
Mihajlo Filep

Kvalitativna i kvantitativna analiza sekundarnih metabolita sremuša (*Allium ursinum* L.) i određivanje njihove biodostupnosti

Ispitivan je sastav sekundarnih metabolita sremuša (*Allium ursinum* L.) i njihova biodostupnost. U narodu je ova biljka poznata po svojim lekovitim svojstvima, koja nisu u potpunosti dokazana. U nekim ranijim istraživanjima je dokazana antitumorska aktivnost pojedinih biljaka iz roda *Allium* (pre svega *Allium sativum* i *Allium schoenoprasum*). U ovom radu je potvrđeno prisustvo kardiotioničnih i kumarinskih glikozida, heteropolisaharida, flavonoida, flavona i tanina i odsustvo alkaloida. Standardnim spektrofotometrijskim merenjima određena je koncentracija ukupnih fenola (2.90 ± 0.02 mg/g) i dokazanih grupa fenola i heteropolisaharida (broj bubrenja 13 mL/g). In vitro simuliranom digestijom određen je udeo ukupnih fenola, flavonoida, tanina i heteropolisaharida koji se resorbuje tokom varenja. Rezultati pokazuju da se resorbuje znatan deo polifenolnih jedinjenja izuzev tanina, pri čemu biodostupnost za ukupne polifenole iznosi 74%. Prisustvo kardiotioničnih i kumarinskih glikozida i biodostupnost netaninskih fenola daju osnov primeni sremuša u narodnoj medicini i ishrani, kao i za rad na njihovom izolovanju.

Uvod

Sremuš (*Allium ursinum* L.) je samonikla biljka iz porodice amarilisa (Amaryllidaceae). U ljudskoj ishrani se koriste mladi listovi, čiji ukus podseća na ukus belog luka. Ukus sremuša potiče od S-alil-L-cistein sulfoksida (aliin) i S-metil-L-cistein sulfoksida (metiin). U narodnoj medicini sremuš je poznat kao sredstvo za detoksikaciju organizma (Schmitt *et al.* 2005).

U ovom radu urađena je kvalitativna i kvantitativna analiza sekundarnih metabolita ekstrahovanih iz listova sremuša. Od sekundarnih metabolita su određeni fenoli, glikozidi i alkaloidi, a u slučaju kada je njihovo prisustvo potvrđeno, isti su bili i kvantifikovani.

Mihajlo Filep (1995),
Novi Sad, Braće
Ribnikar 45, učenik 2.
razreda Medicinske
škole „7. april” u
Novom Sadu

MENTOR:
Igor Asanović, student
Hemijskog fakulteta
Univerziteta u
Beogradu

Kao mera uspešnosti resorpcije konstatovanih metabolita ispitana je njihova biodostupnost. Naime, prilikom prolaska hrane kroz digestivni trakt, samo određeni udeo supstanci unetih hranom se i resorbuje. Kako neresorbovani deo supstanci biva izbačen, u njemu prisutni sekundarni metaboliti, bez obzira na prisustvo u biljci, nemaju nikakvog efekta po čoveka. Za određivanje biodostupnosti se koristi simulirano varenje, koje se vrši u *in vitro* uslovima. Biodostupnost predstavlja maseni udeo supstance koja se resorbuje tokom digestije i obično se izražava u procentima.

Sekundarni metaboliti

U sekundarne metabolite se ubrajaju svi produkti metabolizma koji ne učestvuju u rastu i razvoju biljke jer su energetske i gradivno bezvredne (Fraenkel 1959). Oni su sporedni produkti metabolizma koji imaju ulogu u mimikriji, odbrani, razmnožavanju biljke itd. (Stamp 2003), a većina njih je farmakološki aktivna. Svi sekundarni metaboliti mogu se svrstati u četiri velike grupe: alkaloide, fenolna jedinjenja, terpeni i glikozide (Wink 2003).

Alkaloidi su slabobazna organska azotna jedinjenja, često gorkog ukusa (poput kofeina). Veoma retko se nalaze slobodni u biljci, češće u vidu soli nespecifičnih (jabučna, vinska), specifičnih (mekonska) ili neorganskih (sulfatna) kiselina. U biljci se najčešće nalazi jedan alkaloid kao glavni, a pored njega više sporednih alkaloida (Gorunović 1995). Alkaloidi na ljudski organizam deluju pri malim koncentracijama i stoga se koriste kao aktivna supstanca u mnogim lekovima. U većim koncentracijama su otrovni i mogu izazvati zavisnost kod čoveka. Njihova uloga u biljkama nije sasvim razjašnjena, ali se smatra da je odbrambene prirode.

Biljni fenoli su jedinjenja koja imaju izraženu antioksidativnu aktivnost, a u biljkama se javljaju uglavnom u obliku polifenolnih jedinjenja (Tumbas 2010). Pretpostavlja se da je zahvaljujući njima izražen alelopatski efekat mnogih biljaka (alelopatski efekat je biološka pojava pri kojoj neki organizam sintetiše hemikalije koje ometaju rast, razvoj ili razmnožavanje drugog organizma; Stamp 2003). Time se omogućava opstanak u sredini u kojoj postoje biljne vrste koje su prilagođenije lokalnim uslovima. Mnogi fitofenoli (biljni fenoli) daju cvetovima i plodovima boju (npr. kvercetin boji cvetove žuto) ili ukus (tanini, na primer, izazivaju osećaj gorkog). Tanini imaju antimikrobnu ulogu i štite biljku od infekcija. Fitofenoli se u medicini koriste kao preventivna sredstva za sprečavanje pojave tumora, dok flavonoidi potpomažu hidrolizu lipidnih peroksida tako što uklanjaju slobodne radikale u mastima niske gustine (eng. low density lipids, LDL) (Zern i Fernandez 2005).

Terpeni su sekundarni metaboliti koji ulaze u sastav aromatičnih ulja i u njima su rastvoreni liposolubilni vitamini (D, E, A, K). Najpoznatiji

terpeni su sluzi, koje su deo stalnog sastava biljke, i gume koje stvaraju samo pojedine vrste prilikom oštećenja organizma. Terpeni u biljci imaju zaštitnu ulogu (smola), a u narodnoj medicini se koriste biljke sa značajnom količinom lako isparljivih terpena u aromaterapiji. U ovu grupu se ubrajaju i biljni steroli koji se koriste za sprečavanje nastanka tumora (Woyengo *et al.* 2009) i za snižavanje čestica masti velike gustine (eng. high density lipid, HDL).

Različite klase sekundarnih metabolita biljaka vezuju se za šećere, obrazujući glikozide. Glikozidi se prema hemijskoj strukturi dele na fenolne, flavonoidne, antrahionske, sumporne, cijanogene i kumarinske glikozide, a prema farmakodinamičkom delovanju na kardiotonične i gorke glikozide. Hidrolizom sumpornih glikozida oslobađa se miris koji podseća na miris belog luka i karakterističan je za rod *Allium*. Kumarinski glikozidi utiču na krvne sudove tako što stimulišu vazodilataciju i često se javljaju sa kardiotoničnim glikozidima koji pojačavaju snagu miokarda. Cijanogeni glikozidi imaju antitumorski efekat koji se ostvaruje hidrolizom glikozida, pri čemu se oslobađa cijanovodonik koji je citotoksičan.

Materijali i metode

Za analize su korišćeni listovi sremuša, koji potiču iz šuma iz okoline Ledinaca (Fruška Gora). Droga je osušena prirodnim putem, u odsustvu sunčeve svetlosti. Sveža droga je korišćena za analizu glikozida, a njena svežina je očuvana smrzavanjem na temperaturi od -10°C .

Kvalitativna analiza

Dokazivanje alkaloida. U levku za odvajanje je potopljeno dva grama droge u 20 mL etra u prisustvu nekoliko kapi koncentrovanog rastvora amonijaka. Nakon 20 minuta dodato je 20 mL etanola. Ekstrakcija je ponovljena četiri puta, nakon čega bi trebalo izolovati čiste alkaloide, ukoliko su prisutni u drogi. Dobijeni ekstrakt je korišćen za hromatografiju na tankom sloju kao preciznija metoda za određivanje grupe alkaloida, korišćenjem sistema eluenata toluen-etil-acetat-dietilamin u zapreminskom odnosu 7:2:1. Za dobijanje hromatograma korišćen je silikagel G, koji je izazvan prskanjem Dragendorfovom reagensom (Gorunović 1995).

Dokazivanje glikozida. Kardiotonični glikozidi su ekstrahovani tako što je jedan gram droge potopljen u 15 mL etanola masenog udela 97% u Erlenmajerovom sudu, a zatim zagrevan u vodenim kupatilu pri temperaturi od 60°C uz refluks kondenzator. Ohlađena smeša je filtrirana i filtratu je dodato 50 mL vode i pet mililitra rastvora olovo-acetata koncentracije 0.3 mol/L, kako bi se smeša očistila od balastnih materija, i po-

novo filtrirana. Dokazivanje kardiotoničnih glikozida je urađeno tako što je 10 mililitara filtrata pomešano sa 2 mililitara rastvora natrijum-hidrogenofosfata i smeša je ponovo filtrirana. Kada se 5 mililitara filtrata pomeša sa 5 mililitara rastvora natrijum-pikrata masenog udela 1%, u prisustvu kardiotoničnih glikozida rastvor se boji narandžasto (Gorunović 1995).

Sumporni glikozidi su ekstrahovani mešanjem 0.5 g sveže, usitnjene droge sa vodom. Kaša je prenetu u Erlenmajerov sud i zatvorena plutanim zapašaćem u čiji je prerez sa donje strane uvučena olovo-acetatna hartija. Nakon pripremanja ekstrakta za dokazivanje sumpornih glikozida, ekstrakt je grejan na grejnoj ploči kako bi se ubrzalo oslobađanje vodonik-sulfida, koji boji olovo-acetatnu hartiju crno. Fenolni glikozidi su ekstrahovani kuvanjem 0.1 g sveže droge jedan minut sa pet mililitara vode. Zatim je smeša filtrirana. Kada se u jedan mililitar ekstrakta ukapava rastvor gvožđe(III)-hlorida masenog udela 5%, rastvor se boji smeđe-crveno u prisustvu fenolnih glikozida (Gorunović 1995).

Antrahinonski glikozidi su ekstrahovani kuvanjem 0.2 g sveže droge 3 mililitra razblažene hloridne kiseline masenog udela 10%. Kada je smeša ohlađena, izmučkana je sa deset mililitara toluena, sloj toluena je odličen u čašu i filtriran. Za dokazivanje korišćena je Borntrenerova reakcija. Pet mililitara toluenskog ekstrakta pomešano je sa dva mililitra vode i jednim mililitrom rastvora kalijum-hidroksida masenog udela 10%. Vodeni sloj se oboji crveno u prisustvu antrahiona (Gorunović 1995).

Flavonoidni glikozidi su ekstrahovani kuvanjem 0.2 g sveže droge sa 5 mL rastvora etanola masenog udela 97%, i filtriranjem. Ekstrakt je grejan sa opiljcima elementarnog magnezijuma špiritusnom lampom uz obezbeđenu kiselu sredinu pomoću koncentrovane hlorovodonične kiseline, pri čemu se u prisustvu flavonoida razvija crvena boja (Gorunović 1995).

Kumarinski glikozidi su ekstrahovani mućkanjem 0.2 g sveže droge sa pet mililitara rastvora metanola mesnog udela 70%. Dobijeni rastvor je filtriran. U ekstrakt je dodato nekoliko kapi rastvora natrijum-hidroksida koncentracije 1 mol/L. Rastvor se ozrači ultra-ljubičastom svetlošću, pri čemu bi trebalo da rastvor svetli žuto-zeleno u prisustvu kumarinskih glikozida (Gorunović 1995).

Dokazivanje fenola. Fenoli se dokazuju ispitivanjem prisustva bilo koje grupe polifenolnih jedinjenja. U levku za odvajanje je suspendovano 2 grama droge u 40 mL etra. Nakon četiri sata ekstrakcije dodato je 300 mililitara rastvora kalijum-hidroksida masenog udela 10%. Alkalni ekstrakt je filtriran, a mala količija taloga je rastvorena u etanolu masenog udela 97%, a dobijeni alkoholni ekstrakt je alkalizovan rastvorom kalijum-hidroksida masenog udela 10%, nakon čega se rastvor boji ljubičasto (Gorunović 1995).

Prisustvo tanina je dokazano pripremanjem ekstrakta koji sadrži 0.5 g droge, nekoliko kapi etanola i 100 mL vode. Smeša je potom grejana 30 minuta na temperaturi od 90°C. Za dokazne reakcije korišćen je pro-filtriran, ohlađen dekoka. Tanini su dokazani dokapavanjem neutralnog rastvora olovo-acetata (1 g olovo-acetat je rastvoreno u 9 mL vode), a grupa tanina je određena dodavanjem nekoliko kapi jedno procentnog rastvora gvožđe(III)-hlorida. Feri joni sa pirogalnim taninima daju plavu prebojenost rastvora, dok katehinski daju zelenu prebojenost (Gorunović 1995).

Digestija *in vitro*. *In vitro* digestija je metoda pomoću koje se prati tok varenja hrane pri veštačkim uslovima. Tokom digestije su simulirane četiri faze digestije: oralna, gastična, duodenalna i resorptivna. Tokom digestije je obezbeđena temperatura od 37°C. Za simuliranje oralne faze korišćena je ljudska pljuvačka. Za simuliranje gastične faze, pripremljen je rastvor zapremine 72.6 mL rastvaranjem 0.2 g kalijum-hlorida, 2.75 g natrijum-hlorida, 0.4 kalcijum-hlorida, 0.31 g amonijum-hlorida, 0.02 g Glukozamin[®]-sulfata 500, 0.085 g uree, jedan gram seruma govedih albumina (bovine serum albumin, BSA), 1 mg papaina i 0.3 mL koncentrovane hloridne kiseline u vodi (pH je podešen na 1.5). Za simuliranje duodenalne faze pripremljen je rastvor zapremine 119.8 mL rastvaranjem 7.01 g natrijum-hlorida, 3.34 g natrijum-hidrogenkarbonata, 0.08 kalijum-dihidrogenfosfata, 0.56 g kalijum-hlorida, 0.05 g magnezijum-hlorida, 0.1g uree, 0.2 g kalcijum-hlorida, jednog grama BSA, 0.18 mL koncentrovane hloridne kiseline i 3 grama leka Dipanktrin[®] u vodi (pH je podešen na 7.8). Mase dražeja Dipanktrin[®]-a su pre upotrebe izmerene i na taj način je određena potrebna masa leka za ekperiment, u odnosu na količinu aktivnih supstanci. Za simuliranje rastvora žučnih soli, pripremljen je rastvor zapremine 123 mL rastvaranjem 5.259 g natrijum-hlorida, 5.78 natrijum-hidrogenkarbonata, 0.38 kalijum-hlorida, 0.22 g kalcijum-hlorida, 0.2 mL koncentrovane hloridne kiseline 0.25 g uree, 1.8 g BSA i 6 grama pileće žuči (pH je podešen na 8). Prilagođavanje pH je urađeno koncentrovanom hloridom kiselinom ili rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 1 mol/L.

Za oralnu fazu je pripremljeno devet mililitara pljuvačne suspenzije u kojoj je rastvoreno 0.6 g droge. Nakon pet minuta mešanja magnetnom mešalicom, dodato je 13.5 mL simuliranog želudačnog sadržaja. Posle dva sata, uzorkovano je tri mililitara rastvora za određivanje ukupnih fenola. Zatim je dodato 27 mL simuliranog pankreasnog soka i devet mililitara rastvora žučnih soli. Nakon isteka dva sata, sadržaj je centrifugiran pri 2000 obrtaja po minuti u trajanju od 30 minuta. Supernant je dekantovan i dijalizovan u celuloznom crevu dva sata naspram 500 mL fosfatnog pufera koncentracije 0.2 mol/L. Talog nakon centrifugiranja je upotrebljen za određivanje zapremine sluzi (Oomen *et al.* 2003).

Biodostupnost je određena pomoću formule:

$$BA = (1 - (PC_s / PC_{DF})) \times 100\%$$

gde je BA biodostupnost supstance, PC_s koncentracija fenola u dijalizovanom, a PC_{DF} u nedijalizovanom uzorku (Gil-Izquierdo *et al.* 2001).

Kvantitativna analiza

Određivanje ukupnih polifenolnih jedinjenja. Količina ukupnih polifenolnih jedinjenja je određena iz ekstrakta pripremljenog kuvanjem 0.75 g droge u 150 mL vode u trajanju od 30 minuta. Nakon hlađenja ekstrakta pod mlazom hladne vode, rastvor je razblažen sa 100 mL vode i filtriran. Kalibraciona kriva za određivanje ukupnih fenola u ispitivanom ekstraktu je napravljena pomoću galne kiseline kao standarda u opsegu koncentracija od 0.01 mg/mL do 0.1 mg/mL. U reakcionoj smeši je rastvoreno 0.05 mL ekstrakta, 3.95 mL vode, 0.25 mL standardnog Folin-Ciocalteu reagensa (FC reagens) i 0.75 mL rastvora natrijum-karbonata koncentracije 75 g/L. Vreme inkubacije smeše je dva sata, a apsorbanca je merena spektrofotometrijski pritalasnoj dužini od 750 nm (ISKRA) (Gorunović 1995).

Flavonoidi su određeni iz ekstrakta pripremljenog rastvaranjem 2 g droge u 40 mL etanola, u roku od tri dana nakon spravljanja. Dobijeni ekstrakt je uparen do suva i 0.5 mL rastvora masenog udela ekstrakta 10% je rastvoreno u 9.5 mL rastvora za ekstrakciju (u 140 mL metanola je dodato 50 mL vode i 10 mL koncentrovane acetatne kiseline). Zatim je 2.5 mL dobijenog rastvora preneto u normalni sud od 50 mL i dopunjeno vodom. Sadržaj flavonoida je određen spektrofotometrijski pri talasnoj dužini od 430 nm. Kalibraciona kriva za određivanje flavonoida u ispitivanom ekstraktu je napravljena pomoću rastvora kvercetina u opsegu od 0.0018 do 0.00412 mg/mL (Gorunović 1995).

Ekstrakt za određivanje tanina je pripremljen kuvanjem 0.75 g droge u 150 mL vode u trajanju od 30 minuta. Nakon hlađenja ekstrakt je razblažen sa 100 mL vode i dodato je 0.05 g kožnog praha u 5 mL ekstrakta. Nakon 60 minuta snažnog mućkanja rastvor je filtriran. Koncentracija je određena rastvaranjem 0.05 mL ekstrakta, 3.95 mL vode, 0.25 mL standardnog FC reagensa i 0.75 mL rastvora natrijum-karbonata masene koncentracije 75 g/L. Apsorbanca je merena pri talasnoj dužini od 760 nm. Ovim postupkom je dobijena koncentracija netaninskih fenola (Gorunović 1995).

Određivanje ukupnih heteropolisaharida. Količina heteropolisaharida (sluzi) u drogi je određena merenjem broja bubrenja. Broj bubrenja je veličina kojom se ocenjuje vrednost droge sa sluzima. Broj bubrenja je zapremina izražena mililitrima koju zauzme jedan gram droge posle četiri

časa bubrenja u vodi. Merenje je odrađeno natapanjem jednog grama droge u minimalnoj zapremini etanola masenog udela 97% u menzuri od 50 mL i dodavanjem 25 mL destilovane vode. Tokom prvog sata, menzura je mučkana na svakih deset minuta, a zatim ostavljena još tri sata bez mučkanja. Nakon završetka bubrenja sluzi očitana je njihova zapremina koja je srazmerna njihovom udelu u drogi (Gorunović 1995).

Rezultati i diskusija

Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize sremuša i njegove biodostupnosti prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize sekundarnih metabolita sremuša i njihova biodostupnost

Ispitivani metaboliti	Kvalitativna analiza (prisustvo)	Nedigestovani uzorak – maseni udeo (mg/g)	Biodostupnost (%)
Alkaloidi	–	–	–
Kardiotonični glikozidi	+	–	–
Sumporni glikozidi	–	–	–
Kumarinski glikozidi	+	–	–
Fenolni glikozidi	–	–	–
Ukupni fenoli	+	2.90 ± 0.02	74
Flavoni	+		
Flavonoidi	+	1.660 ± 0.001	67
Tanini (hidrolizujući)	+	0.13 ± 0.01	0
Heteropolisaharidi	+	13*	nemerljivo

* broj bubrenja – zapremina sluzi iz jedinične mase droge; ne predstavlja maseni udeo i izražava se u mL/g

Alkaloidi

Prilikom pripreme ekstrakta za kvalitativnu analizu alkaloida, zbog velike količine heteropolisaharida u drogi dobijena je emulzija bez mogućnosti brzog odvajanja slojeva. Fleke nisu zapažene. Kako alkaloidi imaju prvenstveno zaštitnu ulogu, na osnovu njihovog odsustva u sremušu može se pretpostaviti da je preživljavanje sremuša omogućeno prvenstveno alelopatičkim efektom.

Kardiotonični glikozidi

Potvrđeno je prisustvo kardiotoničnih glikozida. Ovi glikozidi deluju i pri veoma malim koncentracijama, ali nije izvršena kvantitativna analiza,

zbog potrebe za velikim količinama droge. Prisustvo kardi toničnih glikozida, kao jedne od karakteristika biljaka iz roda *Allium*, bilo je očekivano. Da bi se sre muš mogao koristiti u terapiji insuficijencije miokarda, potrebna su dodatna ispitivanja.

Sumporni glikozidi

Iako su sumporni glikozidi karakteristični za biljke iz roda *Allium*, u ispitivanom uzorku nije dokazano njihovo prisustvo, iako se nalazi rad u kojem je prisustvo potvrđeno (Gođevac *et al.* 2008). Ovaj deo istraživanja bi trebalo ponoviti kako bi se utvrdilo da li je došlo do greške, ili njihovo prisustvo zavisi od uslova u kojima biljka raste. Ukoliko bi se dokazalo da konkurentne biljke imaju uticaj na regulaciju sinteze ispitanih sekundarnih metabolita, bilo bi zanimljivo ispitati načine pomoću kojih se ostvaruje navedena regulacija. Ujedno, trebalo bi ispitati i u kojoj meri spoljašnji faktori utiču na sintezu sekundarnih metabolita. Zbog mogućeg prisustva sumpornih glikozida, prilikom njihove hidrolize oslobađa se vodonik-sulfid koji nepovoljno utiče na rast drugih biljaka.

Prisustvo fenolnih glikozida nije potvrđeno. U radovima je pronađen podatak o prisustvu flavonoidnih glikozida (Hou 2008). Postoji mogućnost da je došlo do hidrolize glikozida prilikom transporta i rukovanja drogom.

Kumarinski glikozidi

Kvalitativnom analizom konstatovani su i kumarinski glikozidi, odnosno prilikom ozračivanja ekstrakta za dokazivanje kumarinskih glikozida, dobijen je analitički signal. Kumarinski glikozidi se inače retko javljaju u biljkama, pa svaka vrsta koja ih sadrži predstavlja dobar materijal za izolovanje i karakterizaciju. Ovi glikozidi deluju na vaskularni sistem, tako što dovode do dilatacije krvnih sudova i koriste se kao anti-koagulantna sredstva. Rezultat podržava verovanje da sre muš može imati povoljan uticaj na ljudski organizam u slučaju problema vezanih za kardiovaskularni sistem.

Polifenoli

Spektrofotometrijskim merenjima utvrđena je koncentracija ukupnih polifenola i dokazanih grupa polifenola, čija koncentracija je data u tabeli 1. Zbog alolepatičnog efekta, očekivana je velika koncentracija fenola, koji predstavljaju fitotoksine kao što su ferulna, p-kumarinska i vanilinska kiselina (Đurđević *et al.* 2004). Navedene kiseline se posle odumiranja biljke rastvaraju u zemlji i na taj način inhibišu klijanje drugih biljaka. Zbog velike količine polifenola, bilo bi zanimljivo ispitati o kojim supstancama je reč, kao i uticaj spoljašnjih faktora na proizvodnju istih. Biodostupnost pokazuje resorpciju znatnog udela polifenola, što bi moglo da

potvrđi pretpostavku o antioksidativnom i antikancerogenom efektu sremuša na organizam.

Koncentracija flavonoida je određena naspram kalibracione krive standardnog rastvora kvercetina. Flavonoidi se često povezuju sa velikom količinom vitamina C, što povećava antioksidativnu aktivnost droge, kao i moguću antitumorsku aktivnost (Carotenuto *et al.* 1996). Naspram drugih biljaka iz roda *Allium*, sremuš sadži više ukupnih flavonoida. Kkonkretno, maseni udeo ukupnih flavonoida je veći kod sremuša za 0.34 mg/g u odnosu na vlašac (*Allium schoenoprasum*) (Kucekova *et al.* 2011).

Prilikom dokazivanja tanina, dokazano je prisustvo galnih tanina. Galni ili hidrolizujuć tanini su nestabilni i u prisustvu tanaze, kiselina ili baza razlažu se na monosaharide i derivate galne kiseline. Zbog toga nemaju primenu u ishrani ili medicini. *In vitro* digestijom je dokazano da tanine sremuša čine nehidrolizujuć tanini, jer se spektrofotometrijskim merenjima aposrbanca netaninskih supstanci poklapala sa aposrbancom ukupnih fenola.

Heteropolisaharidi

Količina heteropolisaharida, određena metodom broja bubrenja, iznosi 13 mL/g. Ovako velika zastupljenost heteropolisaharida je bila očekivana, jer je prilikom pravljenja etanolno-etarskog ekstrakta, dobijenina suspenzija. Nakon završetka duodenalne faze digestije, talog je sakupljen i urađena je kvantitativna analiza na sluzi. Dobijen je rezultat od 4 mL/g. Pretpostavlja se da se jedan deo sluzi resorbovao, a ostatak degradirao.

Količina resorbovanih sluzi se nije mogla odrediti, jer se za dijalizu koristi centrifugiran rastvor. Zato za sada poznatim metodama nije moguće odrediti njihovu biodostupnost. Heteropolisaharidi se u medicini koriste kao protektivni sluznica gornjeg respiratornog trakta. Preporučuje se izolovanje sluzi i određivanje vrste sluzi, kao i ispitivanje njihovog dejstva na organizam in vivo metodom.

Zaključak

Iz navedenih rezultata zaključeno je da sremuš sadži kardiotonične i kumarinske glikozide i značajnu količinu polifenolnih jedinjenja (2.90 ± 0.02 mg/g). Nije potvrđeno prisustvo sumpornih glikozida, najverovatnije zbog velikog vremenskog razmaka od ubiranja sremuša do njegove analize. Digestijom se uspešno resorbuju polifenoli (biodostupnost 74%), kao i flavonoidi (biodostupnost 67%), ali ne i galni tanini, zbog njihove nestabilnosti. Rezultati kvalitativne analize i biodostupnosti daju osnov primeni sremuša u narodnoj medicini i ishrani. Visoka koncentracija polifenolnih jedinjenja je iznenađujući rezultat pa se preporučuje dalje

istraživanje njihove zastupljenosti u biljci u zavisnosti od uslova gajenja. Zbog izrazito dobre resorpcije polifenolnih jednjenja tokom varenja, sremuš bi se mogao koristiti i za izradu fenolnih lekova, jer polifenoli sremuša imaju izvanrednu biodostupnost (74%). Na taj način bi se unosom malih količina droge unela velika količina polifenola.

Literatura

- Andreas L. 2009. *Molecular, clinical and environmental toxicology*. Basel: Springer
- Carotenuto A., De Feo V., Fattorusso E., Lanzotti V., Magno S., Cicala C. 1996. The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry*, **41**(2): 531.
- Đurđević L., Dinić A., Pavlović P., Mitrović M., Karadžić B., Tešević V. 2004. Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. *Biochemical systematics and ecology*, **32**(6), 533.
- Fraenkel G. S. 1959. The raison d'Étre of secondary plant substances. *Science*, **129**: 1466.
- Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A. 2001. *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 1035.
- Goronović M. 1995. *Praktikum iz farmakognozije (hemijsko ispitivanje droga)*. Beograd: Jugohemija
- Gođevac D., Vujišić Lj., Mojović M., Ignjatović A., Spasojević I., Vajs V. 2008. Evolution of antioxidant capacity of *Allium ursinum* volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food chemistry*, **107**(4): 1692.
- Hou W. 2008. Novel acetylated flavonoid glycosides from the leaves of *Allium ursinum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **115**: 592.
- Jelkić-Stankov M., Kapetanović V., Karljiković-Rajić K., Aleksić M., Ražić S., Uskoković S., Odović J. 2009. *Semimikro kvalitativna hemijska analiza, Praktikum za studente farmacije*. Beograd: Farmaceutski fakultet
- Khan A., Qureshi R., Gilani S., Ullah F., Nosheen A., Sahreen S., Laghari M., Laghari M., Hussain I., Murad W. 2011. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**: 6017.
- Kucekova Z., Mlcek J., Humpolicek P., Rop O., Valasek P., Saha P. 2011. Phenolic compounds from *Allium schoenoprasum*, *Tragopogon pratensis* and *Rumex acetosa* and their antiproliferative effects. *Molecules*, **16**(11): 9207.
- Oomen A. G., Rempelberg C. J. M., Bruil M. A., Dobbe C. J. G., Pereboom D. P. K. H., Sips A. J. A. M. 2003. Development of an *In Vitro* Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 281.
- Schmitt B., Schulz H., Storsberg J., Keusgen M. 2005. Chemical characterization of *Allium ursinum* L. depending on harvesting time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 7288.
- Stamp, N. 2003. Out of the quagmire of plant defense hypothesis. *The Quarterly Review of Biology*, **78**: 23.

- Tumbas T. V. 2010. Antiradikalna i antiproliferativna aktivnost ekstrakta odabranih biljaka iz familija Rosaceae i Ericaceae. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, Novi sad
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from a ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, **64**: 3.
- Woyengo T., Ramprasath V., Jones P. 2009. Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, **63**: 813.
- Zern T., Fernandez M. 2005. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *Journal of Nutrition*, **135**: 2291.

Mihajlo Filep

Qualitative and Quantitative Analysis of Secondary Metabolites of Wild Garlic (*Allium ursinum* L.) and Determination of their Bioaccessibility

The aim of this project is to determine the composition of secondary metabolites of wild garlic (*Allium ursinum* L.) and their bioaccessibility. Wild garlic is used in human diet, so it is important to know its composition. Traditionally, this plant is known for having beneficial medical properties, although they have not been completely proven. The most frequent secondary metabolites have been examined, i. e. those which are present in other species of *Allium* genus. Several studies that have been used as references have proved the anti-cancer properties of some *Allium* species (primarily *Allium sativum* and *Allium schoenoprasum*). The quality analysis showed the presence of cardio tonic and coumaric glycosides, heteropolysaccharides, flavonoids, flavones and tannins and the lack of alkaloids. The finding of the presence of coumaric glycosides was quite unexpected, because only some species of *Allium* genus contain it. A standard spectrophotometric measuring was used for establishing the total concentration of phenol (2.9 mg/g) and the determination of the number of swellings of heteropolysaccharides which are absorbed after the *in vitro* simulated digestion. The results show that in the course of digestion a significant percentage of phenols is absorbed (with the bioaccessibility of 74%) except for tannins. The presence of cardio tonic and coumaric glycosides as well as the bioaccessibility of non-tannin phenols confirms the potential effects they might have on the human body and provides foundation for working on their isolation and their use in the pharmaceutical industry.

