

ODREĐIVANJE UKUPNIH POLIFENOLA U PLODU CRNOG ORAHA (*JUGLANS NIGRA L.*)

Katarina Rajković¹, Marijana Stojanović², Brankica Đokić³

Apstrakt

Cilj ovog rada bio je određivanje ukupnog ekstrakta i sadržaja ukupnih polifenola u petroletarskim i etanolnim ekstraktima od zelene ljuske i ploda crnog oraha. Petroletarski ekstrakti dobijeni su ultrazvučnom ekstrakcijom, dok su etanolni ekstrakti dobijeni refluks ekstrakcijom. Prinos ukupnog ekstrakta bio je u opsegu od 1,36 do 1,72%. U petroletarskim ekstraktima nije detektovano prisustvo polifenola. Sadržaj ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima zelene ljuske ploda crnog oraha bio je u opsegu od 2,46 do 2,21 mgHK/ml. Određivanje ukupnog sadržaja polifenola pokazuje da je plod crnog oraha bogat izvor polifenolnih jedinjenja i može se koristiti kao prirodni izvor antioksidanata.

Ključne reči: crni orah, ekstrakt, antioksidans.

Uvod

Orah pripada familiji Juglandaceae, a rodu *Juglans L.* Rod *Juglans L.* obuhvata sedam vrsta oraha i to: domaći orah (*Juglans regia L.*)- najrasprostranjenija vrsta oraha; crni ili američki orah (*Juglans nigra L.*) i putar orah (*Juglans cinerea L.*) poreklom su iz Amerike; japanski orah (*Juglans sieboldiana Maxim.*) poreklom je iz Japana, mandžurijski orah (*Juglans mandshurica Maxim.*) gaji se u Moskvi i Lenjingradu; kalifornijski orah (*Juglans Californica Watson*) i *Juglans rupestris Eugelnaian* koji su poreklom iz jugozapadnog dela Severne Amerike (Korać i sar., 1998; Stančević i Bugarčić, 2001).

Crni orah ili 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 gaji i najbolje raste na dubokim, plodnim, dobro dreniranim, gotovo neutralnim zemljištima (Sorokopudov i sar., 2015). Crni

¹ Katarina Rajković, PhD., vanredni profesor, Univerzitet "Bijeljina" Farmaceutski fakultet, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina, E-mail: katar1970@yahoo.com

² Marijana Stojanović, MSc, Univerzitet "Bijeljina" Farmaceutski fakultet, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

³ Brankica Đokić, MSc, Univerzitet "Bijeljina" Farmaceutski fakultet, Pavlovića put bb, 76300 Bijeljina, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

orah (*Juglans nigra L.*) je jednodomno listopadno drvo visine do 50m. Krošnja je jajasta do okrugla. Listovi su aromatični i perasto raspoređeni. Cvetovi su jednopolni, muški u pazušnim resama, a ženski dva do pet na vrhu ovogodišnjih izdanaka. Plod je lažna koštunica (orah) okružena mesnatim perigonom. Plodovi crnog oraha nisu jestivi. Crni orah se često koristi u industriji, međutim, pored svoje ekonomske vrednosti, crni orah se koristi i u narodnoj medicini (Sorokopudov i sar., 2015).

Mnoge komponente crnog oraha pokazuju antioksidativni potencijal, uključujući stablo, list, ljusku, plod i koru. Za razliku od jezgra, ljuske oraha retko se komercijalno koriste i često odbacuju. Zbog visokog sadržaja fenolnih jedinjenja, ljuske obećavaju antioksidativni potencijal i mogućnost valorizacije. Zato je predmet ovog istraživanja bio određivanje ukupnog ekstrakta i sadržaja ukupnih polifenola zelene ljuske i ploda crnog oraha u petroletarskim i etanolnim ekstraktima.

Eksperimentalni deo

Uzorak ploda crnog oraha

Plod crnog oraha sa zelenom ljuskom (*Juglans nigra L.*) prikupljeni su tokom jeseni na lokalitetu Aleksinac (geografske koordinate 43° 32' 11"N/, 21° 42' 11"E), u jugoistočnom delu Srbije. Zelena ljuska ploda i orašasti plodovi su osušeni i samleveni neposredno pre ekstrakcije. Samlevene čestice imale su prosečnu veličinu oko 0,75 mm.

Petroletarski ekstrakti

Ultrazvučna ekstrakcija izvršena je pomoću ultrazvučne kade (*Sonic*, Niš, Srbija). Temperatura u ultrazvučnoj kadi održavana je konstantnom pomoću termostata. U ultrazvučnoj kadi nalazio se erlenmejer sa samlevenim uzorcima crnog oraha pomešanim sa petrolterom u odnosu 1:1.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom trajala je 80 min na 40 °C. Nakon 80 min, suspenzija biljnih čestica i rastvarača ohlađena je do sobne temperature, zatim filtrirana pod vakuumom da bi se odvojio tečni ekstrakt od čvrstog ostatka.

Etanolni ekstrakti

Ultrazvučna ekstrakcija izvršena je pomoću refluks aparature. U ekstrakcionom balonu samleveni su uzorci crnog oraha pomešanim sa 70% etanolom u odnosu 1:4. Ekstrakcija je izvršena na temperaturi ključanja rastvarača u toku 4h.

Nakon 4h, suspenzija biljnih čestica i rastvarača je ohlađena do sobne temperature, zatim filtrirana pod vakuumom da bi se odvojio tečni ekstrakt od čvrstog ostatka. Na slici 8. prikazani su etanolni ekstrakti zelene ljuske i ploda crnog oraha.

Određivanje ukupnog ekstrakta

Petroletarski i alkoholni ekstrakti upareni su pod vakuumom dok nije dobijen polučvrst ostatak, koji je zatim sušen do konstantne mase na 60°C. Suvi ostatak predstavlja ukupan ekstrakt (rezinoid).

U prethodno osušen i izmeren metalni sud sa staklenim štapićem i 10g do 15g izarenog peska, izmereno je 2ml ekstrakta sa tačnošću od 0,001g. Ekstrakt je sušen dva časa u sušnici na temperaturi od 60°C. Posle toga, sud se poklopi, izvadi iz sušnice, ohladi u eksikatoru i izmeri. On se ponovo unosi u sušnicu i suši jedan čas, a zatim se na isti način izvadi, ohladi u eksikatoru i izmeri. Sušenje se ponavlja, dok se razlika rezultata dva uzastopna merenja ne menja.

Količina ukupnog ekstrakta u procentima (m) izračunava se prema sledećoj jednačini:

$$m(\%) = 100 \times \frac{m_1}{m_2}$$

gde je m_1 ostatak posle sušenja u gramima, m_2 odmerena količina ekstrakta u gramima.

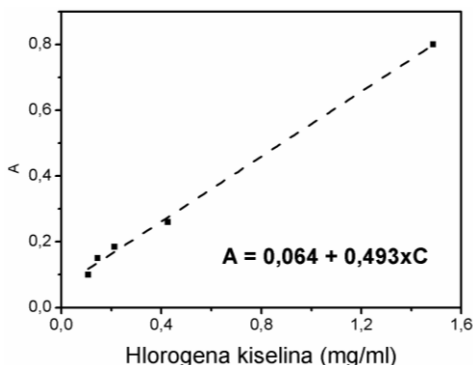
Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Za kolorimetrijsko određivanje ukupnog sadržaja polifenola primenjena je metoda sa Folin Ciocalteu reagensom (Simić i sar., 2016).

Kalibraciona kriva za određivanje polifenola

Napravljene su smeše serije standardnih rastvora hlorogene kiseline, Folin Ciocalteu reagensa ($1 \times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$) i vodenog rastvora Na_2CO_3 ($0.8 \times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$, 7,5 %). U smešama standardnih rastvora izmerena je absorbanca na kolorimetru, koristeći žuti filter, radi konstruisanja kalibracione krive.

Slika 1. Kalibraciona kriva standardnih rastvora hlorogene kiseline.



Izvor: Autori

Na osnovu konstruisane kalibracione krive (slika 1), dobijena je jednačina prave koja povezuje izmerenu absorbanciju i koncentraciju hlorogene kiseline u standardnim rastvorima:

$$Absorbanca = 0,493 \cdot C_{\text{hlor .kis}} + 0,064$$

gde je $C_{\text{galne kiseline}}$ koncentracija galne kiseline izražena u mg hlorogene kiseline u 1 ml.

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima

Napravljena je smeša analiziranih ekstrakata ($20 \times 10^{-6} \text{ dm}^{-3}$), Folin Ciocalteu reagensa ($1 \times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$), vodenog rastvora Na_2CO_3 ($0.8 \times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$, 7,5 %) i $10 \times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$ destilovane vode. Smeše su inkubirane na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Nakon inkubacije od 30 minuta, absorbanca reakcionih smeša merena je na kolorimetru koristeći žuti filter. Sva merenja ponovljena su paralelno po dva puta.

Rezultati i diskusija

Ekstrakti od ljuske i ploda crnog oraha dobijeni su primenom različitih tehnika ekstrakcije i različitih rastvarača. Petroletarski ekstrakti dobijeni su ultrazvučnom ekstrakcijom pri odnosu biljnog materijala i rastvarača u odnosu 1:1 (tabela 1). Etanolni ekstrakti dobijeni su refluks ekstrakcijom pri odnosu biljnog materijala i rastvarača u odnosu 1:4 (tabela 1).

Tabela 1. Ekstrakti crnog oraha i uslovi ekstrakcije.

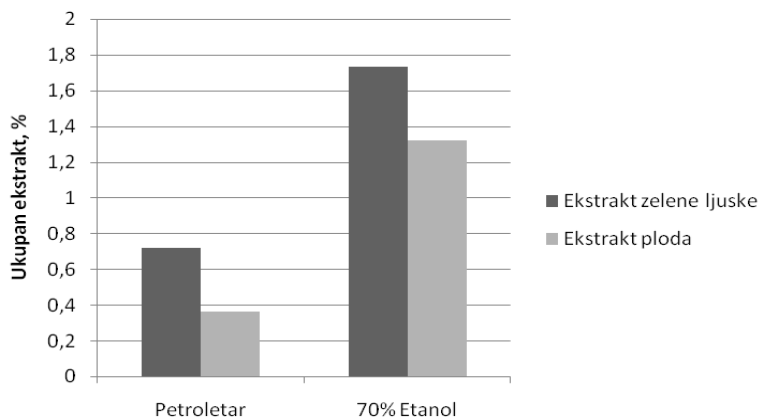
Ekstrakt	Biljni materijal	Rastvarač	Odnos biljnog materijala rastvarača	Tehnika ekstrakcije
Zelene ljuske	Zelene ljuske	Petroletar	1:1	Ultrazvučna
		70% etanola	1:4	Refluks
Plod	Orašasti deo ploda	Petroletar	1:1	Ultrazvučna
		70% etanola	1:4	Refluks

Izvor: Autori

Rezultati određivanja ukupnog ekstrakta u ekstraktima crnog oraha prikazani su na slici 2. Dobijeni rezultati pokazuju da etanolni ekstrakti dobijeni refluks ekstrakcijom imaju znatno veći ukupan ekstrakt od petroletarskih ekstrakata dobijenih ultrazvučno ekstrakcijom. To znači da se veći prinos ekstrakcije postiže etanolnim rastvaračem nego petroletrom. Razlika u ukupnoj količini ekstrakta posledica je različite rastvorljivosti ekstrahovanih materija u različitim rastvaračima. Vrsta i polarnost ekstrakcionog rastvarača značajni su parametri koji utiču na izolovanje

ukupnog ekstrakta iz biljnog materijala (Simić i sar., 2016; Cosmulescu i sar., 2011).

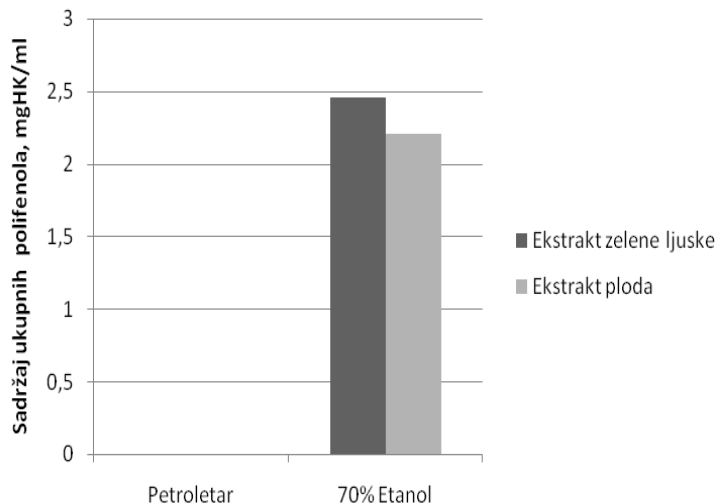
Slika 2. Ukupni ekstrakt u ekstraktima ljuske i ploda crnog oraha.



Izvor: Autori

Biljni materijali sadraže znatno više materija koje se rastvaraju u polarnim rastvaračima nego u nepolarnim rastvaračima. Zato se polarnim rastvaračem, kao što je etanol, ekstrahuje znatno više ekstrakata nego nepolarnim rastvaračem, kao što je petroleter. Takođe, naši rezultati pokazuju da su oba ekstrakta zelene ljuske crnog oraha bogatiji ukupnim ekstraktom u odnosu na ekstrakte ploda.

Slika 3. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima ljuske i ploda crnog oraha.



Izvor: Autori

Rezultati određivanja sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktima crnog oraha prikazani su na slici 3. Dobijeni rezultati pokazuju da petroleterarski ekstrakti, dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom, ne sadrže polifenolna jedinjenja.

Polifenolna jedinjenja rastvaraju se u polarnim rastvaračima i zato ih nije moguće ekstrahovati nepolarnim rastvaračem kao što je petroletar. Takođe, dobijeni dijagram (slika 3) pokazuje da ekstrakt zelene ljuske sadrži više ukupnih polifenola u odnosu na ekstrakt ploda. Dobijeni veći prinos polifenola u ekstraktu zelene ljuske, posledica je većeg sadržaja fenolnih jedinjenja u zelenoj ljusci ploda nego u samom plodu.

Rezultati ovog istraživanja, kao i predhodna istraživanja, ističu značaj smeše vode i etanola (50-70%) kao pogodnog rastvarača za ekstrakciju polifenola iz biljnog materijala (Nour i sar., 2016; Vieira i sar., 2017). Prinos ukupnih polifenola iz ljuske i ploda crnog oraha pokazuje da je plod sa zelenom ljuskom crnog oraha bogat izvor polifenolnih supstanci koje predstavljaju jedinjenja koja imaju antioksidativni potencijal. U ovom radu pokazano je da su plod i ljuska crnog oraha bogati izvori polifenolnih jedinjenja i mogu se koristiti kao prirodni izvor antioksidanata.

Polifenolna jedinjenja predstavljaju najveću grupu supstanci koje se nalaze u biljnim ekstraktima. Biološka aktivnost polifenola izražena je antioksidativnim svojstvima koja su povezana sa njihovom sposobnošću da eliminišu slobodne radikale.

Zaključak

Ekstrakti ljuske i ploda crnog oraha dobijeni su različitim tehnikama ekstrakcije i primenom različitih rastvarača. U pripremljenim ekstraktima od zelene ljuske i ploda crnog oraha određen je ukupan ekstrakt i ukupan sadržaj polifenola.

Količina ukupnog ekstrakta određena je metodom sušenja i prinos ekstrakta bio je u opsegu od 1,36 do 1,72%. Količina ukupnih polifenola u ekstraktima crnog oraha određena je metodom Folin-Ciocalteuovim fenolnim reagensom. Sadržaj ukupnih polifenola u etanolnom ekstraktu zelene ljuske iznosio je 2,46 mgHK/ml, a u etanolnom ekstraktu ploda iznosio je 2,21 mgHK/ml.

Ovim eksperimentom utvrđeno je da 70% vol. ekstrakt zelene ljuske crnog oraha sadrži više ukupnih polifenola u odnosu na ostale ekstrakte. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima značajno se razlikuje zavisno od vrste rastvarača. U petroletarskim ekstraktima nije pronađeno prisustvo polifenola zbog njihove nerastorljivost u nepolarni rastvaračima.

Literatura

1. Korać, M., Cerović, S., Gološin, Branislava (1998): Orah 8 216
2. Stančević, A., Bugarčić, V. (2001): Orah, leska i badem 6 54

3. Sorokopudov, V. N., Nguyen, T.C., Shlapakova, S. N., T. B. T. To, I. S. (2015): *J. Theoretical & Applied Science* 23 49 (<http://dx.doi.org/10.15863/TAS.2015.03.23.10>)
4. 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>)
5. Cosmulescu, S., Trandafir, I., Achim, G., Baci, A. (2011): *Not Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 39237 (<https://doi.org/10.15835/nbha3915728>)
6. Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S. (2016): *Pharm. Biol.* 54 2176 (<https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150303>)
7. Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O., Ferreira, I. C. F. R. (2017): *Ind. Crops Prod.*107 341 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.012>)

DETERMINING TOTAL AMOUNT OF POLYPHENOLS IN BLACK WALNUT FRUIT (*JUGLANS NIGRA L.*)

Katarina Rajković¹, Marijana Stojanović², Brankica Đokić³

Abstract

The aim of this paper was to determine a total amount of extract and polyphenols in the petroleum and ethanol extracts of black walnut green shells and fruit. Petroleum extracts were obtained by ultrasonic extraction, while ethanolic extracts were obtained by reflux extraction. The yield of the total extract was in range from 1.36 to 1.72%. The presence of polyphenol was not detected in the petroleum extracts. The content of total polyphenols in the ethanol extracts of black walnut fruit ranged from 2.46 to 2.21 mgHC/ml. Determining the total polyphenol content shows that the black walnut fruit is a rich source of polyphenolic compounds and can be used as a natural source of antioxidants.

Keywords: black walnut, extract, antioxidant

¹ Katarina Rajković, PhD., Associate professor, Bijeljina University, Faculty of Pharmacy, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina, E-mail: katar1970@yahoo.com

² Marijana Stojanović, MSc, Bijeljina University, Faculty of Pharmacy, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

³ Brankica Đokić, MSc, Bijeljina University, Faculty of Pharmacy, Pavlovica put bb, 76300 Bijeljina, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina