

# VPLIV RAZLIČNIH POLARNIH TOPIL NA DELEŽ CELOKUPNIH FENOLOV V EKSTRAKTIH LESA

Influence of different polar solvents on contents of total phenols  
in wood extracts

*Izvleček:* V prispevku smo ovrednotili vpliv treh različno polarnih organskih topil na ekstrakcijo fenolnih snovi iz lesa. Les buke (*Fagus sylvatica* L.) in smreke (*Picea abies*) smo pod enakimi pogoji ekstrahirali z 80 % metanolno, etanolno in acetonsko vodno raztopino. Primernost topil smo ocenili s spektrofotometrično analizo vsebnosti celokupnih fenolov po Folin-Ciocalteu metodi. Rezultati analize kažejo, da sta za ekstrakcijo fenolnih spojin iz bukovine in smrekovih grč izmed uporabljenih topil najbolj primerni vodni raztopini metanola in acetona, pri čemer pa je izbira topila za ekstrakcijo lesnih tkiv odvisna predvsem od raziskovalnih ciljev.

*Ključne besede:* ekstrakcija, celokupni fenoli, Folin-Ciocalteu reagent, metanol, etanol, aceton, les, bukev, smreka

*Abstract:* Effect of three variously polar solvents on extraction yield of phenolic compounds from wood was investigated. Wood of beech (*Fagus sylvatica*) and Norway spruce (*Picea abies*) was extracted by 80 % solution of methanol, ethanol and acetone in water and suitability of solvents assessed by spectrophotometric characterization of content of total phenols by Folin-Ciocalteu method. Results show that water solution of methanol and acetone are in general more suitable for extraction of phenolic compounds from wood of beech and spruce than ethanol, whereas the choice of the extraction solvent depend on the aim of the research.

*Key words:* extraction, total phenols, Folin-Ciocalteu reagent, methanol, ethanol, acetone, wood, beech, spruce

## UVOD IN POSTAVITEV PROBLEMA

Lesni ekstraktivi predstavljajo obsežno in heterogeno skupino spojin, ki jih je mogoče odstraniti iz lesa z organskimi nepolarnimi in polarnimi topili ter vodo (Fengel in Wegener, 1984; Kai, 1991; Willför in sod., 2006). Ekstrakcija je postopek, s katerim z ustreznim topilom odstranjujemo topne komponente iz trdnih ali tekočih snovi oziroma zmesi. Sestoji iz dveh zaporednih operacij, pri čemer s prvo zagotovimo stik topila s snovjo, v drugi pa obe fazi ločimo. Izbira načina ekstrakcije ter pogojev, pri katerih bo potekala, je odvisna od deleža in porazdelitve topne

komponente, narave snovi in velikosti delcev materiala, ki ga imamo namen ekstrahirati (Peklar, 2009). Kadar govorimo o ekstrakciji lesa, imamo večinoma v mislih ekstrakcijo trdno-tekoče, torej komponente ekstrahiramo iz trdnega homogeniziranega vzorca. Za ekstrakcijo se danes uporabljajo številna topila v različnih kombinacijah (kloroform/etil acetat, etanol/kloroform/etil acetat, kloroform/etil acetat/metanol ali etanol/voda/etil acetat/butanol), kar je ključnega pomena za nadaljnje analize (Willför in sod., 2003b; Xue in sod., 2004; Yang in sod., 2005a; Yang in sod., 2005b; Zule, 2008). Ekstrakt, pridobljen z določenim topilom, po svoji kvalitativni sestavi ni primerljiv z ekstraktom, pridobljenim z drugimi topili.

Ker so lahko ekstraktivi bolj ali manj polarni, jih lahko na osnovi topnosti v različnih topilih razdelimo na dve skupini, hidrofilne in lipofilne. Hidrofilni ekstraktivi so topni v vodi

\* mladi raziskovalec, univ. dipl. inž. les., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: viljem.vek@bf.uni-lj.si

\*\* izr. prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: primoz.oven@bf.uni-lj.si

in ostalih polarnih topilih, lipofilni pa so topni v nepolarnih organskih topilih, kot so npr. cikloheksan, toluen, pentan, petroleter ali diklorometan (Willför in sod., 2006). Lipofilni ekstraktivi, ki se v lesu najpogosteje pojavljajo kot alifatske spojine, so npr. voski, maščobe, maščobni alkoholi, maščobne kisline ali terpeni in pigmenti. Te snovi lahko negativno vplivajo na sam postopek analize (zamašitev kolon) spojin polifenolnega značaja (Slanina in Glatz, 2004). Znano je, da se npr. pri ekstrakciji lesa z acetonom, poleg določenih fenolov in fenilnih glikozidov, odstranijo tudi smolne komponente lesa ter nekateri ogljikovi hidrati (Holmbom, 1999; Willför in sod., 2006). Posledica omenjenih interakcij je lahko formacija kompleksov, ki so lahko netopni v izbranem topilu. Zaradi tega je priporočljivo, da se vse nezaželene "ne-fenolne" komponente odstrani s predhodno oziroma nadaljnjo ekstrakcijo z nepolarnim topilom (Fengel in Wegener, 1984; Naczk in Shahidi, 2007; Willför in sod., 2006).

Fenolni ekstrakti, pridobljeni iz rastlinskih tkiv, predstavljajo raznoliko mešanico fenolnih spojin, topnih v izbranem topilu. Topila, ki se najpogosteje uporabljajo za ekstrakcijo fenolov iz rastlinskih tkiv, torej tudi iz lesa, so metanol, aceton, etanol, propanol, etil acetat ter različne zmesi topil. Omenjenim topilom se pogosto doda tudi določen delež vode. Ta izboljša penetracijo samega topila ter omogoči ekstrakcijo bolj polarnih komponent, kot so npr. fenolni glikozidi (Willför in sod., 2006). Tako se npr. za ekstrakcijo taninov, najpogosteje uporablja voda, 50 % metanol (aq) in 50 % - 70 % aceton (aq) (Hagerman, 1988; Mueller-Harvey, 2001).

Z namenom povečanja ekstrakcijske učinkovitosti se polarnim topilom pogosto dodaja 0,1 % - 3 % kisline (HCl, HCOOH ali CH<sub>3</sub>COOH, v/v). Nakisana polarna topila se uporablja predvsem za učinkovito ekstrakcijo taninov in antocianinov (Hagerman, 1988). Pri ekstrakciji slednjih topilo s kislinim dodatkom uniči celično membrano ter istočasno raztopi antocianine in jih stabilizira (Naczk in Shahidi, 2007; Vermerris in Nicholson, 2006).

Ker se fenolne snovi med ekstrakcijo iz lesnega matriksa ne smejo kemijsko spremeniti, so način vzorčenja, shranjevanja in predhodne obdelave ključnega pomena (Naczk in Shahidi, 2007; Willför in sod., 2006; Zule, 2008; Zule in sod., 2003). Na donos ekstrakcije seveda vpliva tudi čas le-te, pri čemer lahko ekstrakcija poteka od 1 minute do 24 ur. Pri časovno daljših ekstrakcijah se poveča možnost oksidacije fenolnih spojin, čemur pa se lahko izognemo z uporabo antioksidativnih reagentov, kot je npr. BHT (2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol). Na količino ekstrahiranih snovi močno vpliva tudi razmerje vzorec/topilo (R), torej razmerje med zatehto in topilom (Naczk in Shahidi, 2007). Naczk je s sodelavci (1992) dokazal, da npr. sprememba razmerja R iz 1:5 na 1:10 izboljša ekstrakcijo kondenziranih taninov iz oljne ogrščice (*Brassica napus* L.).

S pričujočim prispevkom smo želeli preveriti, katero od topil, ki se najpogosteje uporabljajo za ekstrakcijo rastlinskih tkiv, torej metanola, etanola in acetona, je najprimernejše za ekstrakcijo polifenolov iz lesa debela in grč. Primernost topil smo ocenili na podlagi rezultatov spektrofotometrične analize deleža celokupnih fenolov [mg/L] po Folin-Ciocalteu metodi.

## MATERIAL IN METODA

V preliminarno raziskavo smo vključili material, ki smo ga pridobili pri poseku mehansko poškodovane bukve (*Fagussylvatica* L.) v primestnem gozdu Rožnik v Ljubljani. Iz debela posekanega drevesa smo izžagali koluto, ga prenesli v delavnico Oddeka za lesarstvo in ga shranili v zamrzovalni skrinji do nadaljnje obdelave.

Na osnovi rastnih posebnosti smo označili bodoče vzorce na kolutu in jih izžagali. Iz koluta smo odvzeli po en vzorec zdrave beljave (B), reakcijske cone (RC), rdečega srca (RS) in poranitvenega lesa (PL). Dimenzije vzorcev so bile 40 mm X 40 mm x 50 mm, pri čemer je bila velikost vzorcev RC in PL prilagojena velikosti in obliki tkiv. V analizo smo vključili tudi eno smrekovo grčo (Grča), saj je dokazano, da imajo grče velik polifenolni potencial (Ekman, 1976; Willför in sod., 2003a; Willför in sod., 2004a; Willför in sod., 2004b). Centralni del grč iglavcev oziroma smrekovih grč naj bi namreč vseboval 10-100 krat večjo koncentracijo fenolov kot jedrovina (Zule, 2008). Še več, delež lignanov naj bi bil v smrekovi grči (*Picea abies*) kar 6 % - 24 % (w/w) (Willför in sod., 2003a; Willför in sod., 2004a). Dimenzije oziroma premer grče je znašal 32 mm.

Tako pripravljene vzorce smo s pomočjo tračne žage in dleta predelali v iveri, te pa smo nato postavili v ločene in ustrezno označene petrijevke ter jih posušili do zračno suhega stanja. Iveri posameznih kategorij lesa debela in grče smo homogenizirali na rotacijskem mlinu Retsch ZM200, za kar smo uporabili 0,5 mm sito.

Sledila je ekstrakcija fenolnih spojin z 80 % metanolom (aq), 80 % etanolom (aq) in 80 % acetonom (aq), pri čemer je bilo razmerje vzorec/topilo (R) 1:10 (w/v). Ob stalnem mešanju na večmestnem magnetnem mešalu (slika 1) smo vzorce pri sobni temperaturi ekstrahirali 6 ur (Albert in sod., 2003). Ekstrate smo prefiltrirali (Whatman GF/C) in jih do pričetka analiz hranili pri 4 °C. Vsa tri topila so bila kupljena pri Sigma-Aldrich.

Ekstraktom smo nato spektrofotometrično določili delež celokupnih fenolov po Folin-Ciocalteu metodi (Scalbert in sod., 1989; Singleton in Rossi, 1965), ki smo jo natančneje opisali v Vek in sod. (2010). Metanolnim, etanolnim in acetonskim ekstraktom smo dodali Folin-Ciocalteu barvni reagent (aq) ter po 30 sekundah še vodno raztopino



**Slika 1. Hladna ekstrakcija lesa z večmestnim magnetnim mešalom (foto: V. Vek)**

natrijevega karbonata. Sledila je 2-urna inkubacija vzorcev pri 22 °C (Scalbert in sod., 1989; Singleton in Rossi, 1965).

Absorbance vzorcev smo pomerili pri 765 nm z UV-VIS spektrofotometrom Perkin-Elmer Lambda 2 (slika 2).

Delež celokupnih fenolov v metanolnih, etanolnih oziroma acetonskih ekstraktih lesa bukve ter smrekove grče smo določili na osnovi absorbanca  $A_{765}$  s pomočjo enačbe regresijske premice umeritvene krivulje za galno kislino. Vsebnost celokupnih fenolov v ekstraktih smo torej predstavili v ekvivalentnih masnih koncentracij galne kisline [mg/L].

## REZULTATI IN RAZPRAVA

Deleži celokupnih fenolov v metanolnih, etanolnih in acetonskih ekstraktih različnih tipov lesnih tkiv bukve ter

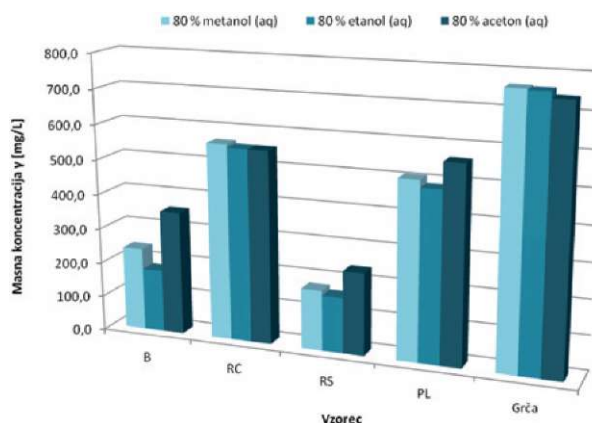


**Slika 2. Vstavljanje vzorca v merilno celico UV-VIS spektrofotometra (foto: V. Vek).**

smrekove grče so predstavljeni na sliki 3.

Primerjava deležev celokupnih fenolov [mg/L] med ekstrakti, pridobljenih z različnimi topili, torej metanolom, etanolom oziroma acetonom kaže, da so bili ti v metanolnih in acetonskih ekstraktih višji kot v etanolnih ekstraktih. Aceton se je izkazal kot najučinkovitejše topilo fenolnih komponent v primeru beljave, rdečega srca in poranitvenega lesa, medtem ko pa se je z njim iz reakcijske cone in grče izpralo najmanj fenolov. Kot učinkovito topilo se je izkazal tudi metanol, pri čemer je bila metanolna ekstrakcija najučinkovitejša pri vzorcih reakcijske cone in smrekove grče, dokaj visoke deleže celokupnih fenolov pa smo določili tudi v metanolnih ekstraktih beljave, rdečega srca in poranitvenega lesa. Kot najmanj učinkovito topilo je bil v našem primeru etanol, saj smo v etanolnih ekstraktih beljave, rdečega srca in poranitvenega lesa določili najnižjo koncentracijo celokupnih fenolov. Kljub temu pa smo z etanolom iz reakcijske cone odstranili večji delež fenolnih spojin kot smo jih z acetonom.

Rezultati preliminarne analize kažejo, da sta za ekstrakcijo fenolnih spojin iz bukovine in smrekovih grč izmed uporabljenih topil najbolj primerni vodni raztopini metanola in acetona. Metanol se najpogosteje uporablja za ekstrakcijo fenolnih snovi iz različnih rastlinskih tkiv, tudi iz lesa (Hafizoglu in Holmbom, 1995; Mammela, 2001; Naczki in Shahidi, 2007; Smith, 1997; Vermerris in Nicholson, 2006). Za ekstrakcijo lesnih tkiv se seveda uporablja tudi etanol (Ahajji in sod., 2009; Shortle, 1990; Smith, 1997; Zule, 2008) in v zadnjem času vse pogosteje aceton (Holmbom, 1999; Thurbide in Hughes, 2000; Willför in sod., 2005a; Willför in sod., 2007; Willför in sod., 2004b; Willför in sod., 2006; Willför in sod., 2005b). Scalbert na primer navaja, da je vodna raztopina acetona najprimernejše topilo za ekstrakcijo ta-



**Slika 3. Koncentracije celokupnih fenolov v ekstraktih lesa bukve (B = beljava, RC = reakcijska cone, RS = rdeče srce, PL = poranitveni les) oziroma smrekove grče (Grča).**

ninov, medtem ko lahko pri ekstrakciji z metanolom pride do cepitve galoil etrskih vezi v galotaninih, kar lahko močno zaplete nadaljnjo analizo ekstraktov (Scalbert, 1992).

Za konec želimo poudariti, da je izbira topila za ekstrakcijo lesnih tkiv odvisna predvsem od raziskovalnih ciljev, torej katero skupino nestrukturnih snovi lesa želimo raziskovati (lipofilnih, hidrofilnih), kateri razred (npr. fenolnih) snovi nas zanima in tudi kakšni bodo nadaljnji analitski in separacijski postopki v raziskavi.

V prihodnje nameravamo primerjati učinkovitost ekstrakcije pri različnih ekstrakcijskih pogojih kot so različna hitrost cirkuliranja topila, trajanje, temperatura ekstrakcije in različne koncentracije topil.

## ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo programske skupine P4-0015-0481.

## VIRI

1. Ahajji A., Diouf P., Aloui F., Elbakali I., Perrin D., Merlin A., George B. (2009) Influence of heat treatment on antioxidant properties and colour stability of beech and spruce wood and their extractives. *Wood Science and Technology*, 43, 1: 69-83
2. Ekman R. (1976) Analysis of Lignans in Norway Spruce by Combinec Gas-Chromatography - Mass-Spectrometry. *Holzforchung*, 30, 3: 79-85
3. Fengel D., Wegener G. (1984) *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. W. de Gruyter, Berlin-New York, 613
4. Hafizoglu H., Holmbom B. (1995) Chemical-Composition of Extractives from *Abies Nordmanniana*. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 53, 4: 273-275
5. Hagerman A. E. (1988) Extraction of Tannin from Fresh and Preserved Leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 2: 453-461
6. Holmbom B. (1999) Extractives. V: *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. Sjöström E. in Alén R. (Ur.), Springer-Verlag, Berlin, 316
7. Kai Y. (1991) *Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry*. Hon D.N.S. in Shiraiishi N. (Ur.), Marcel Dekker, Inc., New York, 215-255
8. Mammela P. (2001) Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Analyst*, 126, 9: 1535-1538
9. Mueller-Harvey I. (2001) Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 1-2: 3-20
10. Nacz M., Shahidi F. (2007) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis (vol 41, pg 1523, 2006). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 2: 798-798
11. Nacz M., Shahidi F., Sullivan A. (1992) Recovery of Rapeseed Tannins by Various Solvent Systems. *Food Chemistry*, 45, 1: 51-54
12. Peklar M. (2009) Separacija bioaktivnih komponent iz brusnic. Diplomsko delo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 81
13. Scalbert A. (1992) Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissue. V: *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance* Hemingway R.W. in Laks P.E. (Ur.), Plenum Press, New York, 259-280
14. Scalbert A., Monties B., Janin G. (1989) Tannins in Wood - Comparison of Different Estimation Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 5: 1324-1329
15. Shortle W. C., Smith K. T. (1990) Decay Column Boundary Layer Formation in Maple. *Biodegradation Research*, 3, 377-389
16. Singleton V. L., Rossi J. A., Jr. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 3: 144-158
17. Stanina J., Glatz Z. (2004) Separation procedures applicable to lignan analysis. *Journal of Chromatography B*, 812, 1-2: 215-229
18. Smith K. T. (1997) Phenolics and Compartmentalization in the Sapwood of Broad-Leaved Trees. V: *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Dashek W.V. (Ur.), CRC-Press, Florida, U.S., 480
19. Thurbide K. B., Hughes D. M. (2000) A rapid method for determining the extractives content of wood pulp. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39, 8: 3112-3115
20. Vek V., Oven P., Rep G. (2010) Vsebnost skupnih fenolov v beljavi, rdečem srcu in poranitvenem lesu pri bukvi (*Fagus sylvatica* L.). *Les-Wood*, 62, 5: 193-198
21. Vermerris W., Nicholson R. (2006) *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Science+Business Media B.V., Netherlands, 276
22. Willför S., Eklund P., Sjöholm R., Reunanen M., Sillanpää R., Von Schoultz S., Hemming J., Nisula L., Holmbom B. (2005a) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 4: Identification of two new 7-hydroxy divanillyl butyrolactol lignans in some spruce, fir, and pine species. *Holzforchung*, 59, 4: 413-417
23. Willför S., Hafizoglu H., Tümen I., Yazici H., Arfan M., Ali M., Holmbom B. (2007) Extractives of Turkish and Pakistani Tree Species. *European Journal of Wood and Wood Products*, 65, 3: 215-221
24. Willför S., Hemming J., Reunanen M., Eckerman C., Holmbom B. (2003a) Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforchung*, 57, 1: 27-36
25. Willför S., Nisula L., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B. (2004a) Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzforchung*, 58, 4: 335-344
26. Willför S., Reunanen M., Eklund P., Sjöholm R., Kronberg L., Fardim P., Pietarinen S., Holmbom B. (2004b) Oligolignans in Norway spruce and Scots pine knots and Norway spruce stemwood. *Holzforchung*, 58, 4: 345-354
27. Willför S. M., Ahotupa M. O., Hemming J. E., Reunanen M. H. T., Eklund P. C., Sjöholm R. E., Eckerman C. S. E., Pohjamo S. P., Holmbom B. R. (2003b) Antioxidant Activity of Knotwood Extractives and Phenolic Compounds of Selected Tree Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 26: 7600-7606
28. Willför S. M., Smeds A. I., Holmbom B. R. (2006) Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112, 1-2: 64-77
29. Willför S. M., Sundberg A. C., Rehn P. W., Holmbom B. R., Saranpää P. T. (2005b) Distribution of lignans in knots and adjacent stemwood of *Picea abies*. *European Journal of Wood and Wood Products*, 63, 5: 353-357
30. Xue J. J., Fan C. Q., Dong L., Yang S. P., Yue J. M. (2004) Novel Antibacterial Diterpenoids from *Larix chinensis* Beissn. *Chemistry & Biodiversity*, 1, 1702-1707
31. Yang B.-H., Zhang W.-D., Liu R.-H., Li T.-Z., Zhang C., Zhou Y., Su J. (2005a) Lignans from Bark of *Larix olgensis* var. *koreana*. *Journal of Natural Products*, 68, 8: 1175-1179
32. Yang B. H., Zhang W. D., Liu R. H., Tan C. H., Li T. Z., Zhang C. A., Xu X. K., Su J. (2005b) Spiro-biflavonoids from *Larix olgensis* HENRY var. *koreana* NAKAI. *Helvetica Chimica Acta*, 88, 11: 2892-2896
33. Zule J. (2008) Polifenoli v različnih vrstah macesna (*Larix spp.*). Zbornik gozdarstva in lesarstva, 86, 51-58
34. Zule J., Tišler V., Žurej A., Torelli N. (2003) Isolation and characterization of essential oils from the cones of Norway spruce (*Picea abies* Karst.), European larch (*Larix decidua* Mill.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 71, 159-172