-HAZIMI et al. (1984)
<i>S. lavandulifolia</i> Vahl	ESCUDERO et al. (1983) MICHAVILA et al. (1986)
subsp. <i>oxyodon</i> (= <i>S. oxyodon</i> )	ESCUDERO et al. (1983)
<i>S. moorcraftiana</i> Wall.	BAKSHI et al. (1984)
<i>S. officinalis</i> L.	BRIESKORN & FUCHS (1962) LINDE (1964) BRIESKORN et al. (1964) BRIESKORN (1973) DOBRYNIN et al. (1976)
<i>S. phlomoides</i> Asso	HUESO-RODRÍGUEZ et al. (1983)
<i>S. pratensis</i> L.	BRIESKORN (1973)
<i>S. tomentosa</i> Mill.	ULUBELEN et al. (1981a)

TABLA VIII-2: Especies de *Salvia* de las que se han aislado diterpenos abietánicos. Además, la presencia de roileanonas (fenantrenquinonas de núcleo abietánico) en 39 especies de *Salvia*, ha sido puesta de manifiesto por PATUDIN et al. (1974).

pues, sustancias fenólicas o polifenólicas), que con frecuencia se halla en forma diquinónica (caso de las roileanonas, por ejemplo), tanto orto- como para-. En nuestro caso, sin embargo, la forma hidroxílica está estabilizada por la existencia de un puente de hidrógeno entre el 14-OH y el carbonilo de la posición 7 [RUEDI & EUGSTER, 1981].

Un isómero de posición del diterpeno aislado de *S. candelabrum* fue obtenido de otra labiada, el *Plectranthus myrianthus*, por MIYASE et al. (1977). Se trata del coleon V ó 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trieno-6,7-diona, que difiere de aquél por la posición del grupo carbonilo, situado en 6 en el coleon V y en 3 en el diterpeno de *S. candelabrum*, que en consecuencia es un isocoleon V.

#### VIII-4: ESTUDIO COMPARATIVO.

Los resultados de este estudio son los que figuran en la tabla VII-3, a partir de la cual resultan interesantes los siguientes comentarios:

##### A) NUEVAS APORTACIONES A LA COMPOSICIÓN FLAVÓNICA DE TÁXONES DE SALVIA L.

Se dan, por primera vez, datos sobre la composición flavónica de diez táxones: *S. phlomoides*, *S. canariensis*, *S. bicolor*, *S. valentina*, *S. viscosa*, *S. hispanica*, *S. lavandulifolia* subsp. *oxyodon*, *S. lavandulifolia* subsp. *pyrenaeorum*, *S. lavandulifolia* subsp. *gallica* y *S. tiliifolia*, además de los dos ya estudiados en los capítulos V y VI: *S. lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* y *S. candelabrum*.

Por lo que se refiere a los demás táxones analizados, cabe destacar que en uno de ellos, *S. argentea*, SEMRAU (1958) había señalado explícitamente la ausencia de flavonoides. En el presente trabajo se demuestra la existencia de, al menos, ocho aglicones flavónicos libres en esta especie y en su subsp. *patula*.

Por último, se realizan nuevas aportaciones a la composición de siete táxones, que habían sido estudiados con anterioridad de forma parcial: *S. aethiopsis*, *S. sclarea*, *S. verticillata*, *S. viridis*, *S. nemorosa*, *S. verbenaca* y *S. virgata*.

## B) PERFIL POLIFENÓLICO DEL CONJUNTO DE ESPECIES ESTUDIADAS.

En conjunto, los táxones estudiados mantienen una composición polifenólica relativamente homogénea. Los ácidos caféico y rosmarínico aparecen, en proporciones diversas, en todos ellos, lo que apoya la presencia general en el género del segundo y la ubicuidad del primero.

Ninguna flavona aparece en la totalidad de táxones; sin embargo, luteolina, apigenina y salvigenina han sido hallados en 20 de los 21 estudiados.

Dos especies rompen, en este sentido, la homogeneidad del conjunto: *S. tiliifolia*, que si bien contiene una pequeña cantidad de salvigenina, no se han detectado en ella luteolina ni apigenina, flavonas prácticamente omnipresentes en el género *Salvia*, y, en menor grado, *S. candelabrum*, en la que no se ha detectado ningún aglicón libre substituido en la posición 6, lo que podría replantear la inclusión de esta especie en la sección *Salvia* (*Eusphace* Benthams), en cuyas especies (*S. lavandulifolia*, *S. officinalis*, *S. fruticosa*, *S. pinnata*, *S. grandiflora*) es general la presencia de este tipo de flavonas. *S. candelabrum* contiene, además, el diterpeno abietánico isómero del coleon V, y otras sustancias de características cromatográficas similares que no han sido detectadas en ninguno de los táxones estudiados, si hacemos excepción de la muestra nº23, que se comenta más adelante, junto con las subespecies de *S. lavandulifolia*.

Por otra parte, el establecimiento de diferenciaciones claras entre las secciones a partir de la dotación flavónica de sus especies, requeriría, a nuestro entender, el aumento tanto del número de especies estudiadas de cada sección y poblaciones de las mismas, como de los caracteres químicos estudiados.

## C) SECCIÓN AETHIOPIS BENTHAM.

En esta sección se aprecian dos grupos de especies por su dotación flavónica, según la presencia o ausencia de hispidulina y eupatorina: *S. aethiopis* y *S. argentea* (incluida la subsp. *patula*) contienen estas dos flavonas, mientras que no han sido detectadas en *S. phlomoides* y *S. sclarea*. Estas últimas, a su vez, se diferencian por la ausencia en la primera y presencia en la segunda de la 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona.



#### D) SECCIÓN HEMISPHERE BENTHAM.

Se han investigado dos muestras de una sola especie de esta sección, *S. verticillata*. Se observa una composición flavónica idéntica, a excepción de la presencia de cirsimarina en una de ellas, flavona ya citada por ULUBELEN & TOPÇU (1984) en *S. verticillata*.

#### E) SECCIÓN PLETHIOSPHACE BENTHAM.

Lo más notable entre las especies estudiadas de esta sección es la abundancia de crisoeriol en *S. viscosa*, que la distingue del resto.

#### F) SECCIÓN SALVIA (EUSPHACE BENTHAM).

Ya se ha comentado en el apartado B la situación especial de *S. candelabrum*.

Hemos tenido ocasión de estudiar, además, las cuatro subespecies europeas de *S. lavandulifolia*. Éstas presentan, salvo pequeñas diferencias en algunas flavonas minoritarias (posiblemente debidas a los límites de detección de los análisis), una dotación flavónica similar. Este hecho avala la situación de estos táxones como subespecies de *S. lavandulifolia* y no como especies separadas, según se había propuesto, por ejemplo para la subsp. *oxyodon* (*S. oxyodon* Webb & Heldrich).

Es interesante señalar el caso especial de la muestra nº23, clasificada por el Dr. Lippert como *S. lavandulifolia* subsp. *oxyodon*. Esta muestra, si bien presenta una dotación flavónica similar a otras de este taxon, sus cromatogramas en capa fina reflejan la existencia de sustancias de comportamiento cromatográfico parecido al del diterpeno abietánico de *S. candelabrum*. Todo ello apunta que pueda tratarse de un híbrido de los dos táxones, que se encuentra ya descrito y es *S. hegelmaieri* Porta & Rigo (1891). La localidad clásica de este híbrido se encuentra en la Sierra de Alcaraz (Albacete) y la muestra nº23 fue recolectada en Fuente Higueras, en la carretera que se dirige hacia dicha sierra, a unos 15 Km de la misma. Sería necesaria una nueva revisión del material de herbario para confirmar la adscripción taxonómica de esta muestra, así como un estudio más profundo de su fracción diterpénica y de la de *S. candelabrum* para confirmar las similitudes químicas.

Por último, la presencia de cantidades importantes de salvigenina en todas las subespecies de *S. lavandulifolia*, considerada en ocasiones como una subespecie de *S. officinalis*, marca una clara separación entre ambas ya que *S. officinalis* carece de la misma [BRIESKORN & BIECHELE, 1971b]. Estos mismos autores, precisamente proponen un método de diferenciación entre *S. officinalis* y *S. fruticosa* (= *S. triloba*) o de reconocimiento de adulteraciones de la primera por la segunda, basado en la detección de esta flavona, presente en *S. fruticosa* y ausente en *S. officinalis*.

#### G) SECCIONES POTILES Y TILIIFOLIAE.

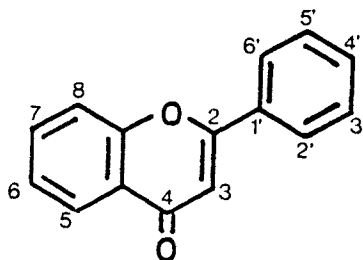
Se trata de dos secciones monotípicas americanas, cuyas especies (*S. hispanica* y *S. tiliifolia*, respectivamente) se hallan sistemáticamente muy aisladas de las del Viejo Mundo (I.C.HEDGE, comunicación personal). Los resultados fitoquímicos obtenidos corroboran esta idea, para *S. tiliifolia*, en la que no se ha detectado ninguna de las flavonas más comunes de las Labiadas, luteolina y apigenina. Estas dos especies contienen, además otros flavonoides distintos de los utilizados en el análisis comparativo efectuado, cuyo estudio seguramente podría aportar nuevos caracteres diferenciales respecto a las demás especies de *Salvia*.

#### VIII-5.- CARACTERÍSTICAS FLAVÓNICAS DEL GÉNERO.

Atendiendo a los datos aportados por otros autores, que figuran en la tabla VIII-1, y los resultados obtenidos en el presente trabajo, hemos confeccionado la tabla VIII-3. En ella se relacionan los aglicones flavónicos identificados hasta el momento en el género *Salvia* (ya en forma libre, ya heterosídica), sus estructuras, el número de especies en que se han determinado y el porcentaje sobre las estudiadas.

Dado que solamente se han investigado un 4% de las especies del género y la gran dispersión sistemática de los datos recopilados, resulta difícil establecer consideraciones quimiotaxonómicas definitivas. Sin embargo, es posible establecer a grandes rasgos la tendencia del género *Salvia* en cuanto a tipos de estructuras y substituciones de sus flavonoides. En este sentido, efectuaremos algunas puntualizaciones.

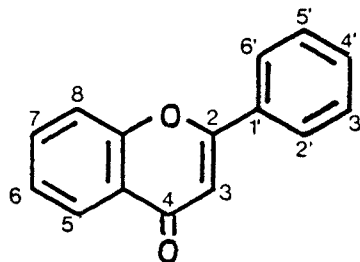
A) FLAVONAS.



	<u>-OH</u>	<u>-OMe</u>	<u>Nombre</u>	<u>Nº de especies</u>	<u>% sobre las estudiadas</u>
1	5,7,4'	-	Apigenina	30	81
2	5,4'	7	Genkwanina	16	43
3	5	7,4'	4'-O-Me-genkwanina	14	38
4	5,7,3',4'	-	Luteolina	34	92
5	5,3',4'	7	7-O-Me-luteolina	2	5
6	5,7,3'	4'	Diosmetina	2	5
7	5,7,4'	3'	Crisoeriol	15	41
8	5,3'	7,4'	Pilloina	1	3
9	5	7,3',4'	-	2	5
10	5,7,4'	6	Hispidulina (= Dinatina)	6	16
11	5,4'	6,7	Cirsimaritina (= Escrofuleina)	8	22
12	5	6,7,4'	Salvigenina (= Psatirotina)	19	51
13	-	5,6,7,4' -		1	3
14	-	6,7,3',4' -		1	3
15	5,8,4'	7	Salvitina	1	3
16	5,6,7,3',4'	-	6-OH-luteolina	1	3
17	5,7,3',4'	6	Nepetina (= Eupafolina)	6	16
18	5,7,4'	6,3'	Jaceosidina	2	5
19	5,3',4'	6,7	Cirsiliol	2	5
20	5,7	6,3',4'	Eupatilina	2	5
21	5,3'	6,7,4'	Eupatorina	11	30
22	5,4'	6,7,3'	Cirsilineol (= Anisomelina)	1	3
23	5	6,7,3',4' -		2	5

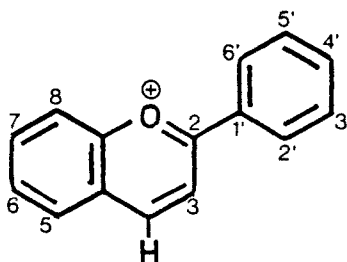
TABLA VIII-3: Estructura y frecuencia de los aglicones flavónicos encontrados hasta el momento en *Salvia L.*

B) FLAVONOLES.



	<u>-OH</u>	<u>-OMe</u>	<u>Nombre</u>	<u>Nº de especies</u>	<u>% sobre las estudiadas</u>
24	3,5,7,4'	-	Kaempferol	1	3
25	5,7,4'	3	Isokaempferidonina	1	3
26	5,4'	3,7	Kumataquenina	1	3
27	3,5,7,3',4'	-	Quercetina	3	8
28	5,3'	3,7,4'	Aianina	1	3
29	5	3,7,3',4'	Retusina	1	3

C) ANTOCIANIDINAS.



	<u>-OH</u>	<u>-OMe</u>	<u>Nombre</u>	<u>Nº de especies</u>	<u>% sobre las estudiadas</u>
30	3,5,7,4'	-	Pelargonidina	2	5
31	3,5,7,3',4'	-	Cianidina	2	5
32	3,5,7,4'	3'	Paeonidina	1	3
33	3,5,7,3',4',5'	-	Delfinidina	2	5
34	3,5,7,4',5'	3'	Petunidina	1	3
35	3,5,7,4'	3',5'	Malvidina	1	3

TABLA VIII-3 (continuación): Estructura y frecuencia de los aglicones flavónicos encontrados en *Salvia L.*

- 1.- Es constante la presencia de flavonoides en las especies de *Salvia*. Se ha comprobado en el presente trabajo que *S. argentea*, la única especie en la que se había explicitado la ausencia de flavonoides [SEMPER, 1958], posee este tipo de substancias.
- 2.- La clase de flavonoides más abundante es la de las flavonas (65%), seguidas a distancia por flavonoles y antocianidinas. Es interesante señalar que sólo se han encontrado flavonoles en 4 especies de las estudiadas. Según ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981), aproximadamente el 65% de los aglicones flavónicos conocidos en *Labiatae* son flavonas, porcentaje idéntico al que hemos indicado para el género *Salvia*. Éste sigue, pues, en el aspecto comentado, la tendencia de la familia a la que pertenece, que parece propia de angiospermas herbáceas superiores, según HARBORNE & WILLIAMS (1971). No se han encontrado, hasta el momento, en el género, flavanonas, dihidroflavanonas, dihidroflavonoles, auronas ni chalconas.
- 3.- Entre las flavonas, las más frecuentes en *Salvia* son la luteolina y la apigenina, que se han detectado en un 92% y un 81% respectivamente de las especies estudiadas. Las siguen la salvigenina (51%) y el crisoeriol (41%). La frecuencia predominante de luteolina y apigenina es un factor de coincidencia con *Labiatae* en general, no así para el caso de la salvigenina, ya que en la prelación frecuencial correspondiente a la familia, el tercer lugar corresponde, según ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981) a la escutelareina, flavona que no ha sido detectada todavía en *Salvia*.
- 4.- Por lo que se refiere al tipo de substituciones de las flavonas de *Salvia*, podemos señalar lo siguiente:
  - a) Únicamente se ha señalado una flavona substituida en la posición 8, la 5,8,4'-(OH)<sub>3</sub>-7-OMe-flavona (salvitina), que se ha encontrado en *S. plebeia* [GUPTA et al., 1975], sin que se haya encontrado en ningún otro género de *Labiatae*.
  - b) La metoxilación es un tipo de substitución muy frecuente en el género *Salvia*. Aproximadamente el 87% de sus flavonas presentan este tipo de substitución, porcentaje muy parecido al encontrado en *Labiatae* (ver tabla VIII-4).
  - c) Un 57% de las flavonas identificadas en *Salvia* son 6-OR substituidas. Entre ellas, la más abundante es la salvigenina. En *Labiatae* este porcentaje representa un 60% tal como se muestra en la tabla VIII-4.

d) La presencia de flavonas con tipos de substitución poco frecuentes, como 6-OR derivaciones y 4'-metoxilaciones, en *Tubuliflorae*, fue señalado por HARBORNE en 1967. Posteriormente, MARTÍNEZ-VERGÉS (1980) indicó que un 31% de las flavonas de *Labiatae* presentan un metoxilo en 4'. Nosotros hemos observado que el porcentaje para este tipo de substitución en el género *Salvia* es de un 43%, sensiblemente mayor que en las Labiadas en general.

	<u>nº absoluto en</u> <u>Salvia L.</u>	<u>% respecto al</u> <u>total en</u> <u>Salvia L.</u>	<u>% respecto al</u> <u>total en</u> <u>Labiatae Juss.</u>
Flavonás metoxiladas	20	87	85 (1)
Flavonas 6-OR derivadas	13	57	60 (1)
Flavonas con 4'-OMe	10	43	31 (2)

(1) ADZET & MARTÍNEZ-VERGÉS (1981)

(2) MARTÍNEZ-VERGÉS (1980)

TABLA VIII-4: Abundancia relativa de diversos tipos de substitución en las flavonas de *Salvia*, comparando con los de *Labiatae*.



Cápítulo IX:  
CONCLUSIONES





1. Se aportan, por primera vez, datos sobre la composición flavónica de doce táxones del género *Salvia* L.: *S. phlomoides* Asso, *S. canariensis* L., *S. bicolor* L., *S. valentina* L., *S. hispanica* L., *S. candelabrum* Boiss., las cuatro subespecies europeas de *S. lavandulifolia* Vahl (subsp. *lavandulifolia*, subsp. *oxyodon* (Webb & Heldr.) Rivas-Goday & Rivas-Martínez, subsp. *pyrenaeorum* Lippert y subsp. *gallica* Lippert) y *S. tiliifolia* Vahl. Se efectúan, además, nuevas aportaciones a la composición de siete táxones: *S. aethiopsis* L., *S. sclarea* L., *S. verticillata* L., *S. viridis* L., *S. nemorosa* L., *S. verbenaca* L. y *S. virgata* Jacq.
2. Todas las especies investigadas contienen los ácidos caféico y rosmarínico.
3. Contrariamente a lo indicado por SEMRAU (1958), *S. argentea* contiene compuestos flavónicos, característica general de las especies del género.
4. Los flavonoides del género *Salvia* L. pertenecen, en su mayoría, a la clase de las flavonas, siendo las más frecuentes luteolina y apigenina, seguidas a cierta distancia por salvigenina y crisoeriol. Entre las flavonas, un 87% son metoxiladas, un 43% presentan un 4'-OMe y un 31% son 6-OR substituidas. Efectivamente, se ha detectado la presencia de luteolina, apigenina y salvigenina en 20 de los 21 táxones investigados en el presente trabajo y crisoeriol en 12 de los 21.
5. Se aislan e identifican en las hojas de *Salvia lavandulifolia* Vahl subsp. *lavandulifolia* catorce sustancias polifenólicas: ácido rosmarínico, luteolina, apigenina, genkwanina, 4'-O-Me-genkwanina, salvigenina, cirsimaritina, eupatorina, nepetina, hispidulina, 7-O- $\beta$ -D-glucosil-quercetina, 7-O-(6- $\alpha$ -L-ramnosil- $\beta$ -D-glucosil)-luteolina y 4'-O-diglucuronil-luteolina. Las dos últimas, según nuestro criterio, son particularmente interesantes, ya que no habían sido descritas anteriormente en el género. Además, la 4'-O-diglucuronil-luteolina es nueva para la familia Labiatae Juss. y, quizás, se trate de un nuevo producto natural.

6. La dotación flavónica de las cuatro subespecies europeas de *S. lavandulifolia* Vahl es coherente con su situación sistemática como tales. Por tanto, no aparece plenamente justificada la consideración de *Salvia oxyodon* Webb & Heldrich como especie independiente de *S. lavandulifolia* Vahl, según han propuesto algunos autores.
7. La neta diferencia fitoquímica entre *S. lavandulifolia* Vahl y *S. officinalis* L., apoya su situación en especies separadas y no la supeditación de la primera a la segunda, como subespecie.
8. Queda demostrada la presencia de nueve substancias polifenólicas en las hojas de *S. candelabrum* Boiss., que han sido aisladas, y ocho totalmente identificadas. De ellas, cuatro son aglicones: luteolina, apigenina, genkwanina, 7-0-Me-luteolina, citada ésta por primera vez en forma libre en el género.

Tres presentan estructura heterosídica: 7-0- $\beta$ -D-glucosil-luteolina; 7-0-diglucuronil-luteolina, nueva para el género *Salvia* L., y 7-0-(glucosil-glucuronil)-apigenina, no descrita anteriormente en la familia *Labiatae* Juss. y posible nuevo producto natural.

El último compuesto identificado es un diterpeno abietánico, la 11,12,14-trihidroxi-abieta-8,11,13-trien-3,7-diona, que constituye una nueva molécula natural.
9. Se propone replantear la situación de *S. candelabrum* Boiss. en la sección *Euspace* Bentham, atendiendo a las discrepancias fitoquímicas observadas con respecto a las demás especies de la sección.
10. Los aglicones luteolina y apigenina no han sido detectados en forma libre en *S. tiliifolia* Vahl. Este hecho avala su aislamiento sistemático respecto al resto de especies de *Salvia* L.
11. Desde un punto de vista metodológico en la investigación de flavonoides, el doble fraccionamiento con solventes de polaridad creciente, utilizado en *S. candelabrum* Boiss., resulta ser el método extractivo de elección. En la fase de aislamiento, la DCCC, la CLC y la cromatografía en columna de Sephadex son las técnicas preparativas que dan mejores resultados en cuanto a rendimiento, capacidad de separación y tiempo invertido.

Capítulo X:  
BIBLIOGRAFIA



- ABDALLA, M.F.; SALEH, N.A.M.; GABR, S.; ABU-EYTA, A.M. & EL-SAID, H. 1983. Flavone glycosides of *Salvia triloba*. *Phytochemistry*, 22(9): 2057-2060.
- ADAMOVIĆ, J. & STERMITZ, F.R. 1976. High-performance liquid chromatography of some anthocyanidins and flavonoids. *J. Chromatogr.*, 129: 464-465.
- ADZET, T. 1986. Polyphenolic compounds with biological and pharmacological activity. In CRACKER, L.E. & SIMON, J.E. (eds.) *Herbs, Spices and Medicinal Plants: Recent advances in Botany, Horticulture and Pharmacology*. Vol. 1. pag. 167-184. Oryx Press (Phoenix).
- ADZET, T. & MARTÍNEZ-VERGÉS, F. 1981. Aglicons flavònics de les Labiades. *Butll. Inst. Cat. Hist. Nat.* 46(Sec. Bot., 4): 25-91.
- AFZAL-RAFII, G. 1979. Contribution à l'étude cytotaxonomique du groupe *Salvia verbenaca* L. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 126, Lettres bot. (1): 79-86.
- AL-HAZIMI, H.M.G.; DEEP, M.S.H. & MIANA, G.A. 1984. Isocarnosol, a diterpene from *Salvia lonigera*. *Phytochemistry*, 23(4): 919-921.
- ANDARY, C.; WYLDE, R.; LAFFITE, C.; PRIVAT, G. & WINTERNITZ, F. 1982. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochemistry*, 21(5):1123-1127.
- ANDARY, C.; ROUSSEL, J.L.; RASCOL, J.P. & PRIVAT, G. 1984. Microméthodes d'analyse des esters hétérosidiques de l'acide caféique. *J. Chromatogr.*, 303: 312-317.
- ANDARY, C.; PRIVAT, G.; WYLDE, R. & HEITZ, A. 1985a. Pheliposide et arenarioside, deux nouveaux esters hétérosidiques de l'acide caféique isolés de *Orobanche arenaria*. *J. Nat. Prod.*, 48(5): 778-783.
- ANDARY, C.; WYLDE, R.; HEITZ, A.; RASCOL, J.P.; ROUSSEL, J.L. & LAFFITE, C. 1985b. Poliumnoside, a caffeic glycoside ester from *Teucrium belion*. *Phytochemistry*, 24(2): 362-364.
- ASEN, S. 1961. Anthocyanins in flowers of *Salvia splendens* cultivar violet flame. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 78: 586-592.
- AUDIER, H. 1966. Étude des composés flavoniques par spectrométrie de masse. *Bull. Soc. Chim. France.*, (9): 2892-2899.
- AVERETT, J.E. 1977. Absorption maxima and R<sub>f</sub> values as an aid to the identification of selected flavonoids. *Phytochemical Bulletin*, 10: 10-26.

- BAKSHI, B.; HASSARAJANI, S.A.; MULCHANDANI, N.B. & SHANKAR, J. 1984. 6,7-Dehydroroydeanone, a diterpenoid quinone from *Salvia moorcraftiana*. *Planta Med.*, 50: 355-356.
- BARBERÁN, F.A.T. 1986. The flavonoid compounds from Labiatae. *Fitoterapia*, 57(2): 67-95.
- BECKER, H.; EXNER, J. & BINGLER, T. 1979. Vergleichende Untersuchung von Polyamid DC11- und RP-2-, RP-8 und RP-18-Schichten zur trennung von methylierten Quercetinderivaten. *J. Chromatogr.*, 172: 420-423.
- BECKER, H.; HSIEH, W.Ch.; WYLDE, R.; LAFFITE, C. & ANDARY, C. 1982a. Struktur von Echinacosid. *Z. Naturforsch.*, 37c: 351-353.
- BECKER, H.; REICHLING, J. & HSIEH, W.-C. 1982b. Water-free solvent system for droplet counter-current chromatography and its suitability for the separation of non-polar substances. *J. Chromatogr.*, 237: 307-310
- BENEDÍ, C. 1982. Estudio del polen de *Salvia* desde el punto de vista sistemático. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- BIANCHINI, J.P. & GAYDOU, E.M. 1980. Separation of flavones by straight-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 190: 233-236.
- BONNIER, G. 1934. *Flore complete de France, Suisse et Belgique*. Vol. VIII. Librairie Générale de l'Enseignement, Paris.
- BOUILLANT, M.L.; FAVRE-BONVIN, J. & CHOPIN, J. 1974. Spectrometrie de masse des permethyl C-glycosylflavones. *Compte Rendu des Journées Internationales d'Étude du Groupe Polyphénols*. Lyon (Francia).
- BOUILLANT, M.L.; BESSET, A.; FAVRE-BONVIN, J. & CHOPIN, J. 1980. Fragmentation pattern of permethyl 6-C-glycosylflavones in electron impact mass spectrometry. *Phytochemistry*, 19: 1755-1759.
- BOYA, M.T. & VALVERDE, S. 1981. An orthoquinone isolated from *Salvia aethiopsis*. *Phytochemistry*, 20(6): 1367-1368.
- BRASSEUR, T. & ANGENOT, L. 1986. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400. Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *J. Chromatogr.*, 351: 351-355.
- BRIESKORN, C.H. 1973. Diterpenchinone aus labiatenwurzeln. *Planta Med.*, 24(2): 190-195.

- BRIESKORN, C.H. & BIECHELE, W. 1971a. Flavone aus *Salvia officinalis* L. **Arch. Pharm.** (Weinheim), 304(8): 557-561.
- BRIESKORN, C.H. & BIECHELE, W. 1971b. Zur unterscheidung von *Salvia officinalis* und *Salvia triloba*. **Deut. Apoth. Ztg.**, 111(5): 141-142.
- BRIESKORN, C.H. & FUCHS, A. 1962. **Chem. Ber.**, 95: 3034.
- BRIESKORN, C.H.; FUCHS, A.; BRENDENBERG, J.B.; McCHESNY, J.D. & WENKERT, E. 1964. **J. Org. Chem.**, 29: 2293.
- BRIESKORN, C.H. & KAPADIA, Z. 1979. Constituents of *Salvia officinalis*. **Planta Med.**, 35: 376-378.
- BUCHI. **Preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). Part 1: Adsorption chromatography.** Büchi Laboratoriums-Technik AG Flawil (Suiza).
- BUSCH, K.L. & COOKS, R.G. 1982. Mass spectrometry of large, fragile and involatile molecules. **Science**, 218: 247-254.
- CADEVALL, J. & FONT QUER, P. 1932. **Flora de Catalunya**. Vol. IV. Institut d'Estudis Catalans-Secció Ciències. Barcelonā.
- CAMARASA, J. 1981. **Contribución al estudio quimiotaxonómico de especies del género Euphorbia L.** Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia de Barcelona.
- CAMARASA, J. 1984. **Farmacología de los compuestos flavónicos.** Discurso de ingreso como Académico correspondiente en la Real Academia de Farmacia de Barcelona.
- CAMARASA, J.; CAÑIGUERAL, S.; IGLESIAS, J. & MARÍN, E. 1982. Sur les aglycones flavoniques des feuilles de *Salvia verbenaca* L. 5-OH-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavone, flavonoïde nouveau dans le genre *Salvia* L. **Pl. Méd. Phytothér.**, 16(3): 192-196.
- CAÑIGUERAL, S. 1982. **Primera aproximació a l'estudi dels flavonoides del gènere Salvia L. Compostos flavònics de Salvia verbenaca L.** Tesina de Llicenciatura. Facultad de Farmacia de Barcelona.
- CARLSON, R.E. & DOLPHIN, D. 1980. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of isoflavones. **J. Chromatogr.**, 198: 193-197.
- COMBIER, H. 1968. **Recherches chimiques, taxonomiques et physiologiques sur les flavonoïdes des Crassulacées.** Thèse Docteur Ingénieur. Fac. Sciences. Lyon.



- COMBIER, H.; JAY, M.; VOIRIN, B. & LEBRETON, Ph. 1974. Influence des -6 et (ou) -8-0-substitutions sur le comportement spectrophotométrique et chromatographique des flavonoïdes. **Compte Rendu des Journées Internationales d'Étude du Groupe Polyphénols**. Lyon (France).
- CORNU, A. & PAYNOT, M. 1969. Hérité et analyse chromatographique de la pigmentation anthocyanique des fleurs et bractées de *Salvia horminum* L. **Ann. Amélior. Plantes**, 19(1): 5-13.
- DAIGLE, D.J. & CONKERTON, E.J. 1982. High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids. **J. Chromatogr.**, 240: 202-205.
- DAIGLE, D.J. & CONKERTON, E.J. 1983. Analysis of flavonoids by HPLC. **J. Liq. Chromatogr.**, 6(s-1): 105-118.
- DALMASES, P. & BONET, J.J. 1984. Técnicas de cromatografía líquido-sólido en columna. **Afinidad**, 141:111-126.
- DAVES, G.D., Jr. 1979. Mass spectrometry of involatile and thermally unstable molecules. **Acc. Chem. Res.**, 12: 359-365.
- DE CANDOLLE, A. 1848. **Prodromus Systematics Naturalis Regni Vegetabilis**, Vol. XII. Paris . V. Masson.
- DOBRYNIN, V.N.; KOLOSOV, M.N.; CHERNOV, B.K. & DERBENTSEVA, N.A. 1976. **Khim. Prir. Soedin.**, 5:686. CA.86: 1176035.
- DOGANIS, B. 1971. Pharmacognostical Study of *Salvia*. **Arch. Pharm.** (Athens), 27(4): 9.
- DOMÍNGUEZ, X.A.; GONZÁLEZ, F.H.; ARAGÓN, R.; GUTIÉRREZ, M.; MARROQUÍN, J.S. & WATSON, W. 1976. Mexican medicinal plants. XXIX. Three diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora*. **Planta Med.**, 30(3): 237-241.
- DOMON, B.; HOSTETTMANN, M. & HOSTETTMANN, K. 1982. Droplet counter-current chromatography with non aqueous solvent systems. **J. Chromatogr.** 246: 133-135.
- DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D. & HOSTETTMANN, K. 1982. Spectrometrie de masse de glycosides flavoniques non dérivés. **Bull. Liais. Groupe Polyphénols**, 11: 401-407.
- ERDELMEYER, C.A.J.; NYIREDEY, Sz. & STICHER, O. Sequential centrifugal layer chromatography (SCLC): a new technique for isolation of natural compounds. Part 2: Comparative study on centrifugal layer Chromatography (CLC) and SCLC for the separation of furocumarin isomers. **HRC & CC**, 8(3): 132-134.

- ESCUADERO, J.; PÉREZ, L.; RABANAL, R. & VALVERDE, S. 1983. Diterpenoids from *Salvia oxyodon* and *Salvia lavandulifolia*. *Phytochemistry*, 22(2): 585-587.
- FAVRE-BONVIN, J. 1982. Possibilités récentes offertes par les spectrométries de masse et de résonance magnétique nucléaire dans l'étude des polyphénols. *Bull. Liais. Groupe Polyphénols*, 11: 363-372.
- FENSELAU, C. 1984. Fast atom bombardement and middle molecule mass spectrometry. *J. Nat. Prod.*, 47(2): 215-225.
- FERRERES, F.; TOMÁS, F.; BARBERÁN, F.A.T. & HERNÁNDEZ, L. 1985. Free flavone aglycones from *Thymus membranaceus* subsp. *membranaceus*. *Pl. Méd. Phytothér.*, 19(2): 89-97.
- FISCHER, G.A. & KABARA, J.J. 1964. *Anal. Biochem.*, 9: 303.
- FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, A.G.; HERRERA, J.R.; LUIS, J.G.; PERALES, A. & RAVELO, A.G. 1985. A revised structure for the diterpene rosmanol. *Phytochemistry*, 24(8): 1853-1854.
- FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, A.G.; HERRERA, J.R.; LUIS, J.G. & RAVELO, A.G. 1986. Diterpenes from the roots of *Salvia canariensis*. *Phytochemistry*, 25(1): 269-271.
- GARCÍA-VALLEJO, M.C.; VELASCO NEGUERUELA, A.; LÓPEZ GONZÁLEZ, G. & GARCÍA MARTÍN, D. 1975. Composición de la esencia de "Selima Basta" (*Salvia candelabrum* Boiss.) y corología de esta especie. *Anales Inst. Bot. A.J. Cavanilles*, 32(2): 667-684.
- GEISSMANN, T.A. 1955. Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments. In: PAECH, K. & TRACEY, M.V. *Modern methods of plant analysis*. Vol. III. pag. 450-498. Springer-Verlag (Berlín).
- GELLA, E.V. & PROKOSHEVA, L.I. 1970. A study of the flavonoids of *Salvia nutans*. *Khim. Prir. Soedin.*, 6(2): 270-271.
- GONZÁLEZ, A.G.; FRAGA, B.M.; LUIS, J.G. & RAVELO, A.G. 1973. Constituents of *Labiatae*. XIX. Structure of galdosal, a new diterpene from *Salvia canariensis* L. *Experientia*, 29(12): 1471.
- GONZÁLEZ, A.G.; FRAGA, B.M.; LUIS, J.G. & RAVELO, A.G. 1975. Componentes de *Salvia canariensis* L. *An. Quim.*, 71(7-8): 701-705.

- GOUDARD, M.; FAVRE-BONVIN, J.; LEBRETON, Ph. & CHOPIN, J. 1978. Differentiation des dihydroxy-5,7 methoxy-6 ou 8 flavones et methyl-3 flavonols par spectrometrie de masse. *Phytochemistry*, **17**:145-146.
- GOUDARD, M.; FAVRE-BONVIN, J.; STRELISKY, J.; NOGRADI, M. & CHOPIN, J. 1979. Differentiation des hydroxy-5 dimethoxy-6,7 ou 7,8 et des trimethoxy-5,6,7 ou 5,7,8 flavones par spectrometrie de masse. *Phytochemistry*, **18**: 186-187.
- GUPTA, H.C.; AYENGAR, K.N.N. & RANGASWAMI, S. 1975. Structure and synthesis of salvitin, a new flavone isolated from *Salvia plebeia*. *Indian J. Chem.*, **13**(3): 215-217.
- HALPAAP, H. 1963. Präparative Dünnschichtchromatographie. *Chemie-Ingenieur-Technik*, **35**(7): 488-493.
- HARBORNE, J.B. 1959. The chromatography of the flavonoid pigments. *J. Chromatogr.*, **2**: 581-604.
- HARBORNE, J.B. 1965. Plant polyphenols. XIV. Characterisation of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolysis. *Phytochemistry*, **4**: 107-120.
- HARBORNE, J.B. 1966. The evolution of flavonoid pigments in plants. In SWAIN, T. (ed.) *Comparative Phytochemistry*. Academic Press (London).
- HARBORNE, J.B. 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press (London).
- HARBORNE, J.B. 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall (London).
- HARBORNE, J.B. 1985a. *Introducción a la Bioquímica ecológica*. Traducción de la 2ª ed. inglesa (1982). Ed. Alhambra (Madrid).
- HARBORNE, J.B. 1985b. Current trends in the chromatographic analysis of plant phenolics. In: VLIETINCK, A.J. & DOMMISSE, R.A. (eds.) *Advances in Medicinal Plant Research*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart).
- HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. 1971. 6-Hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants. *Phytochemistry*, **10**: 367-378.
- HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. 1975. Flavone and flavonol glycosides. In HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. & MABRY, H. (eds.) *The Flavonoids*. p.376-441. Chapman & Hall (London).
- HARBORNE, J.B. & WILLIAMS, C.A. 1982. Flavone and flavonol glycosides. In HARBORNE, J.B. & MABRY, T.J. (eds.) *The Flavonoids. Advances in Research*. p.261-311. Chapman & Hall (London).

- HARRISON RESEARCH. **Instruction Manual of Chromatotron model 7924.** Palo Alto, U.S.A.
- HAYASHI, K.; SAITO, N.; SUKEKAWA, M. & OSAWA, Y. 1972. Infra-red spectra of anthocyanins and anthocyanidins providing additional data for their identification. **Sc. Rep. T.K.D., Sec.B, 14(220): 293-312.**
- HEDGE, I.C. 1972. Gen. *Salvia* L. In: TUTIN, T.G.; HEYWOOD, V.H.; BURGESS, N. A.; MOORE, D.M.; VALENTINE, D.H.; WALTERS, S.M. & WEBB, D.A. (eds.) **Flora Europaea, 3: 188-192.** Cambridge, University Press.
- HEDGE, I.C. 1974. A revision of *Salvia* in Africa including Madagascar and the Canary Islands. **Notes Roy. Bot. Gard. Edimb., 33: 1-121.**
- HERRMANN, K. 1960. Über die Gerbstoffe der Labiatenblätter. **Arch. Pharm., (293): 1043.**
- HIERMANN, A. 1979. Auftrennung und remissionsmessung *in situ* von flavonoid-aglykonen auf hochleistungsdünnschichtchromatographie-fertigplatten RP-18 F<sub>254</sub>. **J. Chromatogr., 174: 478-482.**
- HIERMANN, A.; BECKER, H.; EXNER, J. & AVERETT, E. 1978. Gel filtration of flavonoids. **Phytochemical Bulletin, 11(4): 55-57.**
- HIERMANN, A. & KARTNIG, Th. 1977. Die Auftrennung und remissionsmessung *in situ* von flavonoiden auf hochleistungs-dünnschichtchromatographie-fertigplatten Kieselgel 60. **J. Chromatogr., 140: 322-326.**
- HOSTETTMANN, K. 1980. Droplet Counter Current Chromatography and its application to the preparative scale separation of natural products. **Planta Med., 39(1): 1-18.**
- HOSTETTMANN, K. 1983. Droplet Counter Current Chromatography. In: GIDDINGS, J.C.; GRUSHKA, E.; CAZES, J. & BROWN, P.R. (eds.) **Advances in Chromatography, Vol. 21, p. 165-186.** Marcel Dekker Inc. (New York).
- HOSTETTMANN, K. 1985. Isolation and identification of saponins and related terpenoid glycosides. In: VLIETINCK, A.J. & DOMMISSE, R.A. (eds.) **Advances in Medicinal Plant Research.** p. 225-241. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart).
- HOSTETTMANN, K. & HOSTETTMANN, M. 1982. Isolation techniques for flavonoids. In: HARBORNE, J.B. & MABRY, T.J. (eds.) **The Flavonoids: Advances in Research.** p. 1-18. Chapman & Hall (London).

- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN-KALDAS, M. & NAKANISHI, K. 1979a. Droplet counter-current chromatography for the preparative isolation of various glycosides. *J. Chromatogr.*, 170: 355-361.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN-KALDAS, M. & STICHER, O. 1979b. Preparative scale separation of xanthenes and iridoid glycosides by droplet counter-current chromatography. *Helvetica Chimica Acta*, 62(7): 2079-2085.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN-KALDAS, M. & STICHER, O. 1980. Rapid preparative separation of natural products by centrifugal thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 202: 154-156.
- HOSTETTMANN, K.; APPOLONIA, C.; DOMON, B. & HOSTETTMANN, M. 1984a. Droplet counter-current chromatography- new applications in natural products chemistry. *J. Liq. Chromatogr.*, 7(2): 231-242.
- HOSTETTMANN, K.; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D. & HOSTETTMANN, M. 1984b. On line high performance liquid chromatography ultraviolet visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post column derivatization. *J. Chromatogr.*, 283: 137-147.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M. & MARSTON, A. 1984c. Isolation of natural products by droplet counter-current chromatography and related methods. *Nat. Prod. Rep.*, 1(5): 471-481.
- HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. 1986. Analyse rapide de composés polyphénoliques dans un extrait végétal brut par CLHP utilisant un détecteur UV à faisceaux de diodes. *Journées Internationales d'Étude du Groupe Polyphénols*. Montpellier (France).
- HUESO-RODRÍGUEZ, J.A.; JIMENO, H.L.; RODRÍGUEZ, B.; SAVONA, G. & BRUNO, M. 1983. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry*, 22(9): 2005-2009.
- ITO, Y. 1981. Efficient preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge. *J. Chromatogr.*, 214: 122-125.
- ITO, Y. 1984. Development of high-speed counter-current chromatography. In: GIDDINGS, J.C.; GRUSHKA, E.; CAZES, J. & BROWN, P.R. (eds.). *Advances in Chromatography*. Vol.24, p.181-225. Marcel Dekker Inc. (New York).
- ITO, Y. 1985. Foam counter-current chromatography based on dual counter-current system. *J. Liq. Chromatogr.*, 8(12): 2131-2152.

- ITO , Y. & BOWMAN, R.L. 1970. Counter-current chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support. *J. Chromatogr. Sci.*, 8: 315-323.
- ITO, Y. & BOWMAN, R.L. 1971. Counter-current chromatography. *Anal. Chem.*, 43(13): 69A-75A.
- ITO, Y. & CONWAY, W.D. 1984. Development of counter-current chromatography. *Anal. Chem.*, 56: 534A.
- JOHNSTON, K.M.; STERN, D.J. & WAISS Jr., A.C. 1968. Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20. *J. Chromatogr.*, 33: 539-541.
- JOUSTRA, M. ; SODERQVIST, B. & FISCHER, L. 1967. Gel filtration in organic solvents. *J. Chromatogr.*, 28: 21-25.
- JURD, L. 1967. Spectral properties of flavonoid compounds. In: GEISSMAN, T.A. (ed.) *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Pergamon Press (Oxford).
- JURD, L. 1969. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations. *Phytochemistry*, 8: 445-462.
- KINGSTON, D.G.I. 1971. Mass spectrometry of organic compounds. VI. Electron-impact spectra of flavonoid compounds. *Phytochemistry*, 27: 2691-26700.
- KINGSTON, D.G.I. 1979. High performance liquid chromatography of natural products. *J. Nat. Prod.*, 42(3): 237-260.
- KINGSTON, D.G.I. & FALES, H.M. 1973. Methane chemical ionization mass spectrometry of flavonoids. *Tetrahedron*, 29: 4083-4086.
- KOLOBOW, T.; ITO , Y.; MYCHKOVSKY, I.; PETERS, P. & MORABITO, J. 1985. Monolithic integrated flow circuit (MIFC): a new column design for counter-current chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, 8(12): 2173-2193.
- KOSTER, C.G. de; NIEMANN, G.J. & HEERMA, W. 1985. Fast atom bombardement mass spectrometry of coumaric acids. *Z. Naturforsch.*, 40c: 580-582.
- KUBECZKA, K.H. 1985. Progress in isolation techniques for essential oil constituents. In: VLIETINCK, A.J. & DOMMISSE, R.A. (eds.) *Advances in Medicinal Plant Research*. p. 197-224. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart).
- KUNKEL, G. 1977. *Endemismos canarios*. Ministerio de Agricultura. ICONA (Madrid).
-

- KUPCHAN, S.M.; SIGEL, C.W.; HEMINGWAY, R.J.; KNOX, J.R. & UDAYAMURTHY, M.S. 1969. Tumor inhibitors. XXXIII. Cytotoxic flavones from *Eupatorium* species. *Tetrahedron*, **25**: 1603-1615.
- LALLEMENT-GUILBERT, N. & BEZANGER-BEAUQUESNE, L. 1970. Recherches sur les flavonoides de quelques labiées médicinales. *Pl. Méd. Phytothér.*, **4**(2): 92-107.
- LEBRETON, Ph. & CHOPIN, J. 1963. Contribution à l'étude spectrographique infrarouge des composés flavoniques. *Spectrochimica Acta*, **19**: 2099-2112.
- LEBRETON, Ph.; JAY, M. & VOIRIN, B. 1967. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides. *Chimie Analytique*, **49**(7): 375-383.
- LEUTERT, T.H. & VON ARX, E. 1984. Preparative medium pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **292**: 333-334.
- LINDE, H. 1964. *Helv. Chim. Acta*, **47**: 1236.
- LIPPERT, W. 1979. Zur Kenntnis von *Salvia* sektion *Salvia* in Westlichen Mittelmeergebiet. *Mitt. Bot. München*, **15**: 397-423.
- LOEV, B. 1967. Dry chromatography. *Chem. Ind.*, p. 2026.
- MABRY, T.J. & MARKHAM, K.R. 1975. Mass spectrometry of flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. & MABRY, H. (eds.) *The Flavonoids*. Chapman & Hall (London).
- MABRY, T.J. & ULUBELEN, A. 1980. Flavonoids and related plant phenolics. In: WALLER, G.R. & DERMER, O.C. (eds.) *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*. First supplementary volume. p. 1131-1158.
- MADHUSUDANAN, K.P.; SACHDEV, K.; HARRISON, D.A. & KULSHRESHTHA, D.K. 1984. Gas phase hydrogen/deuterium exchange reactions in chemical ionisation mass spectra of flavonoids. *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proces.*, **62**: 289-295.
- MAHUZIER, G. & HAMON, M. 1978. *Abrégé de Chimie Analytique*. Tome 2: *Méthodes de séparation*. Masson (Paris).
- MALAGARRIGA, R.P. 1980. *Sinopsis de la Flora Ibérica*. Tomo VI. 2<sup>a</sup> edición (Barcelona).
- MARKHAM, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press (London).

- MARKHAM, K.R. & CHARI, V.M. 1982. In: HARBORNE, J.B. & MABRY, T.J. (eds.) **The Flavonoids: Advances in Research**. Chapman & Hall (London).
- MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. 1968. A procedure for the ultraviolet spectral detection of *ortho*-dihydroxyl groups in flavonoids. *Phytochemistry*, 7: 1197-1200.
- MARKHAM, K.R. & MABRY, T.J. 1975. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. & MABRY, H. **The Flavonoids**. Chapman & Hall (London).
- MARSTON, A.; MSONTHI, J.D. & HOSTETTMANN, K. 1984. Naphtoquinones of *Diospyros usambarensis*; their molluscicidal and fungicidal activities. *Planta Med.*, (3): 279-280.
- MARTÍNEZ-VERGÉS, F. 1980. **Contribución al estudio fitoquímico y quimiotaxonómico del género *Thymus* L.** Tesis Doctoral. Fac. Ciencias. Univ. Autónoma de Barcelona.
- MEARS, J.A. & MABRY, T.J. 1972. A procedure for the UV detection of hydroxyl and methoxyl groups at C<sub>6</sub> in flavones and 3-O-substituted flavonols. *Phytochemistry*, 11: 411-412.
- MERCK. **Lobar<sup>R</sup>**. Columnas preparadas para cromatografía en fase líquida. E. Merck (Darmstadt).
- MICHAVILA, A.; FERNANDEZ-GADEA, F. & RODRÍGUEZ, B. 1986. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lavandulifolia*. *Phytochemistry*, 25(1): 266-268.
- MIDDLETON, E. Jr. 1984. The Flavonoids. *T.I.P.S.*, 5(8): 335-338.
- MILLER, J.C.; GEORGE, S.A. & WILLIS, B.G. 1982. Multichannel detection in high performance liquid chromatography. *Science*, 218: 241-246.
- MISKI, M.; ULUBELEN, A.; JOHANSSON, C. & MABRY, T.J. 1983. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palestina*. *J. Nat. Prod.*, 46(46): 874-875.
- MIYASE, T.; RUEDI, P. & EUGSTER, C.H. 1977. Diterpenoide drüsenfarbstoffe aus labiaten: Coleone U, V, W und 14-O-formyl-coleon-V sowie 2 royleanone aus *Plectranthus myrianthus* Briq.; *cis*- und *trans*-A/B-6,7-dioxoroleanon. *Helvetica Chimica Acta*, 60(8): 2770-2779.
- MUKHERJEE, K.S.; GHOSH, P.K. & BADRUDDOZA, S. 1981. Diterpenoid quinones of *Salvia lanata*. *Phytochemistry*, 20(6): 1441.



- MUKHERJEE, K.S.; GHOSH, P.K. & MUKHERJEE, R.K. 1983. Diterpenoid quinones of *Salvia lanata*. *Phytochemistry*, 22(5): 1296-1297.
- MURAYAMA, W.; KOBAYASHI, T.; KOSUGE, Y.; YANO, H.; NUNOGAKI, Y. & NUNOGAKI, K. 1982. A new centrifugal counter-current chromatography and its application. *J. Chromatogr.*, 239:643-649.
- NIEMANN, G.J. & VAN BREDERODE, J. 1978. Separation of glycoflavones and their glycosides by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 152: 523-527.
- NYIREDY, Sz.; ERDELMEIER, C.A.J. & STICHER, O. 1985. Sequential centrifugal layer chromatography (SCLC): A new technique for the isolation of natural compounds. Part I: Description of the method and practical aspects. *HRC & CC*, 8(2): 73-76.
- OGIHARA, Y.; INOVE, O.; OTSUKA, H.; KAWAI, K.I.; TANIMURA, T. & SHIBATA, S. 1976. Droplet counter-current chromatography for the separation of plant products. *J. Chromatogr.*, 128: 218-223.
- ORSINI, F. & VEROTTA, L. 1985. Separation of natural polar substances by reversed phase high performance liquid chromatography and droplet counter-current chromatography. *J. Chromatogr.*, 349: 69-75.
- PATUDIN, A.; ROMANOVA, A.; SOKOLOV, W.S. & PRIBYLOVA, G. 1974. Das Vorkommen von Phenanthrenquinonen in Arten der Gattung *Salvia*. *Planta Med.*, 26:201-207.
- PELLETIER, S.W.; JOSHI, B.S. & DESAI, H.K. 1985. Techniques for isolation of alkaloids. In: VLIETINK, A.J. & DOMMISSE, A. *Advances in Medicinal Plant Research*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart).
- PETIT, G.R.; HOLZAPFEL, C.W. & CRAGG, G.M. 1984. Mass measurements of natural products by solution phase secondary ion mass spectrometry employing silver (I) and thalium (I) derivatives. *J. Nat. Prod.*, 47 (6): 941-946.
- PHARMACIA. 1985. *Gel Filtration. Theory and Practice*. Uppsala.
- POBEDIMOVA, E.G. 1954. Gen. *Salvia L.* In: *Flora of the U.S.S.R.*, 21: 178-261. Jerusalem, Israel Program for Scientific Translations, 1977. Trad. del original ruso editado en Moscú-Leningrado.
- REPAS, A.; NIKOLIN, B. & DURSUN, K. 1969. The separation of phenolic glucosides by gel filtration. *J. Chromatogr.*, 44: 184-187.

- RIBEREAU-GAYON, P. 1968. **Les Composés Phenoliques des Végétaux**. Dunod (Paris).
- RINEHART, K.L. Jr. 1982. Fast atom bombardement mass spectrometry. **Science**, 218: 254-260.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S. 1973. Avance sobre una síntesis corológica de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. **Anal. Inst. Bot. Cavanilles**, 30: 69-87.
- RODRÍGUEZ, B.; FERNANDEZ-GADEA, F. & SAVONA, G. 1984. A rearranged abietane diterpenoid from the root of *Salvia aethiopis*. **Phytochemistry**, 23 (8): 105-1806.
- RODRÍGUEZ, J.; TELLO, H.; QUIJANO, L.; CALDERÓN, J.; GÓMEZ, F.; ROMO, J. & RÍOS, T. 1974. Flavonoides de plantas mexicanas. Aislamiento y estructura de la santina y glucoferida. **Rev. Latinoam. Quím.**, 5(1): 41-53.
- ROSLER, K.-H.A.; WONG, D.P.C. & MABRY, T.J. 1983. Problems with ultraviolet spectroscopy of flavonoids using sodium acetate in methanol. **J. Nat. Prod.**, 48(5): 837-840.
- ROSUA, J.L. & BLANCA, G. 1986. Revisión del género *Salvia* L. (lamiaceae) en el Mediterráneo Occidental : la sección *Salvia*. **Acta Botanica Malacitana**, 11: 227-272.
- RUEDI, P. & EUGSTER, C.H. 1981. 14-hydroxytaxodion: partialsynthese und reaktionen. **Helvetica Chimica Acta**, 64(7): 2219-2226.
- SAGDULLAEVA, N.Z. & KHAZANIVICH, R.L. 1972. Flavone substances of some *Salvia* species growing in Uzbekistan. **Med. Zh. Uzt.**, 11: 17-19.
- SALEH, M.R.I. & NAZMI, S.N. 1980. Phytochemical stdy of *Salvia verbenaca* L. herb. **J. Drug Res. Egypt**, 12(1-2): 131-137.
- SANDLIN, J.L. & ITO, Y. 1985. Large-scale preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge. **J. Liq. Chromatogr.**, 8(12): 2153-2171.
- SAVONA, G. & BRUNO, M. 1983. Terpenoids of cultivated *Salvia canariensis* **J. Nat. Prod.**, 46(4): 593-594.
- SCHAUFELBERGER, D.; HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. 1982. Isolement de flavonoides à l'echelle preparative. **Bull. Liais. Groupe Polyphénols**, 11: 347-354.

- SEMRAU, R. 1958. **Über die Flavone in der Familie der Labiatae.** Inag. Dissert. München.
- SHAMSUDINOV, S.F. & DZHUMMYRKO, A.V. 1979. Polyphenols and triterpenes from *Salvia limbata*. **Khim. Prir. Soedin.**, 1: 96. CA: 91:357065.
- SHIBATA, M.; URAGAMI, S. & MATSU-URA, K. 1966. Paper-chromatographic survey of anthocyanins in purple *Salvia*-flowers. **Bot. Mag. Tokyo**, 79: 537-543.
- SHOOLERY, J.N. 1984. Recent developments in  $^{13}\text{C}$ - and proton-NMR. **J. Nat. Prod.**, 47(2): 226-259.
- SMIRNOVA, L.P.; GLYZIN, V.I.; PATUDIN, A.V. & BAN'KOVSKII, A.I. 1974. Flavonoids of some species of *Salvia*. **Khim. Prir. Soedin.** (5): 668-669.
- SOMAROO, B.H.; THAKUR, M.L. & GRANT, W.F. 1973. A useful spray reagent to differentiate common phenolic compounds on thin-layer plates and paper chromatograms. **J. Chromatogr.**, 87: 290-293.
- STILL, W.C.; KAHN, M. & MITRA, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **J. Org. Chem.**, 43(14): 2923-2925.
- STRACK, D. & KRAUSE, J. 1978. Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of naturally occurring mixtures of flavone derivatives. **J. Chromatogr.**, 156: 359-361.
- TAIRA, Z. & WATSON, W.H. 1976. The structure of conacytone,  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$ , a diterpene quinone from *Salvia ballotaeflorae*. **Acta Cryst.**, B32 (7): 2149-2152.
- TANIMURA, T.; PISANO, J.J.; ITO, Y. & BOWMAN, R.L. 1970. Droplet counter-current chromatography. **Science**, 169: 54-56.
- THOMSON, R.H. 1971. **Naturally Occurring Quinones.** 2<sup>o</sup> edición. Academic Press (London).
- TSANG-HSIUG, Y. & KUO-TUNG, C. 1972. Studies on the constituents of formosan *Salvia plebeia* R. Br. On the flavonoid components of *Salvia plebeia* R. Br. **J. Chinese Chem. Soc.**, 19: 131-141.
- ULUBELEN, A. & AYANOGLU, E. 1975. Flavonoids of *Salvia virgata*. **J. Nat. Prod.**, 38(5): 446-447.
- ULUBELEN, A.; MISKI, M. & MABRY, T.J. 1981a. A new diterpene acid from *Salvia tomentosa*. **J. Nat. Prod.**, 44(1): 119-124.

- ULUBELEN, A.; MISKI, M. & MABRY, T.J. 1981b. Further flavones and triterpenes and the new 6-hydroxyluteolin 5- $\beta$ -D-glucoside from *Salvia tomentosa*. *J. Nat. Prod.*, 44(5): 586-587.
- ULUBELEN, A.; MISKI, M.; NEUMAN, P. & MABRY, T.J. 1979. Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae). *J. Nat. Prod.*, 42(3): 261-263.
- ULUBELEN, A.; OKSUZ, S. & DOGANCA, S. 1968. *J. Pharm. Sci.*, 57: 703.
- ULUBELEN, A.; OZTURK, S. & ISIDATICI, S. 1968. A new flavone from *Salvia triloba* L. (Labiatae). *J. Pharm. Sci.*, 57: 1037-1038.
- ULUBELEN, A. & TOPÇU, G. 1984. Flavonoids and terpenoids from *Salvia verticillata* and *Salvia pinnata*. *J. Nat. Prod.*, 47(6): 1068.
- ULUBELEN, A. & UYGUR, I. 1976. Flavonoidal and other compounds of *Salvia aethiopsis*. *Planta Med.*, 29: 318-320.
- VALDÉS-BERMEJO, E. & LÓPEZ, G. 1977. Aportaciones a la flora española. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles*, 34(1): 157-173.
- VANDE CASTEELE, K.; GEIGER, H. & VAN SUMERE, C.F. 1982. Separation of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 240: 81-94.
- VOIRIN, B. 1973. Spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings. *Phytochemistry*, 22(10): 2107-2145.
- WALDI, O. 1965. *J. Chromatogr.*, 18: 417.
- WARD, R.S. & PELTER, A. 1974. *J. Chromatogr. Sci.*, 12:571.
- WATSON, W.H.; TAIKA, Z.; DOMINGUEZ, X.A.; GONZALES, H.; GUTIERREZ, M. & ARAGÓN, R. 1976. Isolation and structure of two diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora*. *Tetrahedron Let.*, (29): 2501-2502.
- WETTSTEIN, R. 1944. *Tratado de Botánica Sistemática*. Ed. Labor, S.A. (Barcelona).
- WOLLENWEBER, E. 1974. Flavones and flavonols in exudate of *Salvia glutinosa*. *Phytochemistry*, 13: 753.
- WOLLENWEBER, E. 1979. A table of mass spectral parent ions as an aid in flavonoid analysis. *Phytochemical Bulletin*, 12(4): 48-52.
- WOLLENWEBER, E. 1982. Dünnschicht-chromatographie von Flavonoiden auf Polyamid-Schichten. *Suppl. Chromatogr.*, p. 50-54.

- WOLLENWEBER, E. 1982. Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J.B. & MABRY, T.J. (eds.). **The Flavonoids: Advances in Research**. Chapman & Hall (London).
- WOLLENWEBER, E. & DIETZ, V.H. 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, 20(5): 869-932.
- WOOF, J.B. & PIERCE, J.S. 1967. Separation of complex mixtures of polyhydroxyphenols on columns of Sephadex. **J. Chromatogr.**, 28: 94-103.
- WULF, L.W. & NAGEL, C.W. 1976. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 116: 271-279.







