
LEK. SIROV.	God. XXXI	Broj 31	Str. 39 – 46	Beograd 2011.
LEK. SIROV.	Vol. XXXI	No. 31	PP. 39 – 46	Belgrade 2011.

Originalni naučni rad – Original scientific paper

UDC: 582.711.712:547.565(497.11)

**SADRŽAJ POLIFENOLNIH JEDINJENJAU PLODOVIMA DIVLJE
MALINE, KUPINE I JAGODE SA PODRUČJA BJELASICE, CRNA GORA**

**Nada Ćujić¹, Nebojša Menković¹, Katarina Šavikin¹, Slavoljub Tasić¹,
Gordana Zdunić¹, Teodora Janković¹, Miodrag Jovančević²**

¹ Institut za proučavanje lekovitog bilja „ dr Josif Pančić “, Tadeuša Košćuška 1, 11000
Beograd, Srbija

² Biotehnički fakultet, Centar za kontinentalno voćarstvo, Sandžačka bb, 84000 Bijelo polje,
Crna Gora

IZVOD

U radu je prikazan uticaj nadmorske visine na sadržaj polifenolnih jedinjenja u jagodastom voću. Jagodasto voće je poznato kao dobar izvor polifenola, koji doprinose visokoj antioksidativnoj aktivnosti. Epidemilološke studije su pokazale korelaciju između visokog unos polifenolnih jedinjenja i smanjenog rizika od kardiovaskularnih oboljenja, kao i povoljno delovanje na neke tipove kancera i neurodegenerativna oboljenja kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest. Tokom istraživanja analizirane su tri vrste šumskih plodova (malina, kupina i jagoda), sakupljenih sa različitih nadmorskih visina u planinama Bjelasice u Crnoj Gori. Određivani su sadržaji ukupnih fenola, ukupnih antocijana, cijanidina i elagne kiseline. Najveći sadržaj ukupnih fenola, ukupnih antocijana i cijanidina detektovan je u plodovima samonikle kupine, jagode i maline, koji su sakupljeni sa viših nadmorskih visina, dok je u slučaju elagne kiseline, određen veći sadržaj u plodovima koji rastu na nižim nadmorskim visinama.

Ključne reči: kupina, jagoda, malina, polifenoli, antocijani, cijanidini, elagne kiseline

UVOD

Lekovita svojstva biljaka poznata su od najranijih vremenaljudske civilizacije. Od tada pa sve do današnjih dana biljke su se upotrebljavale kao hrana, lekovi, konzervansi, u religiozne svrhe, za ukras, itd. Sve do razvoja hemije, a naročito sinteze organskih molekula u XIX veku, izvor farmakološki aktivnih supstanci bile su isključivo biljke. Poslednjih godina povećano je interesovanje za voće i povrće koje sadrži visoke koncentracije polifenola zbog njihovih potencijalnih bioloških i po zdravlje povoljnih efekata.

Ovibiološki efekti su delom uslovljeni njihovim antioksidativnim kapacitetom. Među uobičajnim voćem i povrćem u dijeti, po najvećem antioksidativnom kapacitetu se posebno ističe jagodasto voće tamno-plave ili crvene boje [1].

Jagodasto voće je poznato kao dobar izvor polifenolnih jedinjenja koja doprinose visokoj antioksidativnoj aktivnosti. Od polifenola a u najvećem procentu zastupljeni su antocijani, i to u vidu glikozida i flavonoidi od kojih su najzastupljeniji derivati kvercetina i kemferola[2,3].

Epidemiološke studije su pokazale korelaciju između visokog unosa polifenola i smanjenog rizika od kardiovaskularnih oboljenja kao i povoljno delovanje na neke tipove kancera i neurodegenerativna oboljenja kao što su Alzheimer-ova i Parkinsonova bolest [4,5].

U cilju hemijske karakterizacije plodovasamoniklog voća, cilj ovog rada je procena uticaja nadmorske visine staništa, na sadržaj ukupnih fenola, ukupnih antocijana, sadržaj cijanidina i elagne kiseline, u plodovima maline, kupine i jagode, sakupljenih na području planine Bjelasica.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

Na području planine Bjelasica, sakupljeni su uzorci plodova divlje maline (700 i 1250 m nadmorske visine), divlje kupine (1500 m) i divlje jagode (700 i 1250 m). Uzorci su brani ručno i istog dana zamrzavani na -18°C do analize.

Sadržaj ukupnih fenola:

Sadržaj ukupnih fenolaraden je metodom uz korišćenje Folin-Ciocalteu reagensa [6].

Postupak: 200 μl ekstrakta (koncentracija zavisi od aktivnosti ekstrakta) pomešati sa 1 ml 1:10 razblaženog Folin-Ciocalteu reagensa (FCR). Posle 4 minuta dodati 800 μl natrijum-karbonata (75 g/l). Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, meriti absorbancu na 765 nm. Galna kiselina (0-100 mg/l) je korišćena za izradu kalibracione krive.

Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po gramu svežeg ploda (mg GAE/g). Analize su urađene u tri ponavljanja a rezultati izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.

Određivanje ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijanaradenje po modifikovanoj metodi koju propisuje Evropska farmakopeja (Ph Eur 6.0) [7].

Postupak: Izgnječiti 50 g ploda *ex tempore*. U oko 5,00 g zdrobljenog ploda, tačno odmerenog, dodati 95 ml MeOH i mešati na magnetnoj mešalici 30 minuta. Filtrirati direktno u normalni sud od 100 ml. Isprati filter MeOH i dopuniti istim do 100 ml. Dobijeni rastvor razblažiti 50 puta sa 0,1 % V/V HCl u metanolu. Meriti apsorbancu rastvora na 528 nm. Slepa proba predstavlja metanolni rastvor 0,1 % V/V HCl.

Sadržaj antocijana u % (izražennacijanidin-3-glukozid hlorid) računa se prema formuli: $\frac{A \times 5000}{718 \times m}$

718 x m

718 = specifična apsorbancu cijanidin-3-glukozid hlorida na 528 nm

A = apsorbancu na 528 nm

m = masa droge u gramima

Analize su urađene u tri ponavljanja a rezultati izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.

Sadržaj cijanidina

Sadržaj cijanidina je rađen metodom koju su opisali Zhang i saradnici[8].

Postupak: 5 g smrznutog ploda usitniti i ekstrahovati smešom rastvarača voda:metanol (1+1 v/v) na ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 20 minuta. Rastvarač za ekstrakciju pripremiti na sledeći način: 50 ml metanola+33ml vode+17ml 37% HCl. Posle ekstrakcije rastvor profiltrirati kroz teflonski filter od 0,45µm, filtrat (3ml) prebaciti u teflonsku vijalicu i ostaviti 60 minuta na 100°C da se hidrolizuje. Posle brzog hlađenja do sobne temperature injektirati u tečni hromatograf.

Analizesu urađene u tri ponavljanja a rezultati izraženi kao srednja vrednostsa standardnom devijacijom. Za analiziranje je korišćen tečni hromatogramHewlett Packard serije 1090 sa DAD detektorom. Injekciona zapremina uzorka je 20µl. Kolona je Li Chrospher 100 Rp -18e, dimenzije 250 x 4,6 mm, veličina čestice 5µm. Mobilnu fazu A čini 10% (V/V) HCOOH u H₂O, a B MeCN. Ekstrakti su odvojeni gradijentom prema sledećoj šemi: start B 1%, 1-4minuta B 7%, 7,5 minuta B 10% , 11,5-15,5 B 14%, 18,5-22 minuta B 18%. Protok je 1.0 ml/min , a detekcija je na 290, 350 i 520 nm, a temperatura 35°C.

Sadržaj elagne kiseline

Sadržaj elagne kiseline raden je metodom koju su dali Häkkinen i sar. [9].

Postupak: 5 g usitnjenih svežih plodova pomešati sa 15 ml destilovane vode i 25 ml metanola. U tu smešu dodati još 10 ml 6 mol/l HCl. Mešavinu kuvati na vodenom kupatilu uz povratni hladnjak 20h na $85\pm 5^{\circ}\text{C}$. Nakon hlađenja ekstrakt profiltrirati. 10ml ovog rastvora do suva na vakuum uparivaču na 35°C . Suvi ostatak rastvoriti u 2 ml metanola i filtrirati kroz filter (0,45 μm) pre analize.

Identifikacija i kvantifikacija sadržaja elagne kiseline vršena je tečnom hromatografijom (HPLC) uz kalibracionu krivu. Analize su urađene u tri ponavljanja a rezultati izraženi kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom.

Analize su urađene na tečnom hromatogramu Hewlett Packard serije 1090 sa DAD detektorom serije. Injekciona zapremina uzorka je 20 μl . Kolona je Li Chrospher 100 Rp -18e, dimenzije 250 x 4,6 mm, veličine čestice 5 μm . Mobilnu fazu A čini MeCN, a B 1% (V/V) H_3PO_4 u H_2O . Ekstrakti su odvojeni gradijentom prema sledećoj šemi 0-3 minuta 95% B, 20 minuta 0% B. Protok je 1,0 ml/min, detekcija je na 255 i 350 nm, a temperatura 35°C .

REZULTATI I DISKUSIJA

Tokom istraživanja sakupljeno je i analizirano tri vrste šumskih plodova (malina, kupina i jagoda) kroz pet uzoraka, sa različitim nadmorskih visina planine Bjelasice u Crnoj Gori. Određivani su sadržaji ukupnih fenola, ukupnih antocijana, cijanidina i elagne kiseline koja je jedan od značajnih sekundarnih metabolita ispitivanih vrsta, a rezultati su prikazani u tabeli 1.

Najveći sadržaj fenola (izraženih u mg ekvivalenta galne kiseline) pokazao je plod kupine, zatim jagode koja raste na 1250 m nadmorske visine. Plod kupine je pokazao veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na plod jagode koja raste na visini oko 700 m. Plod maline koja raste na 1250 m nadmorske visine ima veći sadržaj ukupnih fenola od ploda maline koja raste na 700 m.

Najveći sadržaj ukupnih antocijana imao je plod divlje kupine, zatim maline koja raste na nadmorskoj visini od 1250 m, pa maline sa visine od 700 m. Plod jagode prikupljene sa 1250 m nadmorske visine, sadrži više antocijana u odnosu na plod jagode sa 700 m.

Rezultati određivanja cijanidina kao dominantnog antocijanskog aglikona pokazuju, da je najveći sadržaj utvrđen u svežem plodu kupine, zatim plodu malinesa 1250 m, maline sa 700 m, jagode sa 1250 m, pa jagode sa 700 m nadmorske visine.

Najveći sadržaj elagne kiseline ima plod maline prikupljen sa 1250 m, zatim kupine pa maline sa 700 m. Sledi plod jagode ubrane sa 700 m pa jagode sa

1250 m. Rezultati pokazuju da malina koja raste na većoj nadmorskoj visini sadrži više elagne kiseline, dok kod jagode to nije slučaj, jer plod jagode koja raste na nižoj nadmorskoj visini ima veći sadržaj elagne kiseline.

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola, ukupnih antocijana, cijanidina i elagne kiseline u ispitivanim uzorcima.

Table 1. The content of total phenolics, total anthocyanins, cyanidine and elagic acid in the investigated samples

Uzorci	Ukupni fenoli (mgGAE/g svežeg ploda)	Ukupni antocijani (%)	Cijanidin (mg/g svežeg ploda)	Elagna kiselina (mg/100 g svežeg ploda)
1. Kupina	2.74±0.02	0.119±0.007	0.41±0.02	216.2±10.2
2. Jagoda	2.24±0.06	0.009±0.002	0.03±0.01	114.3±7.1
3. Jagoda	2.37±0.08	0.012±0.002	0.04±0.01	111.9±8.6
4. Malina	1.39±0.04	0.024±0.004	0.14±0.02	144.5±5.9
5. Malina	1.72±0.07	0.041±0.003	0.21±0.02	222.6±12.1

Uzorak 1. kupina (1500 m); uzorak 2. jagoda (700 m); uzorak 3. jagoda (1250 m); uzorak 4. malina (700 m); uzorak 5. malina (1250 m)

Naši rezultati pokazuju uticaj nadmorske visine na sadržaj polifenolnih jedinjenja u šumskim plodovima, što je u skladu sa podacima iz literature [10,11]. Naša prethodna proučavanja uticaja nadmorske visine na sadržaj ukupnih fenola i antocijana u plodovima borovnice su pokazala, da je u uzorcima prikupljenim sa staništa iznad 1500 m nadmorske visine, određen veći sadržaj pomenutih biološko vrednih sastojaka [12]. Planinska staništa su posebno osetljiva nasunčevozračenje, posebno UV-B, zbog velike nadmorske visine. Sposobnost biljaka da sintetišu različita polifenolna jedinjenja je evolutivni odgovor na visoku izloženost UV-B zračenju. Poznato je da solarna radijacija stimuliše sintezu polifenolnih jedinjenja, koja pokazuju apsorbuju u UV-B spektru, pa služe kao UV-B filteri i štite biljku od štetnog sunčevog zračenja [13].

ZAKLJUČAK

Najveći sadržaji ukupnih fenola, antocijana i cijanidina detektovani su u plodu divlje kupine, a plodovi jagode i maline koji su sakupljeni sa viših nadmorskih visina pokazuju veći sadržaj aktivnih materija u odnosu na plodove koji rastu na nižim nadmorskim visinama, osim u slučaju određivane elagne kiseline, koje više ima u plodovima sa podneblja niže nadmorske visine.

ZAHVALNICA

Autori zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, evidencioni broj projekta 46013.

LITERATURA

1. M. A. Soobrattee, V. S Neergheen, A. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma,T. Bahorun(2005):Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, *Mut. Res*, 579, 200-213.
2. K. R. Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin,P.H. Mattila, A. M. González-Paramás,A. R. Törrönen(2004):Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species, *J. Agric. Food Chem*, 52, 4477-4486.
3. J. M. Koponen, A. M. Happonen,P. H.Mattila,A. R. Törrönen (2007): Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland, *J Agric Food Chem*, 55, 1612 -1619.
4. M. G. Hertog, H.B. Bueno-de-Mesquita, A. M. Fehily,P. M. Sweetnam, P. C. Elwood, D. Kromhout (1996): Fruit and vegetable consumption and cancer mortality in the Caerphilly Study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 5, 673-677.
5. K. J. Joshipura, F. B. Hu, J. E. Manson, M. J. Stampfer, E. B. Rimm,F. E. Speizer,G. Colditz,A. Ascherio, B. Rosner, D. Spiegelman,W. C. Willett (2001):The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease, *Ann. Intern. Med*, 134, 1106-1114.
6. S.M. Waterman(1994):Analysis of Phenolic Plant Metabolites, 16, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
7. European Pharmacopoeia 6.0 (2008): Council of Europe, 1307-1308, StrasbourgCedex, France.
8. Z. Zhang, X. Kou, K. Fugal, J. McLaughlin (2004):Comparison of HPLC Methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts, *Food Chem*. 52, 688-691.
9. S. Häkkinen, S. Kärenlampi, H. Mykkänen, M. Heinonen, R. Törrönen (2000): Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *Eur Food Res Technol* 212,75-80
10. H. Yang, C. Ding, C. Duan, J.Liu (2005): Variation of active constituents of an important Tibet folk medicine *Swertia mussoti* Franch. (Gentianaceae) between artificially cultivated and naturally distributed, *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 31-35.

11. Y. Murai, S. Takemura, K. Takeda, J. Kitijima, T. Iwashina (2009):
Altitudinal variation of UV-absorbing compounds in *Plantago asiatica*,
Biochemical Systematics and Ecology, 37, 378-384.
12. M. Jovančević, J. Balijagić, N. Menković, K. Šavikin, G. Zdunić, T. Janković,
M. Đekić-Ivanković (2011): Analysis of phenolic compounds in wild
populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) from Montenegro, *Journal of
Medicinal Plants Research*, 5, 910-914.
13. R. A. Dixon, N. L. Pavia (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism,
Plant Cell, 7, 1085-1097.

**CONTENT OF POLYPHENOLIC SUBSTANCES IN WILD
FRUITS OF RASPBERRIES, BLACKBERRIES AND STRAWBERRIES
ORIGINATED FROM BJELASICA, MONTENEGRO**

**Nada Ćujić¹, Nebojša Menković¹, Katarina Šavikin¹, Slavoljub Tasić¹,
Gordana Zdunić¹, Teodora Janković¹, Miodrag Jovančević²**

¹Institute for Medicinal Plant Research „Dr Josif Pančić“, Tadeuša Koščuška 1, 11000
Belgrade, Republic of Serbia

²Biotechnical Faculty, Center for Continental Fruit, Sandžačkabb, 84000 Bijelo Polje,
Montenegro

SUMMARY

This paper describes the effects of altitude on the content of polyphenolic compounds in the wild berry fruits. Berries are known as a good source of polyphenols, which contribute to the high antioxidant activity. Epidemiological studies have shown a correlation between a high intake of polyphenolic compounds and reduced risk of cardiovascular diseases, as well as beneficial effects on some types of cancer and neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's diseases. During the research three types of berries (raspberries, blackberries and strawberries), collected at different altitudes in the Montenegro's mountain Bjelasica, were analyzed. The contents of total phenolics, total anthocyanins, cyanidine and elagic acid were determined. The highest content of total phenolics, total anthocyanins and cyanidine was detected in fruits of wild blackberries, raspberries and strawberries, which were collected from higher elevations, while in the case of elagic acid, certain higher content of the fruits that grow at lower altitudes.

Keywords: blackberry, strawberry, raspberry, polyphenols, anthocyanins, cyanidine, elagic acid