

Идентификација и определување на флавоноиди во *Eryngii herba (Eryngium campestre L., Apiaceae)*

Флурим Небија¹, Светлана Кулеванова^{2*}, Марина Стефова³

¹Медицински факултет, Оѝсек фармација, Универзитет во Приштина, Косово

²Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија

³Природо-математички факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, Македонија

Примен октомври 2006, прифатен јуни 2006

Апстракт

Испитувани се флавоноидни компоненти во примероци од *Eryngii herba, Eryngium campestre* L. (Apiaceae) собрани од три различни локалитети во Косово. Воспоставени се TLC и HPLC методи за идентификација, и методи за квантифицирање на содржина на вкупни флавоноиди (спектрофотометриски метод) и содржина на вкупни флавоноли (HPLC метод). Во екстракти добиени после хидролиза на хетерозидните форми, утврдено е присуство на неколку флавоноли од кои се идентификувани кварцетин и кемферол. Квантитативна анализа покажа дека доминантен агликон е кемферол. Содржината на вкупните флавоноиди се движи во граници од 0,12-0,14%, а на вкупните флавоноли од 0,04-0,13%, определени со спектрофотометриски и со HPLC метод, соодветно.

Клучни зборови: *Eryngium campestre*, флавоноиди, идентификација, определување, HPLC.

Вовед

Eryngium campestre L. (Apiaceae) е повеќегодишно растение, распространето во Европа, особено во областа на Медитеранот (1). Од растението се користат хербата и коренот, главно во народна медицина за третман на различни заболувања во уринарниот тракт, за регулирање на нарушена функција на простатата, при воспаленија на горниот респираторен тракт и други состојби (2). Според наодите во поновата фармакогностичка литература, на *E. campestre* му се препишуваат: диуретично, спазмолитично, нефролитично и аналгетично дејство. Се препорачува за употреба при воспаленија на урогениталниот тракт, при цистити, уретрити, тешко уринирање, бубрежни и жолчни колики, хематурија, простатитис, воспаленија на жолчните патишта и друго (3).

Големата примена во народната медицина како и определените резултати од испитувањата на биолошката и фармаколошката активност на видовите од родот *Eryngium*, ги прават претставниците од овој род особено интересни за проучување на хемискиот состав и утврдувањето на потенцијално активните компоненти, одговорни за определни ефекти. Во поглед на вакви испитувања посебно се интересни низа податоци што се однесуваат на проучувањето на сапонинските и низа други соединенија. Така, во различни претставници од родот *Eryngium* е утврдено присуство на тритерпенски сапонини (4-9), кумарински деривати (10), пиранокумарини (11), различни ацетилени (фалкаринол, фалкаринон и сл.) (12, 13), шеќерни алкохоли (14, 15), различни стероли (β -ситостерол, α -хелестерол, брасикастерол, кампестрол, стигмастерол, клеростерол, авенастерол) (15) и друго.

Во однос на фенолните соединенија, флавоноидните компоненти се подетално проучувани во претставници од родот *Eryngium*. Податоците покажуваат дека видот *E. planum* содржи кемферол и

* svku@ff.ukim.edu.mk

негови хетерозиди (16, 17), видот *E. ilicifolium* делтоин (18), *E. maritimum* хетерозиди на кемферол, изокверцетин и астрагалин (17), а *E. creticum* делтоин и кверцетин (15). Податоците за флавоноидните компоненти во видот *E. campestre* се доста оскудни и се однесуваат на утврдено присуство на хетерозиди на кемферол, изорамнетин, лутеолин и кверцетин (19, 20).

Целта на овој труд е воспоставување на методи за идентификација и определување на флавоноиди во примерици од *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L.).

Експериментален дел

Расийиелен мајеријал

Во испитувањето беа вклучени примероци од сув надземен дел (*Eryngii herba*) собрани од растенија во цвет, преку лето, на три локалитети во Косово, во околината на Приштина (лок. 1), Подуево (лок. 2) и Липљан (лок. 3). Примероците од хербата се соодветно обележени со: Н₁, Н₂ и Н₃ за примероците што се собрани во 2002 година и со Н₄, Н₅ и Н₆ за примероците од истите локалитети што се собрани во 2003 година.

Испийување на флавоноиди

Хромајографија на џенослој (TLC)

Подгојовка на расийворој за испийување. - Иситнетата дрога (5 g) претходно се третира три пати со по 50 mL петролетер за да се отстрани хлоропластот и баластните материи, во траење од 15 min. Потоа на дрогата се додаваат 5 mL 2M HCl (хидролиза на хетерозидите) и 50 mL вода и се загрева на водена бања два часа. По ладење се филтрира и филтратот се префрла во одделителна инка во која се вршат три екстракции со по 20 ml етер. Етерските фракции се спојуваат и се испираат три пати со по 50 ml дестилирана вода, за да се отстрани заостанатата HCl. Потоа етерскиот раствор се испарува до суво и на сувиот остаток се додава 1-2 mL метанол. Метанолниот раствор се користи за испитување флавоноиди со хроматографија на тенок слој.

Расийвор за сјоредување. - По 0,1 mg стандардни супстанции од флавоноидите кемферол, кверцетин и лутеолин се раствораат во 2 mL метанол.

Сџационарна фаза: Kieselgel GF 254 готова стаклена плоча.

Мобилна фаза. - Користени се мобилни фази за кои авторите од порано имаат сознанија за добра сепаративна моќ на флавоноидни компоненти (21):

1. толуен : етанол : мравска киселина = 58:33:9 (V/V) (S₁)
2. хлороформ : метанол = 93:7 (V/V) (S₂)
3. бензол : метанол : оцетна киселина = 45:3:2 (V/V) (S₃)
4. бензол : диоксан : оцетна киселина = 90:25:4 (V/V) (S₄)

Дејекција. - UV светлина (254 и 366 nm), 5% раствор AlCl₃ во метанол на дневна и под UV светлина (21).

Сџекрофојомејриско ојредување на вкујни флавоноиди

Определувањето на вкупните флавоноиди е изведено со спектрофотометриски метод. Користена е вообичаената постапка која вклучува хидролиза на гликозидите, екстракција на вкупните флавоноидни агликони во етилацетат и комплексирање со AlCl₃ (22). Калибрацијата е направена со стандарден раствор на лутеолин и кверцетин, а мерењето на апсорбанцата е направено на $\lambda = 425$ nm.

Посџајка: 1 g сомелена дрога се става во ерленмаер во кој се додава 15 mL ацетон, 0,5 mL HCl 25 % и 0,5 mL раствор на уротропин (1 % воден раствор). Ерленмаерот со содржината во него се става да врие на водена бања со повратно ладило во период од 40 min на температура од 60 °C. По истекот на 40-те минути, ерленмаерот се тргнува од водената бања, растворот се лади и филтрира преку малку памук во одделителна инка. Остатокот со филтер хартија се враќа во ерленмаерот во кој се додава нова порција реагенси односно, 10 mL ацетон, 0,5 mL (25 %) HCl и 0,5 mL (1%) раствор на уротропин и одново се става на водена бања со повратно ладило, но овојпат 20 min. По ладењето се филтрира во истата одделителна инка, во која се додава 25 mL вода и се екстрахира 3 пати со по 15 mL етилацетат. Вака добиените етилацетатни фракции се собираат заедно во одделителната инка и се "перат" два пати со по 30 mL вода. Вака добиениот етилацетатен екстракт се суши со 1 g безводен Na₂SO₄ 30 min и се филтрира во одмерна тиквичка од 50 mL и се дополнува со етилацетат до пропишаниот волумен.

HPLC анализа на флавоноиди

Стандардни сустанции. - Стандардите од флавоноидите што беа користени во испитувањата се: кемферол (3,5,7,4'-ОН флавон); кверцетин (3,5,7,3',4'-ОН флавон) и мирицетин (3,5,7,3',4',5'-ОН флавон) (Extrasynthese, Лион, Франција).

Реагенси. - Растворувачите користени како мобилни фази беа составени од: водна фаза закиселена со фосфорна киселина, органски растворувач метанол (CH₃OH) и ацетонитрил (CN₃CN), со чистота за HPLC (HPLC grade) од производителите Sigma-Aldrich и Rathburn. Сите реагенси и хемикалии користени во работата беа со аналитички степен на чистота. Користени се: хлороформ, метанол, етилацетат, безводен натриум сулфат (Алкалоид, Скопје).

Апаратура. - Методот за разделување и определување на флавоноли со примена на високоефикасна течна хроматографија беше разработен со течен хроматограф од производителот Varian, опремен со тернарна пумпа модел 9012 и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV diode-array detector) модел 9065 Polychrom. За следење на елуирањето и за обработка на хроматограмите беше користен софтверскиот пакет Varian Star 4.5 како и неговата понова верзија Star LC Workstation 5.0. Пробите беа внесувани во колоната преку инјектор од производителот Rheodyne модел 7125 со резервоар за проба со волумен од 20 µL. За добивање на репродуцибилни резултати колоната беше термостатирана во загревач на колоната (CH-30) и температурен контролер (TS-45) од производителот Eppendorf.

Подготовка на пробите за анализа. - 1 g од смелената дрога се обработува на потполно ист начин како што се постапува и при подготовката на пробите за определување на вкупни флавоноиди со спектрофотометриски метод. Добиеениот етил-ацетатен раствор (екстракт) се упарува до суво. На сувиот остаток му се додава 2 mL метанол и овој метанолен екстракт се испитува со HPLC методата за идентификација и квантификација на флавоноидните агликони.

За идентификација беа употребени:

- високоефикасната течна хроматографија со UV-детектор со низа од диоди, со стационарна фаза: C18 реверзно фазна колона со должина 25 cm,

внатрешен дијаметар 0,46 cm и големина на честичките од 5 µm од производителот Varian.

- мобилната фаза беше составена од водена фаза (дестилирана вода или дестилирана вода закиселена со оцетна или мравска киселина) и метанол и/или ацетонитрил. Идентификацијата беше вршена со споредба на UV-спектрите и времињата на задржување на компонентите од анализираните екстракти со оние на стандардните супстанции.

За квантификација беа употребени:

- високоефикасна течна хроматографија со UV-детектор со низа од диоди за квантитативна анализа на поединечни флавоноли, флавоноли и/или флаванони, при што како мерка за нивна застапеност беше користена површината под пиковите на соодветните супстанции. За таа цел беше развиен метод за елуирање со градиентно менување на составот на мобилната фаза, кој детално е прикажан во делот *Резултати и дискусија*.

Резултати и дискусија

Идентификација на флавоноидите во Eryngii herba

TLC анализа

Резултатите од испитувањата на флавоноидите со хроматографија на тенок слој (TLC анализа) покажуваат присуството на 3 флавоноиди, кои прелиминарно со компаративна анализа со соодветни стандардни супстанции се идентификувани како: кемферол, кверцетин и лутеолин (Табела 1.).

2. HPLC анализа

За идентификација на флавоноидните компоненти во екстракти од *Eryngium campestre* воведена е HPLC метода со реверзно фазна стационарна фаза (C18). Со воспоставената метода извршено е определување на ретенционите времиња на избраните стандардни супстанции на флавоноиди чие присуство се очекува во растителниот материјал. Генерално земено, очекуваниот редослед на елуирање од реверзно фазната колона е следниот: полярни компоненти (фенолни киселини и фенолни и флавоноидни хетерозиди), потоа флавоноски агликони зависно од бројот на OH⁻ групи, а во понатамошниот тек од сепарирањето евентуално присутни флавоноиди со ОСН₃-групи, бидејќи зголемувањето на нивниот број во однос на OH-групите резултира во поголемо време на задржување. Во случајот на екс-

Табела 1. Резултати од TLC анализа на екстракти од херба од *E. campestre*

	<i>R_f</i> вредност во системот S ₁	<i>R_f</i> вредност во системот S ₂	<i>R_f</i> вредност во системот S ₃	<i>R_f</i> вредност во системот S ₄
Кемферол F ₁	0.69	0.63	0.61	0.26
	0.67	0.64	0.61	0.24
Кверцетин F ₂	0.48	0.44	0.52	0.16
	0.50	0.43	0.54	0.18
Лутеолин F ₃	0.45	0.33	0.48	0.15
	0.46	0.36	0.45	0.15

F₁, F₂, F₃ - aglikoni prisutni vo ekstraktite od herbata; S₁- S₄ mobilni fazi (S₁- toluen: EtOAc:HCOOH 58:33:9.v/v); S₂-CHCl₃: MeOH(93:7.v/v); S₃-C₆H₆:MeOH: HoAc(45:3:2.v/v); S₄- C₆H₆:Diox:HoAc (90:25:4)

тракти од *Eryngium campestre* добиени со претходна хидролиза на гликозидите очекувано беше присуството на флавоноли и заради тоа смесата од стандарди за споредба беше составена од мирицетин, кверцетин и кемферол. Експерименталните услови се поставени во согласност со очекувањето на флавонолни агликони, но не и гликозиди во анализираниот екстракт. Заради тоа, на почетокот мобилната фаза содржи значаен удел на органскиот растворувач-ацетонитрил, а температурата на колоната се одржува на 30°C, за да се добијат репродукцибилни времиња на задржување на испитуваните компоненти. Методот за менување на составот на мобилната фаза е даден во Табела 2.

Времињата на задржување на мирицетин, кверцетин и кемферол добиени со елуирање со оваа метода се: 4,55; 7,26 и 12,70 min, соодветно, што значи дека времетраењето на една HPLC анализа е 20-30 минути. На Сл. 1.1. се дадени хроматограмите од смесата од стандарди и од екстракт од *Eryngium campestre* на бранова должина од 254 nm. Очигледно е присуството на кверцетин и кемферол кое е потврдено и со нивните UV-спектри (Сл. 1.2.), додека не е детектиран мирицетин. Со внимателно проучување на UV-спектрите на пикот од кемферол се забележува еден мал пик веднаш до изразениот пик од кемферол со UV спектар скоро идентичен со оној на кемферол (Сл. 1.2.). Статистичката обработка на UV спектрите од пикот на кемферол и пикот веднаш до него покажа дека и тој може, во натамошната анализа, да се смета за кемферол.

Со HPLC анализа на екстракти од херба од *E. campestre*, извршена е идентификација на флавоноидните компоненти. При тоа е утврдено присуство на кемферол како доминантна флавоноидна компонента во сите испитувани екстракти, добиени по хидролиза на хетерозидните форми, а во помала мера присуство и на кверцетин.

Табела 2. Метод за градиентно елуирање за идентификација на флавонолни агликони

<i>t</i> /min	W(H ₂ O; pH=3, H ₃ PO ₄)/%	w(CH ₃ CN)/%
0-10	65	35
20-40	35	65

проток: 1,0 mL/min
температура: 30 °C

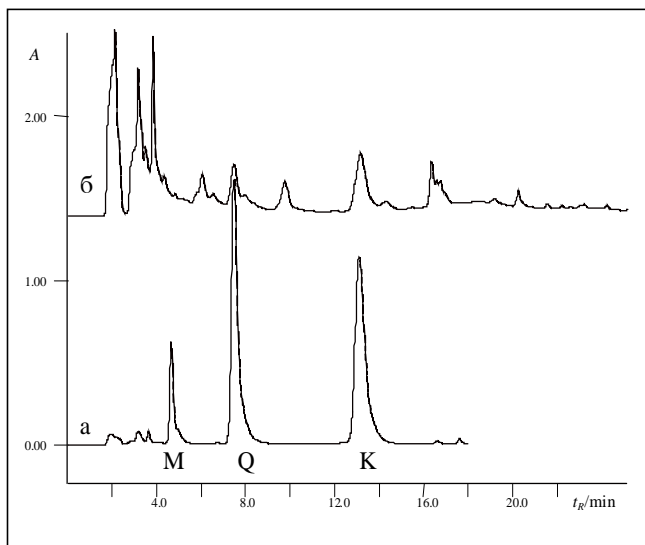
Квантитативно одредување на вкупни флавоноиди

1. Спектрофотометриски метод

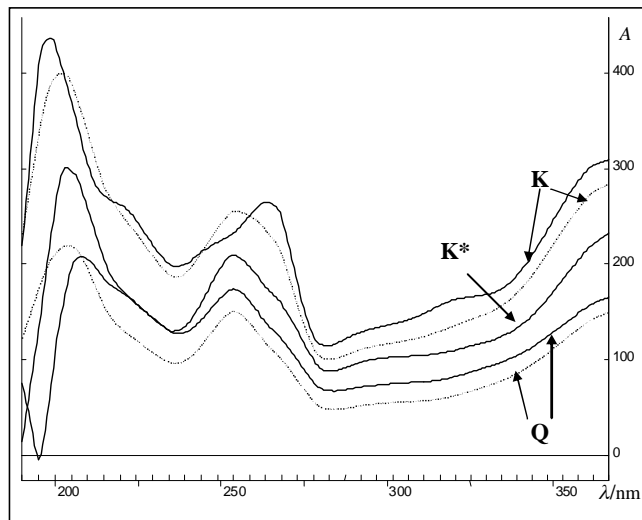
Определувањето на вкупните флавоноиди е извршено со спектрофотометриски метод, користејќи AlCl₃ како комплексирачки реагенс. Резултатите од определувањето на вкупни флавоноиди во примероци од херба на *E. campestre* се дадени во Табела 3. Во сите испитувани примероци содржината на вкупни флавоноиди пресметана како кверцетин се движи во количини пониски од 0,5% (0,12-0,14%).

2. HPLC метод

За квантитативно определување на идентификуваните флавоноли во екстракти од *Eryngii herba* приготвени со претходна хидролиза на гликозидите е употребен методот што е искористен и за квалитативната анализа. Всушност, за потребите на квантитативната анализа извршена е модификација на предходно воспоставениот и валидиран метод за определување на кверцетин во растителни екстракти добиени со вклучена хидролиза на хетерозидните форми (23). Изборот на оптимална бра-



Сл. 1.1. Хроматограми: а. смеса од стандарди (М-мирицетин; Q-кверцетин и К-кемферол, и б. екстракт од *E. campestre* (на бранова должина од 254 nm).

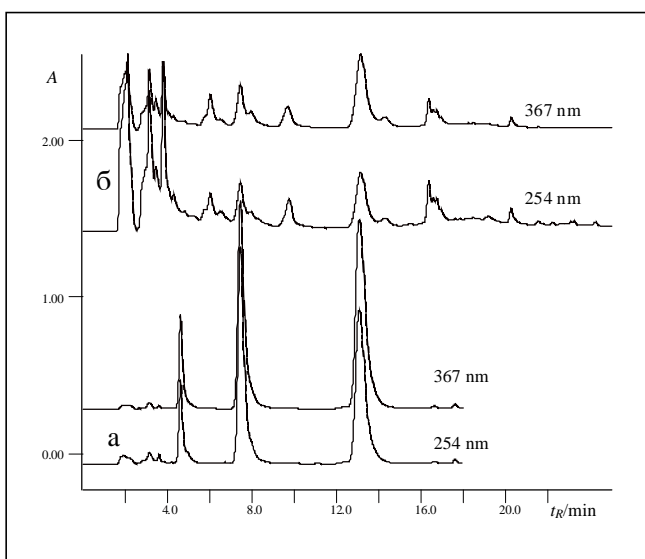


Сл. 1.2. Ултравioletови спектри на пиковите од кверцетин, кемферол и пикот до кемферол (K*) претставени со полни линии, споредени со спектрите на соодветните стандарди, испрекинати линии.

Table 3. Резултати од определување на вкупни флавоноиди во херба од *E. campestre* (w/%)

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆
w/%	C1=0,125 C2=0,128 C3=0,120 X=0,124	C1=0,134 C2=0,131 C3=0,140 X=0,135	C1=0,124 C2=0,138 C3=0,120 X=0,127	C1=0,145 C2=0,105 C3=0,133 X=0,128	C1=0,120 C2=0,160 C3=0,105 X=0,128	C1=0,130 C2=0,128 C3=0,170 X=0,143
Sd	0,004	0,005	0,009	0,029	0,040	0,033
CV	3,23	3,71	7,09	22,66	31,25	23,08

H1-H6 - primeroci od herba; Sd - standardna devijacija; CV - koeficient na varijacija



Сл. 2. Хроматограми од: а. смеса од стандарди и б. екстракт од *E. campestre* на 254 и 367 nm

нова должина за следење на елуирањето на компонентите од колоната е многу значаен во поглед на осетливоста и селективноста при квантитативното определување на бараните компоненти од примерокот. Во овој случај, изборот е 254 nm, како највообичаена, и 367 nm, каде флавонолите имаат апсорпционен максимум. Елуирањето на компонентите од екстракт од *Eryngii herba* следено на 254 и 367 nm е прикажано на Сл. 2. каде е очигледна подобрата резолуција на пиковите од кверцетин и кемферол на 367 nm, во споредба со онаа на 254 nm. Ова се должи на поголемиот моларен апсорпционен коефициент на кемферолот на 367 nm како и на помалата, и дури незначителна, апсорпција на другите компоненти кои не се од интерес при анализата на флавоноидните компоненти.

Како што беше кажано при идентификацијата, пикот од кемферол има многу поголема површина во споредба со оној од кверцетин. Во кванти-

тативната анализа се можни неколку пристапи: определување на содржината на секој од флавонолите, посебно, определување на содржина на вкупни флавоноли пресметани како кверцетин или определување на вкупни флавоноли пресметани како кемферол.

Бидејќи во проценката на квалитетот на растителните суровини поголемо значење има определување на вкупната содржина на компоненти од интерес, во овој случај флавонолски компоненти, направен е обид да се квантифицива вкупната застапеност на двата флавоноли и да се изрази преку кемферол. За споредба вкупните флавоноли се изразени и преку молекулската маса на кверцетин, а направена е и проценка на грешката што би се направила доколку вкупните флавоноли се изразат како кверцетин.

За да се реализира квантитативната анализа направена е калибрација со надворешни стандарди од кверцетин и кемферол во подрачјето на концентрации од 0,11 mg/mL, или изразено во маса на кверцетин, односно кемферол, инјектирана во колоната 220 μ g (резервоар за примерокот 20 μ L).

Линеарна зависност на површината под пикот од масата на кверцетин, односно кемферол, беше забележана во целото испитувано концентрационно подрачје.

Равенките на правите добиени за 254 nm и 367 nm, заедно со соодветните вредности за коефициентите на корелација (R^2) се следните:

254 nm:	$A = 8,93 \cdot 10^6 \cdot m(\text{кверцетин}) + 6,13 \cdot 10^4$	$R^2 = 0,9975$
	$A = 4,53 \cdot 10^6 \cdot m(\text{кемферол}) + 3,61 \cdot 10^4$	$R^2 = 0,9990$
367 nm:	$A = 8,73 \cdot 10^6 \cdot m(\text{кверцетин}) + 9,88 \cdot 10^4$	$R^2 = 0,9975$
	$A = 5,98 \cdot 10^6 \cdot m(\text{кемферол}) + 7,08 \cdot 10^4$	$R^2 = 0,9982$

каде A = површина под пикот на кверцетин и кемферол на соодветната бранова должина.

Повисоката вредност за наклонот на калибрационата права добиена за 367 nm за кемферол, заедно со споменатата подобра резолуција на оваа бранова должина, доведува до заклучок дека 367 nm е оптималната бранова должина за детекција при определување на кемферол. За кверцетинот, како што може да се забележи од коефициентите на правец кои се блиски, овој заклучок, исто така важи, но пред сè заради подобрата резолуција од други присутни компоненти, кои слабо или воопшто не апсорбираат во ова подрачје на повисоки бранови должини.

Резултатите од определувањето на кемферол и кверцетин во екстрактите од *Eryngium campestre* од различни локалитети приготвени со хидролиза, како што беше опишано во Експерименталниот дел, на двете бранови должини се дадени во Табела 4. Како што може да се види од табелата доминантен флавонол во екстрактите од *Eryngium campestre* приготвени со хидролиза е кемферолот чиј масен удел се движи од 0,029-0,103 %, додека кверцетинот е застапен од 0,001-0,019 %. Овие резултати ни сугерираат дека би можело присуството на вкупни флавоноли во оваа дрога да се пресмета и само преку кемферолот и на тој начин да се поедностави аналитичката процедура. Така, масениот удел на вкупните флавоноли изразени преку кемферол се движи од 0,0390,135 %.

Грешката што при ваквиот начин на изразување на вкупните флавоноли би се направила се движи од 9,14-19,61 %, или просечно 12,52 %. Ако аналогно, се пресметаат вкупните флавоноли преку кверцетин, грешката е значително поголема (18,11-25,47 %, просечно 23,10 %) и е негативна т.е. се добиваат значително пониски резултати. Сето ова се должи на поголемиот апсорпционен коефициент на 367 nm на кверцетин во однос на кемферол што се гледа и од поголемиот коефициент на правец на калибрационата крива на кверцетин. Според тоа, може да се смета дека содржината на вкупни флавоноли во дроги каде што е доминантно присуството на кемферол може

да се изрази само преку кемферолот. Притоа, значи, се користи калибрација со стандардни раствори од кемферол и добиените вредности за вкупните флавоноли се добра проценка за нивната реална застапеност во испитуваните дроги.

Од резултатите што се прикажани во Табела 4. може да се види дека содржината на вкупните флавоноиди (кемферол+кверцетин) во хидролизати од дрогата *Eryngii herba*, определена со HPLC методот (0,04-0,13%) е пониска од вредностите што се добиени со спектрофотометричкиот метод (0,12-0,14%). Ова може да се објасни со фактот дека во

Table 4. Резултати од определувањето на застапеноста на кверцетин и кемферол во екстракти од *Eryngii herba* (на 254 и 367 nm)

	Масен удел			% (вкуп. флавоноли) пресметано		Релативна грешка	
	% К	% Q	%(К+Q)	преку К	преку Q	% грешка К	% грешка Q
Примерок							
Н ₁ (Приштина)	0,037	0,001	0,038	0,042	0,029	12,98	-22,68
	0,056	0,002	0,058	0,064	0,044	9,45	-25,20
Н ₂ (Приштина)	0,044	0,003	0,046	0,052	0,036	12,40	-23,13
	0,063	0,006	0,069	0,076	0,052	10,57	-24,47
Н ₃ (Липљан)	0,061	0,005	0,066	0,073	0,050	10,45	-24,54
	0,076	0,006	0,083	0,090	0,062	9,14	-25,47
Н ₄ (Липљан)	0,029	0,004	0,033	0,039	0,027	19,61	-18,11
	0,041	0,007	0,048	0,056	0,039	16,41	-20,41
Н ₅ (Подујevo)	0,103	0,019	0,122	0,135	0,092	10,85	-24,35
	0,049	0,008	0,056	0,065	0,044	14,49	-21,75
Н ₆ (Подујevo)	0,066	0,007	0,073	0,081	0,055	10,69	-24,40
	0,049	0,006	0,055	0,063	0,043	13,18	-22,64

случајот кога се користи HPLC метод, во пресметка се земаат само површините на пиковите на двата агликона: кверцетин и кемферол. Кога вкупните флавоноиди се определуваат со спектрофотометрискиот метод, тогаш сите флавоноиди што се присутни во хидролизатот, а што имаат способност да го комплексираат Al³⁺ јонот, реагираат со него и влијаат на вредноста на абсорбанцата на кверцетинот. Оттука, оправдано може да се очекува определената содржина на вкупни флавоноиди да биде повисока.

Литература

1. В. Дервенци, *Природни лековити и ароматични сировини, второ издание*, Маринг, Скопје, 1997.
2. Стојанов Н., Китанов Б. (1960), Диви полазни растенија в Бугарија. Издавателство на Булгарската академија на науките; Софија, 1960
3. И. Асенов, С. Николов, *Фармакогнозија*, Медицина и физкултура, Софија, 1988.
4. К. Hiller, E. Friedrich, *Isolating antimycotically active saponin mixtures from umbelifers*. Ca 85, 83220^a, 1975.
5. К. Hiller, M. Keipert, S. Pfeifer, *Pharmazie* **27**(5), 341-3 CA 77, 111507e. 1972.
6. К. Hiller, K.Q.C. Nguyen, P. Franke, *Pharmazie*, **33**(1), 78-80 CA 89, 39372k, 1978.
7. К. Hiller, V.Th. Nguyen, G. Lehman, E. Grundemann, *Pharmazie*, **29**(2), 148-9 (Ger)-Ca 81, 74885m, 1974.
8. К. Hiller, V.M. Mach, P. Franke, *Pharmazie*, **31**(1), 53 (Ger)-CA 84, 161754y, 1976.
9. К. Hiller K., K.Q.C. Nguyen, P. Franke, R. Hintsche, *Pharmazie*, **31**(13), 891-3(Ger)-CA 86, 68400m, 1976.
10. M.H.A. El-Gamal, F.K. Ei-Bay, B.A.H. Ei-Tawill, K.Z. Gadalla, *J. Chem.*, **18**(4), 767-72, 1978.
11. C.A.J. Erdelmeier, O. Sticher, *Planta Medica* (No.5) 407-409 CA 104, 85399a, 1985.
12. D. Drake, J. Lam, *Phytochemistry*, **11**(8), 2651-2 CA 77, 111504b, 1972.
13. J. Lam, L.P. Christensen, T. Thomasen, *Phytochemistry*, **31**(8), 2881-2 CA 117, 167715h, 1992.
14. Iv. Assenov, R. Gevrenova, *Farmatsija – Sofia*, **41**(5-6), 26-8, 1991.
15. S. Al-Khail, *Alexandria J. Pharm. Sci.*, 873-5 CA 121, 251251u, 1994.
16. К. Hiller, B. Pohl, P. Franke, *Pharmazie*, **36**(6) 451-2 CA 95, 111731v, 1981.
17. L. Stecka-Paszkievez, *Z. Chem.*, **23**(8), 294-5, 1983.
18. M. Pinar, M. P. Galan, *J. Nat. Prod.*, **48**(5), 853-4 (1985).
19. T. Karting, J. Wolf, *Planta Med.*, **59**(3), 285 CA 119, 156307s, 1993.
20. T. Kartnig, J. Wolf, *Planta medica*, **59** (3) 285, 1993.
21. С. Кулеванова, Докторска дисертација, Фармацевтски факултет, Универзитет Св. Кирил и Методиј, Скопје, 1997.
22. European Pharmacopoea (V) 5th edition, Councle of Europe, Strazbourg, 2004.
23. Stefova M., S. Kulevanova, T. Stafilov, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **24**, 2283-2292 (2001).

Summary

Identification and determination of flavonoids in *Eryngii herba* (*Eryngium campestre* L., Apiaceae)

Flurim Nebija¹, Svetlana Kulevanova², Marina Stefova³

¹Medical faculty, Section Pharmacy, University in Prishtina, Kosovo

²Faculty of Pharmacy, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

³Faculty of Science, University of Ss. Cyril and Methodius, Skopje, Republic of Macedonia

Key words: *Eryngium campestre*, flavonoids, identification, determination, HPLC.

Research on the flavonoids in the plant drug *Eryngii herba*, *Eryngium campestre* L. (Apiaceae), collected from three different localities from Kosovo, have been done in this work. TLC and HPLC methods were established for identification purposes and spectrophotometric and HPLC methods for quantification of flavonoids were made as well. In the plant extracts obtained after hydrolyse of flavonoglucosides, few different flavonols has been recognised but only quercetin and kaempferol have been identified. According quantitative analyse, the most abundant flavonol was kaempferol. The content of total flavonoids was from 0.12-0.14 % and for total flavonols from 0.04-0.13 %, determined by spectrophotometric and HPLC methods, respectively.
