

ISPITIVANJE EKSTRAKATA ORIGANA DOBIJENIH RAZLIČITIM METODAMA

Jelena Mladenović¹, Veronika Marković¹, Ljiljana Bošković-Rakočević¹, Milena Đurić¹, Nenad Pavlović¹

Izvod: Origano se upotrebljava u proizvodnji specifičnih aromatičnih sireva, mesnih prerađevina i jela od testa, za izradu lekovitih preparata, mirisnih sapuna, kolonjske vode i parfema. Poseban interes za origano poslednjih godina vezan je za rezultate studija njegove biološke aktivnosti koje ukazuju na širok spektar antibakterijskih, fungicidnih, antiviralnih i antioksidativnih osobina. Predmet ovog rada je ispitivanje ekstrakata biljne vrste origano (*Origanum vulgare*), sa ciljem da se utvrdi metoda koja je najpogodnija za ekstrahovanje ove biljne vrste i koja daje najbolje prinose ekstrakata. Urađene su četiri različite metode ekstrakcije biljne vrste origana (*Origanum vulgare*). Određen je sadržaj ekstrahovanih materija u svakom ekstraktu, sadržaj vitamina C kao i sadržaj organskih kiselina.

Ključne reči: infuz, macerat, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija po Soxhlet-u

Uvod

Poslednjih dvadesetak godina naglo je porastao interes za prirodnu medicinu. Pored njene tradicionalne zastupljenosti u Kini, Indiji, Jugoistočnoj Aziji, Africi i Južnoj Americi, sve je veće interesovanje za njeno uključivanje u okvire zapadne medicine širom Evrope i Severne Amerike. Medicinske i farmaceutske obrazovne ustanove u sve većem broju uvode u svoje školske programe kurseve fitoterapije. Sledeći evropska iskustva, Ministarstvo zdravlja Srbije je Pravilnikom o priznavanju i primeni 18 vrsta tradicionalnih metoda dijagnostike i lečenja i rehabilitacije, među kojima je i fitoterapija, krajem 2007. godine, prvo u Regionu izjednačilo zvaničnu i tradicionalnu medicinu. Za lekare primarne zdravstvene zaštite organizuju se odgovarajući edukativni kursevi, a origano je jedna od vodećih biljaka koja se koristi u fitofarmaciji.

Origanum vulgare (vranilovka) koristi se u vidu čajeva kao lekovita biljka. Dodaje se žestokim pićima, koja dobijaju specifičan ukus i poprimaju antiseptičko svojstvo ove biljke. Koristi se u industrija tkanina, radi dobijanja proizvoda posebne lila boje (Lakušić, 1990).

Čaj od origana je prirodan izvor omega -3 masnih kiselina. One se smatraju esencijalnim masnim kiselinama zbog brojnih zdravstvenih koristi. Omega-3 masne kiseline smanjuju upale u celom telu. Ove važne kiseline smanjuju rizik od bolesti srca i artritis. Šoljica čaja od origana je sjajna antibakterijska dnevna

¹Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija (jelenamala@kg.ac.rs);

doza i njegovo redovno konzumiranje sprečava sve vrste bakterijskih infekcija jer inhibira rast bakterija (MacVicar, 2006).

Po uvođenju strogih propisa o zabrani upotrebe antibiotika u tretiranju bolesnih životinja, raste interes za primenom origana kao dodatka ishrani svinja i živine, a uspešno se primenjuje kao insekticid i fungicid u pčelarstvu i pri skladištenju poljoprivrednih proizvoda. U prehrambenoj industriji koristi se kao začim i prirodni konzervans, a njegova antiseptička svojstva primenjuju se u kozmetičkoj industriji i proizvodnji sredstava za higijenu.

Materijal i metode rada

U istraživanju je korišćena sveže ubrana biljka origana sa područja opštine Čačak (Republika Srbija). Uzorci su ubrani u septembru mesecu i kao sveži korišćeni za eksperimentalni deo.

Biljni ekstrakti se dobijaju tako što se usitnjeni delovi biljke, uglavnom suvi, dovode u kontakt sa rastvaračem za ekstrakciju u odgovarajućem uređaju, ekstraktoru. U sledećoj fazi procesa nastaje međuproizvod koji se odvaja od ostataka biljne droge. Ako se u procesu ekstrakcije koriste tečni ekstragensi (etanol ili smeša etanola i voda, masna ulja i sl.) nakon filtracije se dobija tečni ekstrakt. Kao rezultat procesa ekstrakcije može se dobiti i suvi ekstrakt, ako se nastavi proces uparavanja (Lampe, 1999). U ovoj fazi nastaje polučvrsti ekstrakt od koga se daljim procesom sušenja na odgovarajući način dobija suvi ekstrakt.

- Ekstrakti su dobijeni od suve biljke (Damjanović, 2007).
- Ekstrakcija maceracijom

Usitnjen i homogenizovan uzorak (5 g), preliven je rastvaračem (200 mL 96% etanola), potom je ostavljen u zatvorenom erlenmajeru zaštićenom od svetlosti. Maceracija se vrši pet dana, pri čemu se svakog dana obavlja mućkanje dva puta dnevno. Nakon pet dana, odvojen je biljni materijal od macerata ceđenjem kroz gazu, a posle i kroz filter papir, crna traka. Rastvarač se uklanja uparavanjem na vodenom kupatilu, a dobijeni ekstrakt se suši do konstantne mase na temperaturi od 50 °C (Piletić i Miletić, 1989).

Ekstrakcija po Soxlet-u

Najpoznatija aparatura za kontinualnu ekstrakciju čvrstih materija je eksikator po Soksletu. Ekstrakcija po Soksletu odvija se tako što se polazni materijal stavlja u čauru (hiznu). Čaura sa uzorkom je potom ubačena u srednji deo ekstraktora koji je spojen sa hladnjakom i balonom. Balon je prethodno sušen 1 čas na 105 °C i izmeren na analitičkoj vagi. Pomoću malog levka sa gornje strane kondenzatora u aparat je sipano toliko rastvarača da se ekstraktor napuni i prelije u balon. Zatim je dodato još malo rastvarača (96% etanola), pazeći da ukupna količina rastvarača ne zauzima više od $\frac{3}{4}$ zapremine balona (Šiler-Marinković, 2009).

Aparatura je postavljena na rešo i postepeno je zagrevan rastvarač u balonu tako da se kondenzovane kapljice rastvarača koje padaju na hiznu mogu brojati, a ne da cure u neprekidnom mlazu. Ekstrakcija je vršena na temperaturi ključanja rastvarača u trajanju od 6 časova. Nakon završene ekstrakcije, ekstrahovana

supstanca se nalazi rastvorena u rastvaraču u balonu. Rastvarač se uklanja uparavanjem na vodenom kupatilu na 60 °C, a zatim se ekstrakt suši u sušnici na 50 °C do konstantne mase. Nakon toga, izračunat je sadržaj ukupnih ekstrahovanih materija iz biljnog materijala (Milić i sar., 2012).

Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija je izvedena u ultrazvučnom vodenom kupatilu (EUP540A, Euinstruments, France). Uzorak (5 g) stavljen je u balon i prelivljen sa 200 mL 96%-tnog etanola. Smeša je ekstrahovana 30 minuta na frekvenciji od 40 kHz i

snazi ultrazvuka 90% (216 W), (Lajšić i Grujić-Injac, 1998).

Infuzi se izrađuju tako da se voda zagreje do ključanja, pa se sa njom prelije osušena ili usitnjena biljka i ostavi poklopljeno da stoji određeno vreme na sobnoj temperaturi. Infuzi se najčešće dobijaju od biljnih delova kao što je list, cvet ili celi nadzemni deo zeljaste biljke.

Odmerena količina (5 g) svežeg, usitnjenog origana prelivena je sa 200 mL tople vode (temperatura ne sme biti viša od 60 °C, zbog određivanja sadržaja vitamina C) i ostavljena da odstoji pokrivena na sobnoj temperaturi 1,5 sat. Potom je dobijeni infuz filtriran. Dobijeni filtrat, infuz je dalje uparavan u vodenom kupatilu do suva.

Na prinos i sastav ekstrakta uticaj imaju više faktora koji se odnose na: polazni biljni materijal, rastvarač za ekstrakciju, način dobijanja i aparatura ili uređaj. Ovi faktori određuju sastav ekstrakta, odgovorni su za količinu dobijenog ekstrakta (prinos) i određuju brzinu ekstrakcije.

Kvantitativno određivanje ukupnog vitamina C zasniva se na reverzibilnoj sposobnosti oksidoredukcionog sistema askorbinska–dehidroaskorbinska kiselina (Džamić, 1984).

Za kvantitativno određivanje vitamina C korišćena je metoda po Tilmansu (Tillmans), koja se zasniva na oksidometrijskoj titraciji tokom koje se L-askorbinska kiselina oksiduje u dehidroaskorbinsku, uz istovremenu redukciju primenjenog reagensa (Aćamović-Đoković i Cvijović, 2009).

Titracija sa 2,6-dihlorfenolindofenolom tj. Tilmansovim reagensom (TR) se izvodi u kiseloj sredini pri pH 4–6. Oksidovani oblik rastvora Tilmansovog reagensa (koji ima i ulogu indikatora) ima tamno plavu boju (pri pH 5,2), dok u prisustvu askorbinske kiseline TR prelazi u svoj redukovani, leuko oblik. Na pH 4,2 TR ima crvenu boju (kisela sredina) te kada je sva količina L-askorbinske kiseline oksidovana, prva sledeća kap TR boji ispitivani rastvor ružičasto jer je reakciona sredina još kisela.

Za ekstrakciju askorbinske kiseline iz ekstrakta biljke koristi se 10% sirćetna kiselina ili 5% metafosforna kiselina ili njihova smeša. Ove kiseline favorizuje taloženje proteina i istovremeno usporavaju reakciju drugih redukujućih supstanci sa Tilmansovim reagensom; takođe, održavaju sredinu kiselom.

Ako je za titraciju standardnog uzorka C₆H₈O₆ (2 mg) utrošeno 16 mL TR, a za slepu probu 0,1 mL, onda se titar računa po sledećoj proporciji:

$$(16 - 0,1) : 1 = 2 : s$$

gde je s titar, u ovom slučaju $h = 0,125$ mg askorbinske kiseline / 1 mL TR.

Priprema uzorka

10 g uzorka pomeša se sa jednakom zapreminom smeše HPO_3 i glacijalne CH_3COOH . Smeša se filtrira preko nabranog filter papira pri čemu se prvih 5 – 10 mL filtrata odbaci, a od ostatka uzme alikvotni deo (10 mL) za dalje određivanje.

Postupak određivanja askorbinske kiseline u uzorku

U tri erlenmajera se pipetom prenese 10 mL filtrata uzorka i zatim vrši titracija rastvorom TR do slabo ružičaste boje postojane oko 5 sekundi. Uporedo se vrši titracija slepe probe rastvorom TR do pojave ružičaste boje istog intenziteta.

Slepa proba

U tri erlenmajera se prenese onoliko destilovane vode, koliko ima soka u analiziranom uzorku i još toliko vode koliko je utrošeno TR za titraciju ispitivanog uzorka i potom doda 5 mL smeše HPO_3 i glacijalne CH_3COOH . Slepa proba treba po boji, kiselosti i ukupnoj zapremini da bude identična analizi ispitivanog uzorka. Utrošak TR za slepu probu je vrlo mali pa titraciju treba pažljivo obavljati.

Izračunavanje

Sadržaj askorbinske kiseline (u mg/10g ekstrakta) = $((V - V_{sp}) * s * 100) / V_{al}$,

V – srednja vrednost zapremina rastvora TR utrošenih za titraciju ogleadne probe (mL),

V_{sp} – srednja vrednost zapremina rastvora TR utrošenih za titraciju slepe probe (mL),

c – titar rastvora TR (mg $C_6H_8O_6$ / 1 mL TR rastvora)

V_{al} – zapremina alikvotnog dela uzorka (mL)

Rezultati istraživanja i diskusija

U svim metodama korišćena je ista masa uzorka (5 g) kao i isto vreme ekstrakcije. Rastvarač je u maceratu bio na sobnoj temperaturi, kod Soxhlet-ove na temperaturi ključanja kako metoda nalaže, dok kod infuza i ultrazvučne ekstrakcije temperatura rastvarača je bila 50 °C. Na osnovu dobijenih prinosa možemo zapaziti da je ultrazvučna ekstrakcija najoptimalnija metoda za biljku origano.

Tabela 1. Procentni prinos ekstrakcija

Table. 1. Yield extractions

Uzorak <i>Sample</i>	Maceracija <i>Maceration</i>	Soxhlet ekstrakcija <i>Soxlet extraction</i>	Ultrazvučna ekstrakcija <i>Ultrasonic extraction</i>	Infuz <i>infusion</i>
list origana <i>oregano leaf</i>	5,45%	2,25%	11,25%	7,25%

Tabela 2. Sadržaj vitamina C

Table 2. Vitamin C and organic acids contents in extracts

Vrsta ekstrakta <i>Type of extraction</i>	Vitamin C, mg/100 g <i>Vitamin C, mg / 100 g</i>	Organske kiseline g/100 g <i>Organic acids, g/100g</i>
Maceracija <i>Maceration</i>	24,32	3,27
Soxhlet ekstrakcija <i>Soxlet extraction</i>	11,25	1,15
Ultrazvučna ekstrakcija <i>Ultrasonic extraction</i>	55,50	4,25
Infuz <i>Infusion</i>	14,15	2,22

Sadržaj vitamina C je najveći kod ultrazvučne ekstrakcije što je u korelaciji sa prinosom ekstrakcije, a macerat ima veći sadržaj od infuza što je verovatno bio uticaj temperature rastvarača, jer je vitamin C termolabilan molekul.

Najveći sadržaj organskih kiselina ima ultrazvučni ekstrakt 4,25 g/100 g što je u korelaciji sa sadržajem vitamina C, zatim macerat 3,27 pa infuz 2,22 i najniži Soxhlet ekstrakt 1,15 g/100 g. Očigledno je temperatura rastvarača kao i metoda ekstrakcije vidno uticala na prinos ali i sadržaj vitamina C kao i ukupnih organskih kiselina. Najbolje rezultate na svim ispitivanim parametrima je dao ultrazvučni ekstrakt, pa je ova metoda ekstrakcije metoda izbora za biljku origano.

Zaključak

Urađene su četiri različite metode ekstrakcije biljne vrste origana (*Origanum vulgare*). Najveći prinos je dala ultrazvučna ekstrakcija a najniži Soxhlet ekstrakt. Sadržaj vitamina C i organskih kiselina je najveći, takođe kod ultrazvučne ekstrakcije što je u korelaciji sa prinosom ekstrakcije. Na osnovu rezultata možemo reći da je ova metoda ekstrakcije metoda izbora za biljku origano.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, evidencioni broj 451-03-9/2021-14.

Literatura

- Aćamović-Đoković G., Cvijović M. (2009). Praktikum iz Organske hemije, Agronomski fakultet, Čačak.
- Damjanović B. (2007). Ekstrakcija biokativnih komponenti, Metalurško-tehnološki fakultet, Podgorica.
- Džamić M. (1984). Biohemija, Beograd.

- Lajšić S., Grujić-Injac B. (1998). Hemija prirodnih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Lakušić R. (1990). Planinske biljke, Beograd.
- Lampe, J.W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies, Am. J. Chin. Nutr., Vol. 70, 475-490.
- MacVicar J. (2006). Ljekovito i začinsko bilje, Naklada Uliks, Rijeka.
- Milić J., Primorac M., Savić S. (2012). Farmaceutska tehnologija I, Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Piletić V. M., Miletić Lj. B. (1989). Organska hemija, Novi Sad, Tehnološki fakultet.
- Šiler-Marinković S. (2009). Vitamini, Beograd, Tehnološko-metalurški fakultet.

TESTING OF ORIGAN EXTRACTS BY DIFFERENT METHODS

Jelena Mladenović¹, Veronika Marković¹, Ljiljana Bošković-Rakočević¹, Milena Đurić¹, Nenad Pavlović¹

Abstract

Oregano is used in the production of specific aromatic cheeses, meat products and dough dishes, for the production of medicinal preparations, fragrant soaps, colognes and perfumes. Special interest in oregano in recent years is related to the results of a study of its biological activities, which indicate a wide range of antibacterial, fungicidal, antiviral and antioxidant properties. The subject of this paper is the examination of extracts of plant species of oregano (*Origanum vulgare*), with the aim of determining the method that is most popular for extracting this plant species and which gives the best yields of extracts. The content of extracted substances in each extract, the content of vitamin C as well as the content of organic acids were determined.

Key words: infusion, macerate, ultrasonic extraction, Soxhlet extraction

¹University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia (jelenamala@kg.ac.rs)