

## KARAKTERIZACIJA VODENO-ETANOLNIH EKSTRAKTA LISTA CRNOG ORAHA (*JUGLANS NIGRA* L.)

Katarina Rajković<sup>1</sup>, Marijana Vasić<sup>2</sup>, Valentina Simić<sup>3</sup>, Nikolina Radović<sup>4</sup>,  
Brankica Milovanović<sup>5</sup>, Brankica Đokić<sup>6</sup>

### Apstrakt

U ovom radu pripremljeni su ekstrakti lista crnog oraha ultrazvučnom ekstrakcijom korišćenjem vodeno-etanolnih rastvarača različitih koncentracija (0 – 96% (v/v)). Ukupan ekstrakcioni prinos kretao se u opsegu od 0,019 do 0,034 mg cm<sup>-3</sup>. Sadržaj ukupnih polifenola kretao se u opsegu od 0,001 do 0,005 mgGAE cm<sup>-3</sup>. Najveća vrednost ekstrakcionog prinosa i sadržaja ukupnih polifenola bila je 0,034 mg cm<sup>-3</sup> odnosno 0,005 mg GAE cm<sup>-3</sup> u 50% vodeno-etanolnom ekstraktu. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola pokazalo je da je list crnog oraha bogat izvor polifenolnih jedinjenja i može se koristiti kao prirodni izvor antioksidanata.

*Ključne reči: crni orah, ekstrakcija, polifenoli, spektrofotometrija, antioksidans*

### Uvod

Crni orahili istočno američki orah (*Juglans nigra* L.) je vrsta oraha iz porodice *Juglandaceae*. Crni orah je poreklom iz istočnog dela Amerike gde se i danas često uzgaja. Plodovi crnog oraha nisu jestivi. Crni orah se često koristi u

---

<sup>1</sup> Katarina Rajković, dr, Vanredni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet „Bijeljina“, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel: +38164163 3299, E-mail: katar1970@gmail.com

<sup>2</sup> Marijana Vasić, dr, Profesor strukovnih studija, Visoka tehničko - tehnološka škola strukovnih studija, Kruševac, Tel: +381 641550304, E-mail: vasicmarijana72@gmail.com

<sup>3</sup> Valentina Simić, dr, Docent, Univerzitet Union-Nikola Tesla, Beograd, Fakultet primenjenih nauka, Obrenovićeveva 46, Niš, Srbija, Tel: +381698014251, E-mail: valentinasimic70@yahoo.com

<sup>4</sup> Nikolina Radović, master farmacije, Farmaceutski fakultet, Univerzitet „Bijeljina“, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel: +387 65002249, E-mail: nikolinar@gmail.com

<sup>5</sup> Brankica Milovanović, Msc, asistent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet „Bijeljina“, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel: +387 65871856, E-mail: milovanovicbn89@yahoo.com

<sup>6</sup> Brankica Đokić, Msc, asistent, Farmaceutski fakultet, Univerzitet „Bijeljina“, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Bosna i Hercegovina, Tel: +387 66696692E-mail: brankica.djokic@hotmail.com

industriji, međutim pored svoje ekonomske vrednosti, crni orah se koristi i u narodnoj medicini (Sorokopudov et al., 2015).

Postoje studije koje pokazuju protivupalno, antimikrobno, antioksidativno i antibakterijsko dejstvo preparata crnog oraha kao i njegovu sposobnost da smanjuje brzinu rasta tumora (Jarić et al., 2018; Amarowicz et al., 2008; Bhargava et al., 1968; Alhassan et al., 2010). Preparati crnog oraha su izrađeni od standardizovanih ekstrakata, uglavnom od njegovog mladog ploda.

Polifenolna jedinjenja su važni parametri u oceni kvaliteta brojnih prirodnih proizvoda i odgovorni su za povoljan zdravstveni efekat ovih proizvoda (Castro-Lopez et al., 2017). Polifenolni profili kore, ploda, lišća i ljuske crnog oraha karakterišu se različitim vrstama ovih jedinjenja: juglon,  $\alpha$ -hidrojuglon-4-glukozid, miricetin, miricitrin, sakuranetin, sakuranin, neosakuranin, o-difenoli (Rorabaugh et al., 2011; Gupta et al., 1972; Dehon et al., 2001).

Polifenolna jedinjenja iz crnog oraha privlače veliku pažnju zbog njihove potencijalne antioksidativne aktivnosti (Shi et al., 2017; Nour et al., 2016). Utvrđeno je da mnogi faktori, poput koncentracije rastvarača, temperature i vremena ekstrakcije, tehnika ekstrakcije utiču na efikasnost ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz listova crnog oraha (Shi et al., 2017; Nour et al., 2016). Pored klasičnih tehnika ekstrakcije (maceracija, digestija, perkolacija, ekstrakcija superkritičnim fluidima), sve više se koriste ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ili mikrotalasima za ekstrakciju polifenola iz različite vrste oraha (Nour et al., 2016; Vieira et al., 2017). Ultrazvučna ekstrakcija nudi niz prednosti poput bolje efikasnosti, kraćeg vremena i niže temperature ekstrakcije (Nour et al., 2016; Milić et al., Cosmulescu et al., 2011; Cosmulescu et al., 2014; Lou et al., 2017). Primenom ultrazvuka sa frekvencijama u opsegu od 20 do 2000 kHz, povećava se propustljivost ćelijskih zidova čime se omogućuje brža i efikasnija difuzija bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala u rastvarač.

S obzirom na pozitivno dejstvo na zdravlje ljudi prirodnih polifenola, otuda i veliko interesovanje za njihovo proučavanje kao i ispitivanje njihovih novih potencijalnih izvora. Shodno tome predmet ovog istraživanja je karakterizacija ekstrakata lista crnog oraha. Ciljevi istraživanja bili su: I) priprema vodeno-etanolnih ekstrakta od lista crnog oraha ultrazvučnom ekstrakcijom; II) određivanje ukupnog ekstrakcionog prinosa; III) spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola u dobijenim ekstraktima.

### **Eksperimentalni deo**

#### *Uzorak lista crnog oraha*

Listovi crnog oraha (*Juglans nigra* L.) prikupljeni su tokom leta na lokalitetu Aleksinac, u jugoistočnom delu Srbije. Listovi su osušeni i samleveni neposredno pre ekstrakcije. Biljne čestice imale su prosečnu veličinu oko 0,75 mm.

## Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija izvršena je pomoću ultrazvučne kade (Sonic, Niš, Srbija) Temperatura u ultrazvučnoj kadi je održavana konstantnom pomoću termostata. U ultrazvučnoj kadi nalazio se erlenmejer sa samlevenim listovima crnog oraha pomešanim sa rastvaračem. Urađeno je 8 eksperimenata sa različitim vodenometanolnim rastvaračima: 0, 50, 70 i 96% (v/v) sa odnosima rastvarača i biljnog materijala 5 kg kg<sup>-1</sup>. Ultrazvučna ekstrakcija trajala je 80 min. na 40 °C. Nakon 80 min., suspenzija biljnih čestica i rastvarača ohlađena je do sobne temperature, zatim filtrirana pod vakuumom. U dobijenim ekstraktima određena je količina ukupnog ekstrakcionog prinosa (mg cm<sup>-3</sup>)

### Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Za određivanje ukupnog sadržaja polifenola primenjena je spektrofotometrijska metoda sa Folin Ciocalteu reagensom (*Simić et al., 2016*). Napravljena je smeša etanolnog rastvora analiziranih ekstrakata (20 x 10<sup>-6</sup> dm<sup>-3</sup>), Folin Ciocalteu reagensa (1 x 10<sup>-3</sup> dm<sup>-3</sup>), vodenog rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.8 x 10<sup>-3</sup> dm<sup>-3</sup>, 7,5 %) i 10 x 10<sup>-3</sup> dm<sup>-3</sup> destilovane vode. Smeše su inkubirane na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Nakon inkubacije od 30 minuta, absorbanca reakcionih smeša merena je na 765 nm na spektrofotometru.

Pravljenjem serija standardnih rastvora galne kiseline i snimanjem njihovih absorbanci, konstruisana je kalibraciona kriva sa jednačinom prave:

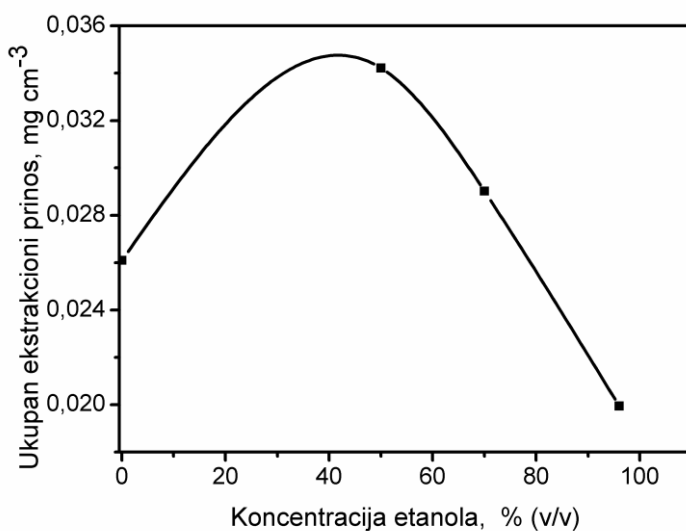
$$Absorbanca_{762nm} = 0,493 \cdot C_{GAE} + 0,064 \quad (1)$$

gde je  $C_{galne\ kiseline}$  koncentracija galne kiseline izražena u mgGAE cm<sup>-3</sup>. Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja izražen je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg galne kiseline u 1 cm<sup>-3</sup> ekstrakta (mg GAE cm<sup>-3</sup>).

### Rezultati i diskusija

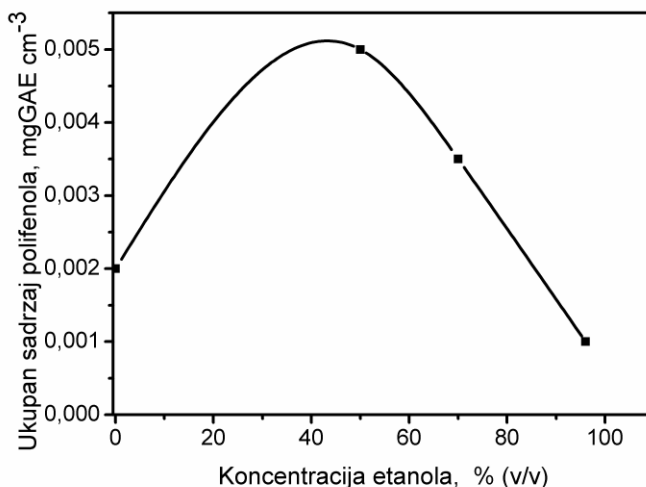
Ultrazvučnom ekstrakcijom dobijeni su ekstrakti lista crnog oraha primenom različitih vodenometanolnih rastvarača. U vodenometanolnim ekstraktima od lista crnog oraha određen je ukupan ekstrakcioni prinos. Ukupan ekstrakcioni prinos u ekstraktima kretao se u opsegu od 0,019 do 0,034 mg cm<sup>-3</sup>. Na **slici 1** prikazana je zavisnost ukupnog ekstrakcionog prinosa od koncentracije etanola u rastvaraču korišćenom za ekstrakciju. Najveći ekstrakcioni prinos dobijen je primenom 50% (v/v) vodenometanolnog rastvarača.

**Slika 1.** Zavisnost ukupnog ekstrakcionog prinosa od koncentracije etanola u rastvaraču.



U vodeno-etanolnim ekstraktima od lista crnog oraha, dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom, određen je i ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja. Za određivanje ukupnog sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima lista crnog oraha korišćena je spektrofotometrijska metoda po Folin-Ciocalteu. Spektrofotometrijska metoda po Folin-Ciocalteu se zasniva na reakciji polifenolnih jedinjenja sa Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Metoda je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW<sub>11</sub>O<sub>40</sub>)<sup>4-</sup>. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima od listova crnog oraha kretao se u opsegu od 0,001 do 0,005 mgGAE cm<sup>-3</sup>. Na **slici 2** prikazana je zavisnost ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja od koncentracije etanola u rastvaraču. Najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja dobijen je primenom 50% (v/v) vodeno-etanolnog rastvarača.

**Slika 2.** Zavisnost sadržaja ukupnih polifenola od koncentracije etanola u rastvaraču.



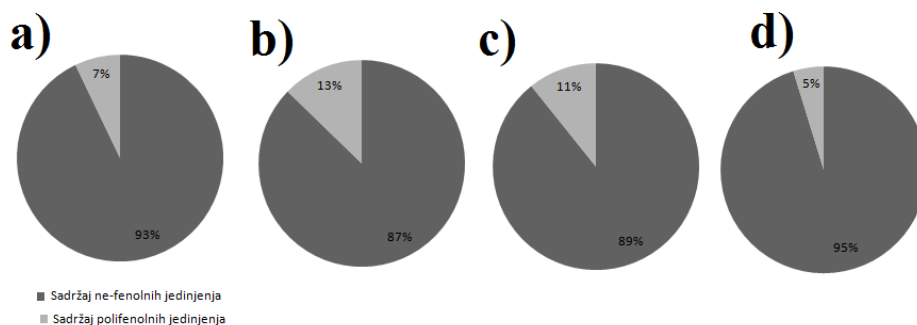
Rezultati ukupnog ekstrakcionog prinosa i sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima, dobijenim različitim vodenno-etanolnim rastvaračima prikazani na slikama 1 i 2, pokazuju da je njihov prinos veći pri većoj koncentraciji etanola. Dobijeni dijagrami pokazuje značajan uticaj koncentracije etanola na ukupan prinos i prinos ukupnih polifenola. Među različitim parametrima ekstrakcije, koncentracija etanola je već identifikovana kao značajan parametar koji utiče na ekstrakcioni prinos polifenola (*Kostić et al., 2013; Rajković et al., 2017*).

Vrsta i polarnost ekstrakcionog rastvarača značajni su parametri koji utiču na izolovanje ukupnog ekstrakta i ukupnih polifenola iz biljnog materijala (*Cosmulescu et al., 2011; Simić et al., 2016*). Prinos ukupnog ekstrakta i polifenola se povećao sa povećanjem koncentracije etanola u ekstrakcionom rastvaraču u opsegu od 0 do 50% etanola (slike 1 i 2). Povećanje ovih prinosa u ovom opsegu koncentracije etanola je posledica ubrzanog oštećenja ćelijskih membrana biljnog materijala. Međutim, pri vrednostima etanola većim od 50% ekstrakcioni prinos i prinos ukupnih polifenola se smanjuje (slike 1 i 2). Opadanje prinosa ukupnih polifenola pri većim koncentracijama etanola, nastaje zbog činjenice da se, nakon određene koncentracije etanola, menja polaritet rastvarača, čime se nečistoće ekstrahuju bržim tempom i otežava se difuzija supstanci iz biljnog materijala u rastvarač (*Yang et al., 2009*).

Najveća vrednost ekstrakcionog prinosa i sadržaja ukupnih polifenola bila je 0,034 mg cm<sup>-3</sup> odnosno 0,005 mg GAE cm<sup>-3</sup> u ekstraktu dobijenom 50% vodenno-etanolnim rastvaračem (slika 1 i 2). Na slici 3 prikazan je procentni sadržaj ukupnih polifenolnih i ne-fenolnih jedinjenja ekstrahovanih vodenno-etanolnim rastvaračima. Najveći procenta polifenolnih jedinjenja (13%) u odnosu na ne-fenolna jedinjenja (87%) je ekstrahovan 50% vodenno-etanolnim rastvaračem.

Rezultati ovog istraživanja, kao i prethodna istraživanja, ističu značaj smeše vode i etanola (50-67%) kao pogodnog rastvarača za ekstrakciju polifenola iz listova oraha primenom različitih tehnika ekstrakcije (Nour et al., 2016; Vieira et al., 2017).

**Slika 3.** Procentni sadržaj ukupnih polifenolnih i ne-fenolnih jedinjenja ekstrahovanih vodeno-etanolnim rastvaračima: a) 0% (vodeni ekstrakt); b) 50%; c) 70%; d) 96% (v/v).



### Zaključak

Fitohemijaska analiza dobijenih vodeno-etanolnih ekstrakata lista crnog oraha uključivala je kvantitativnu analizu ukupnog ekstrakcionog prinosa i sadržaja ukupnih polifenola. Najveća vrednost ekstrakcionog prinosa i sadržaja ukupnih polifenola bila je  $0,034 \text{ mg cm}^{-3}$ , odnosno  $0,005 \text{ mg GAE cm}^{-3}$  u ekstraktu dobijenom 50% vodeno-etanolnim rastvaračem. Takođe je najveći procenat polifenolnih jedinjenja (13%) u odnosu na ne-fenolna jedinjenja (87%) bio ekstrahovan 50% (v/v) etanolom. Mnogim hemijskim testovima utvrđeno je da razlike u antioksidativnoj efikasnosti ekstrakta zavise od sadržaja polifenola u njima, odnosno što je veća količina ukupnih polifenola, jači je i njihov antioksidativni efekat. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je list crnog oraha bogat izvor polifenolnih supstanci i može biti korišćen kao prirodni izvor antioksidanata.

### Literatura

1. Sorokopudov, V. N., Nguyen, T.C., Shlapakova, S. N., T. B. T. To, I. S. J. (2015): *Theoretical & Applied Science*, 23-49, (<http://dx.doi.org/10.15863/TAS.2015.03.23.10>)
2. Jarić, S., Kostić, O., Mataruga, Z., Pavlović, D., Pavlović, M., Mitrović, M., Pavlović, P., J. (2018): *Ethnopharmacol*, 211-311, (<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.018>)
3. Amarowicz, R., Dykes, G. A., Pegg, R. B. (2008): *Fitoterapia*, 79 217, (<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.019>)
4. Bhargava, U. C., Westfall, B. A., Pharm, J. (1968): 1674, *SCI-US*, 57, (<https://doi.org/10.1002/jps.2600571009>)

5. Alhassan, M., Mabrouk, R., Idris, E., Salawu, A., Oyerinde, Z., Bauchi, J. (2010): *Mens Health* 7, 297, (<https://doi.org/10.1016/j.jomh.2010.09.051>)
6. Castro-Lopez, C., Ventura-Sobrevilla, J. M., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., Martínez-Avila, G. C. G. (2017): *Food Chem.* 237, 1139, (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.032>)
7. Rorabaugh, J. M., Singh, A. P., Sherrell, I. M. Freeman, M. R., Vorsa, N., Fitschen, P., Malone, C., Maher, M. A., Wilson, T. (2011): *Food Nutri. Sci.* 2,193, (<https://doi.org/10.4236/fns.2011.23026>)
8. Gupta, S. R., Ravindranath, B., Seshadri, T. R. (1972): *Phytochemistry* 11, 2634([https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88569-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88569-6))
9. Dehon, L., Mondolot, L., Durand, M., Chalies, C., Andary, C., Macheix, J. J. (2001): *Plant Physiol. Biochem.* 39, 473, ([https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01260-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01260-8))
10. Shi, B., Zhang, W., Li, X., Pan, X. (2017): *Int. J. Food Prop.* 20, 2635, (<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1381706>)
11. Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S. (2016): *Pharm. Biol.* 54, 2176, (<https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150303>)
12. Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, Ferreira, I. C. F. R. (2017): *Ind. Crops Prod.* 107, 341, (<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.012>)
13. Milić, P. S., Rajković, K. M., Stamenković, O. S., Veljković, V. B. (2013): *Ultrason. Sonochem.* 20, 525, (<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.017>)
14. Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G., Baci, A. (2011): *Not Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 2011, 39, 237, (<https://doi.org/10.15835/nbha3915728>)
15. Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., (2014): *Pharm. Biol.* 52, 575, (<https://doi.org/10.3109/13880209.2013.853813>)
16. Luo, Y., Wu, W., Chen, D., Lin, Y., Ma, Y., Chen, C., S. Zhao, S. (2017): *Pharm. Biol.* 55, 1999, (<https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1347189>)
17. Simić, V. M., Rajković, K. M., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L., Karabegović, I. T. (2016): *Sep. Purif. Technol.* 160, 89, (<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.019>)
18. Kostić, M. D., Joković, N. M., Stamenković, O. S., Rajković, K. M., Milić, P. S., Veljković, V. B. (2013): *Ind. Crops Prod.* 48, 133, (<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.028>)

19. Rajković, K. M., Jeremić, S., Milić, P. S., Kostić, M., Arsić-Arsenijević, V., Gavrilović, M., Krstić, B. (2017): *Period. Polytech. Chem. Eng.* 61, 200, (<https://doi.org/10.3311/PPch.9580>)
20. Yang, L., Jiang, J. G., Li, W. F., Chen, J., Wang, D.Y., Zhu, L. J. (2009): *Sep. Sci.* 32, 1437, (<https://doi.org/10.1002/jssc.200800744>)

# CHARACTERIZATION OF WATER-ETHANOL EXTRACTS OF BLACK WALNUT LEAF (*JUGLANS NIGRA* L.)

Katarina Rajković<sup>1</sup>, Marijana Vasić<sup>2</sup>, Valentina Simić<sup>3</sup>, Nikolina Radović<sup>4</sup>,  
Brankica Milovanović<sup>5</sup>, Brankica Đokić<sup>6</sup>

## Abstract

*In this paper, black walnut leaf extracts were prepared by ultrasonic extraction using water-ethanol solvents of different concentrations (0 - 96% (v / v)). The total extraction yield ranged from 0.019 to 0.034 mg cm<sup>-3</sup>. The content of total polyphenols ranged from 0.001 to 0.005 mgGAE cm<sup>-3</sup>. The highest value of extraction yield and total polyphenol content was 0.034 mg cm<sup>-3</sup> and 0.005 mg GAE cm<sup>-3</sup> in 50% water-ethanol extract. Determination of total polyphenol content has shown that black walnut leaf is a rich source of polyphenolic compounds and can be used as a natural source of antioxidants.*

*Key words: black walnut, extraction, polyphenols, spectrophotometry, antioxidant*

---

<sup>1</sup> Katarina Rajković, PhD, Associate Professor, Faculty of Pharmacy, Bijeljina University, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Phone: +38164163 3299, E-mail: katar1970@gmail.com

<sup>2</sup> Marijana Vasić, PhD, Professor of Professional Studies, College of Technical and Technological Studies, Kruševac, Tel: +381 641550304, E-mail: vasicmarijana72@gmail.com

<sup>3</sup> Valentina Simić, PhD, Assistant Professor, Union-Nikola Tesla University, Belgrade, Faculty of Applied Sciences, Obrenovićeveva 46, Niš, Serbia, Tel: +381698014251, E-mail: valentinasimic70@yahoo.com

<sup>4</sup> Nikolina Radovic, Master of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Bijeljina, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Tel: +387 65002249, E-mail: nikolinar@gmail.com

<sup>5</sup> Brankica Milovanovic, MSc, Assistant, Faculty of Pharmacy, University of Bijeljina, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Phone: +387 65871856, E-mail: milovanovicbn89@yahoo.com

<sup>6</sup> Brankica Djokic, MSc, Assistant, Faculty of Pharmacy, University of Bijeljina, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Bosnia and Herzegovina, Tel: +387 66696692, E-mail: brankica.djokic@hotmail.com