

Određivanje dinamike kvantitativnog sadržaja juglona i antioksidativne aktivnosti u ekstraktu ploda mladog oraha (*Juglans regia*)

- Originalan naučni rad -

Milovan VELIČKOVIĆ¹, Todor VULIĆ¹, Čedo OPARNICA¹,
Dragan RADIVOJEVIĆ¹, Boban ĐORĐEVIĆ¹, Vele TEŠEVIĆ² i
Milka JADRANIN³

¹Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

²Hemijski fakultet, Beograd

³Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Beograd

Izvod: Tehnikom visokofikasne tačne hromatografije određivan je sadržaj juglona (5-hidroxi-1,4-naftohinona) u uzorcima mladog oraha različitih sorti i različite zrelosti berbi 2005. i 2006. godine. Pored toga određena je antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata uzoraka plodova. Koncentracije juglona se nalaze u opsegu 0,03-0,24 % za berbu 2005. i 0,03-0,08 % za berbu 2006. Svi uzorci su pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost.

Ključne reči: Antioksidativna aktivnost, *Juglans regia*, juglon, vreme berbe.

Uvod

Fenolna jedinjenja su velika, heterogena grupa sekundarnih metabolita koja je široko rasprostranjena u biljnom carstvu, *Strube i sar.*, 1993. Biljni fenoli pokazuju raznovrsnost struktura i dele se u više grupa: flavonoidi, antocijanini, tanini, hinoni, fenolne kiseline, itd. U običnom orahu (*Juglans regia*), naftohinoni i flavonoidi predstavljaju glavna fenolna jedinjenja, *Jay-Allemand i Drouet*, 1989. Najznačajniji predstavnik grupe naftohinona je juglon (5-hidroxi-1,4-naftohinon) koji je u dosadašnjim ispitivanjima izolovan iz svežih listova, *Girzu i sar.*, 1998, *Wichtl i Anton*, 1999, *Amaral i sar.*, 2004, ljuski, *Lee i Campbel*, 1969, *Borazjani i sar.*, 1985, *Binder i sar.*, 1989, *Mahoney i sar.*, 2004, *Stampar i sar.*, 2006, i unutrašnje

kore korena oraha, **Hedin i sar.**, 1979. Iz svežih listova oraha su takođe izolovane različite hidroksicimetne kiseline (3-kafeoilkininska, 3-p- i 4-p- koumaroil kininska), flavonoidi (kvercetin 3-galaktozid, kvercetin 3-arabinozid, kvercetin 3-ksilozid, kvercetin 3-ramnozid), kao i hlorogenska kiselina, **Claudot i sar.**, 1997. U zelenim ljuskama, pored juglona izolovane su takođe hidroksicimetne kiseline (hlorogenska, kafeična, ferulinska i sinapinska), hidroksibenzoeve kiseline (galna, elagna, protokatehična, vanilinska i siringinska kiselina), i flavonoidi (katehin, epikatehin i miricetin), **Stampar i sar.**, 2006, i glukozida juglona (hidrojuglon β -D-glukopiranozid), **Claudot i sar.**, 1997.

Fenolna jedinjenja iz plodova oraha pokazuju pozitivan efekat na čovekovo zdravlje umanjujući rizik koronarnih bolesti, delujući preventivno na neke vrsta kancera, a takođe pokazuju antiinflamatornu i antimutagenu aktivnost, **Anderson i sar.**, 2001. Pored toga, neka ispitivanja su pokazala da je orah jedan od najbogatijih izvora antioksidanata, **Halvorsen i sar.**, 2002. Pored antimikrobnog delovanja za juglon je pokazana i antikancerogena aktivnost, **Sugie i sar.**, 1998. Plodovi mladog oraha se u tradicionalnoj narodnoj medicini koriste za proizvodnju zdravog alkoholnog pića - likera, koji je veoma bogat fenolnim jedinjenjima i vitaminima.

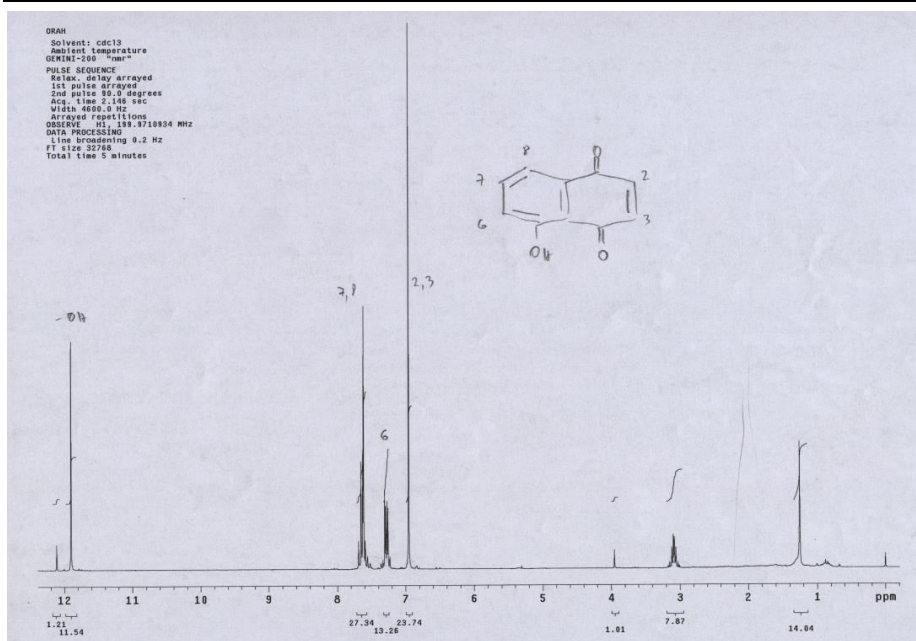
Sadržaj juglona u mladim plodovima oraha pokazuje sezonsku varijabilnost pa su neka ispitivanja pokazala da je najveća koncentracija juglona u junu (2200 mg/100 g suve težine sorta Franquette), kao i da je sadržaj juglona zavisi od sorte oraha (1404 mg/100 g suve težine sorta Elit takođe junska berba), **Stampar i sar.**, 2006. Ispitivanja, **Prasad i Gülz**, 1990, su pokazala da je juglon koncentrisan u epikutikularnom vosku mladog oraha sa učešćem od 29,8%.

Cilj ovog rada je bio da se odredi optimalno vreme berbe zelenog oraha na osnovu kvantitativnog sadržaj juglona u mladim plodovima za potrebe oplemenjivanja voćnih rakija. Takođe je namera bila da se odredi antioksidativna aktivnost ukupnog metanolnog ekstrakta mladih oraha.

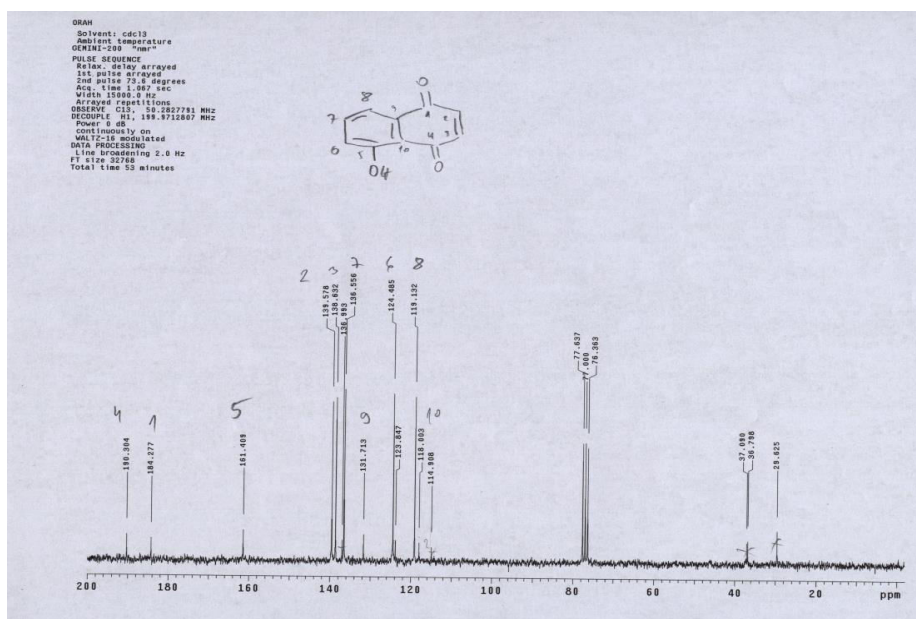
Materijal i metode

Ekstrakcija. - Uzorci mladih oraha su usitnjeni noževima u mlinu i zatim ekstrahovani sa po 10 ml metanola. Ekstrakcija je vršena u toku jednog sata ozvučivanjem na ultrazvučnom kupatilu. Nakon ceđenja metanolni ekstrakti su upareni do suva. Količina ekstrakta u pojedinim uzorcima data je u Tabeli 1.

Analitičke metode. - *Izolovanje i prečišćavanje juglona.* - Izolovanje juglona iz uzorka mladih oraha je vršeno ekstrakcijom sa metilen hloridom uz ozvučivanje na ultrazvučnom kupatilu. Nakon ekstrakcije, ekstrakt je uparen i ispitan NMR tehnikom. Dobijeni ekstrakt je dalje prečišćen na koloni od silika gela uz eluiranje smešom metilen hlorida i metanola u odnosu 95 :5. Ovako dobijen juglon je korišćen kao standard za kvantitativna određivanja. Juglon je okarakterisan tehnikom ^1H i ^{13}C NMR tehnikom, a odgovarajući spektri (^1H i ^{13}C NMR) su prikazani na Slikama 1 i 2.



Slika 1. ^1H NMR spektar juglona - ^1H NMR spectrum of juglone



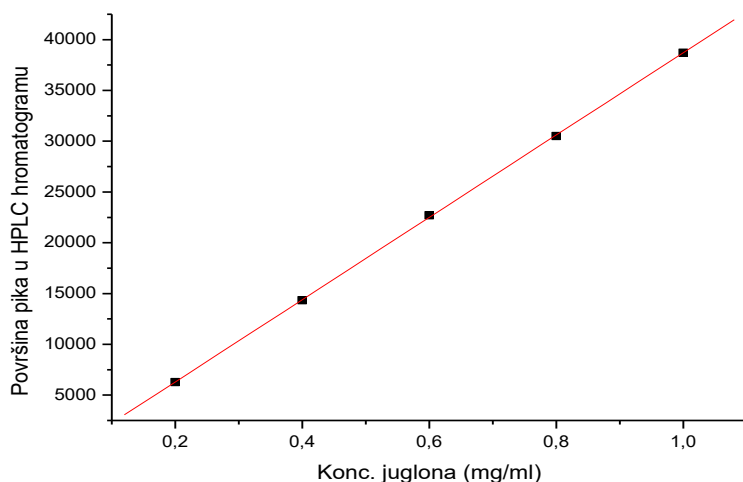
Slika 2. ^{13}C NMR spektar juglona - ^{13}C NMR spectrum of juglone

Sadržaj juglona je određivan na tečnom hromatografu Agilent 1100 uz detekciju DAD detektorom na tri talasne dužine ($\lambda_{1,2,3} = 251, 346, 427$ nm). Eluiranje je vršeno sa smešom acetonitril i 0,5% fosforne kiseline. Sadržaj mobilne faze je vremenski programiran (Tabela 1).

Tabela 1. Sadržaj mobilne faze u toku hromatografije
The Content of the Mobile Phase during Chromatography

t (min)	0,5% H ₃ PO ₄	MeCN
0	80	20
20	80	20
40	60	40
41	40	60
51	40	60
60	0	100

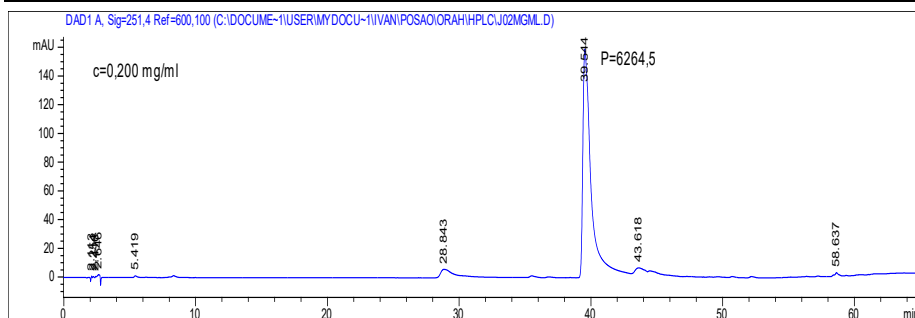
Razdvajanje je vršeno na koloni LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4mm, 5 μ) uz protok mobilne faze od 1ml/min. Kvantifikacija je vršena eksternom kalibracijom. Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu odnosa površina i različitih koncentracija juglona: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 mg/ml (Slika 3).



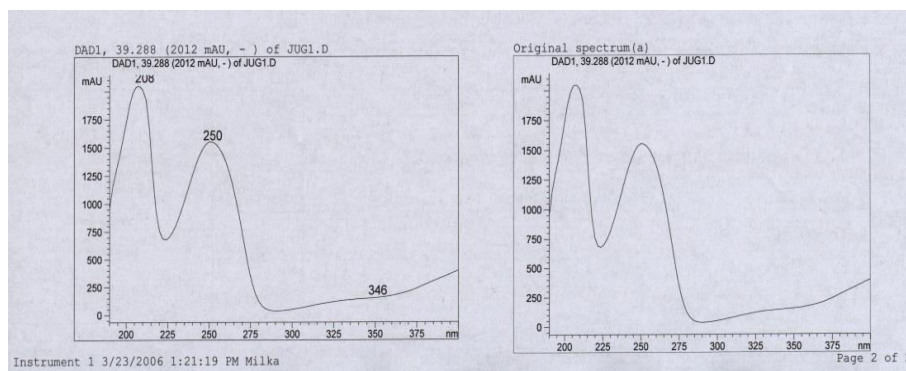
Slika 3. Kalibraciona kriva standardne serije juglona -
Calibration curve of the juglone standard series

Juglon je identifikovan na osnovu retencionog vremena (39,4 min) i UV spektra (Slika 4).

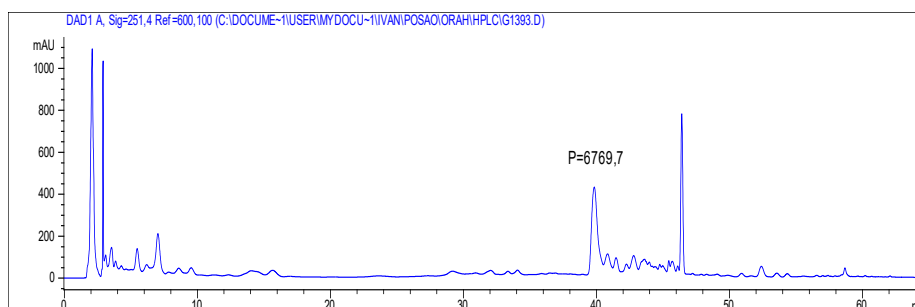
Rezultati sadržaja juglona u uzorcima mladih oraha iz berbe 2005. dati su u Tabeli 2, a primer tečnog hromatograma za uzorak G139/3 prikazan je na Slici 6. Sadržaj vitamina C je određen na aparatu Merck RQFLEX, a rezultati su takođe dati u Tabeli 2.



Slika 4. HPLC hromatogram standardnog rastvora juglona 0,2 mg/ml
HPLC chromatogram of juglone standard solution (0.2 mg ml⁻¹)



Slika 5. UV spektar juglona - UV spectrum of juglone



Slika 6. Primer tečnog hromatograma uzorka G139/3
Model of liquid chromatogram of the sample G139/3

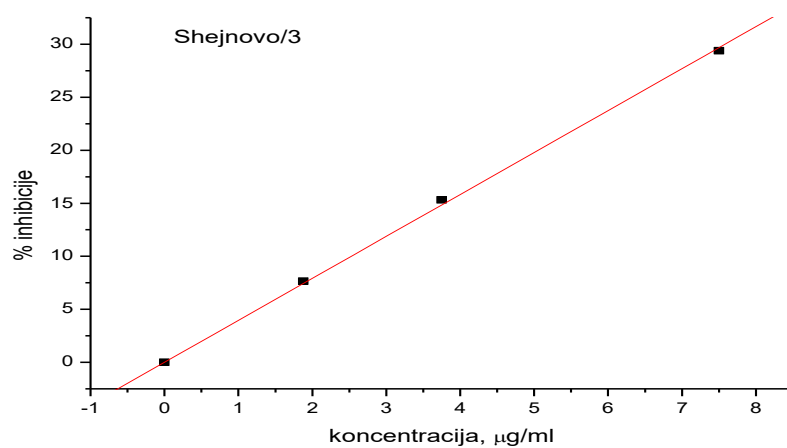
U plodovima oraha sadržaj juglona je najveći, kada je masa tih plodova između 4,5 i 6,5 grama. Zato bi bilo neracionalno brati zeleni orah za oplemenjvanje voćnih rakija pre kraja maja i početka juna, osim sorte Šejnovo, čiji plodovi visok

sadržaj juglona iskazuju i pri masi od 3,0 grama (berba 20.05).

Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata putem ABTS^{•+}. - U 200 μ l metanolnog rastvora uzorka je dodato 1800 μ l metanolnog rastvora radikal katjona 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfatne kiseline), (ABTS^{•+}). Na UV spektrofotometru je praćeno smanjenje apsorbance na $\lambda=734$ nm tokom 5 min. Negativna kontrola (bez smanjenja apsorbance) je sadržavala čist metanol umesto rastvora uzorka. Procenat inhibicije je računat pomoću formule:

$$I = [(Ac-As)/Ac] \times 100$$

gde je Ac absorbanca kontrole, a As absorbanca uzorka nakon 5 min nakon početka reakcije. Na osnovu grafika zavisnosti procenta inhibicije od koncentracije (Slika 6), nakon linearne regresione analize izračunate su EC50 vrednosti (koncentracija uzorka koja 50% inhibira ABTS^{•+}).



Slika 6. Linearna regresiona analiza - Linear regression analysis

Tabela 3. Antioksidativna aktivnost (EC50 μ g/ml) - Antioxidant Activity (EC50 μ g ml⁻¹)

Uzorak - Sample	Datum berbe - Harvesting date	EC50, μ g/ml
Šejnovovo	10.05	4,76
Šejnovovo	20.05	9,47
Šejnovovo	01.06.	12,64
G 139	10.05.	4,84
G 139	20.05.	7,18
G 139	01.06.	9,67
G 251	10.05.	4,52
G 251	20.05.	5,89
G 251	01.06.	6,45
Vitamin C	/	2,19

Rezultati ovih analiza prikazani su u Tabeli 3.

Na osnovu dobijenih rezultata, primetno je da sa porastom plodova oraha raste i njihova antioksidativna vrednost.

Zaključak

Za potrebe oplemenjivanja voćnih rakija optimalno vreme berbe mladog (zelenog) oraha je kraj maja - početak juna, kada masa plodova iznosi između 4,5 i 6,5 grama. U ovo fazi zeleni orah sadrži najveće količine juglona i pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost.

Zahvalnica

Rad je finansiralo Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije.

Literatura

- Amaral, J.S., R.M. Seabra, P.B. Andrade, P. Valentao, J.A. Pereira and F. Ferreres** (2004): Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia*) leaves. *Food Chem.* **88**: 373-379.
- Anderson, K.J., S.S. Teuber, A. Gobeille, P. Cremin, A.L. Waterhouse and F.M. Steinberg** (2001): Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J. Nutr.* **131** (11): 2837-2842.
- Binder, R.G., M.E. Benson and R.A. Flath** (1989): Eight 1,4-naphthoquinones from *Juglans*. *Phytochemistry* **28** (10): 2799-2801.
- Borazjani, A., C.H. Graves and P.A. Hedin** (1985): Occurrence of juglone in various tissues of pecan and related species. *Phytopath.* **75** (12): 1419-1421.
- Claudot, A.C., D. Ernst, H. Sander mann and A. Drouet** (1997): Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta* **203**: 275-282.
- Gürzu, M., A. Carnat, A.M. Privat, J. Fiaplip, A.P. Carnat and J.L. Lamaison** (1998): Sedative effect of walnut leaf extract and juglone, an isolated constituent. *Pharm. Biol.* **36** (4) 280-286.
- Halvorsen, B.L., K. Holte, M.C.W. Myhrstad, L. Barikmo, E. Hvattum, S.F. Remberg, A.-B. Wold, K. Haffner, H. Baugerod, L.F. Andersen, J.O. Moskaug, D.R. Jacobs and R. Blomhoff** (2002): A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* **132** (3): 461-471.
- Hedin, P.A., V.E. Langhans and C.H. Graves** (1979): Identification of juglone in pecanas a possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*. *J. Agric. Food Chem.* **27** (1): 92-94.

- Jay-Allemand, C.** und **A. Drouet** (1989): Polyphenole und Enzyme als biochemische Verjuüngung bei Walnuß. *Erwerbsobstbau* 31: 63-69.
- Lee, K.C.** and **R.W. Campbel** (1969): Nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra* L. *Hort. Sci.* 4: 297-298.
- Mahoney, N., R.J. Molyneux** and **B.C. Campbell** (2000): Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 4418-4421.
- Prasad, R.B.N.** and **P.-G. Gülz** (1990): Surface waxes from leaves and fruits of walnut. *Phytochemistry* 29: 2097-2099.
- Stampar, F., A. Solar, M. Hudina, R. Veberic** and **M. Colaric** (2006): Traditional walnut liquor-cocktail of phenolics. *Food Chem.* 95 (4): 627-631.
- Strube, M., L.O. Dragstedt** and **J.C. Larsen** (1993): Naturally Occurring Antitumorigens. I. Plant Phenols, ed. The Nordic Council of Ministers, Copenhagen, Denmark.
- Sugie, S., K. Okamoto, K. M.W. Rahman, T. Tanaka, K. Kawai, L. Yamahara** and **H. Mori** (1998): Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer lett.* 127 (1-2): 177-183.
- Wichtl, M.** et **R. Anton** (1999): *Plantes Thérapeutiques*, ed. Tec. & Doc., Paris, France, pp. 291-293.

Primljeno: 14.10.2006.

Odobreno: 18.12.2006.

* *
*

The Determination of Quantitative Juglone Content Dynamics and the Antioxidant Activity in the Extract of Green Walnut (*Juglans regia* L.) Fruits

- Original scientific paper -

Milovan VELIČKOVIĆ¹, Todor VULIĆ¹, Čedo OPARNICA¹,
Dragan RADIVOJEVIĆ¹, Boban ĐORĐEVIĆ¹, Vele TEŠEVIĆ² and
Milka JADRANIN³

¹Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade-Zemun

²Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade

³Institute of chemistry, technology and metallurgy, University of Belgrade, Belgrade

Summary

Fruits from three walnut cultivars were picked in three terms with the aim to determine the optimal harvesting time of green walnut fruits for the improvement fruit brandies. Quantity of juglone and its antioxidant activity was determined in the picked fruits.

Juglone quantity was the highest in fruits weighing between 4.5 g and 6.5 g (harvesting time around June 1), and varied from 209.60 mg up to 735.00 mg in the cultivar Sheinovo, from 388.50 mg up to 418.60 mg in the cultivar Geisenheim 139 and from 325.50 mg up to 499.40 mg in the cultivar Geisenheim 251, in a sample of 100 fruits. In this phase, walnut fruits had the highest antioxidant activity, too.

Received: 14/10/2006

Accepted: 18/12/2006

Adresa autora:

Milovan VELIČKOVIĆ
Poljoprivredni fakultet
Nemanjina 6
11080 Beograd-Zemun
Srbija