

RAZVOJ METODE ZA HPLC-ANALIZO IZBRANIH FENOLNIH SPOJIN LESA DEVELOPMENT OF THE HPLC METHOD FOR SEPARATION OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS OF WOOD

Ida POLJANŠEK¹, Viljem VEK², Primož OVEN³

(1) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, ida.poljansek@bf.uni-lj.si

(2) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, viljem.vek@bf.uni-lj.si

(3) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, primoz.oven@bf.uni-lj.si

IZVLEČEK

Preučevali smo vpliv sestave mobilne faze na ločitev enostavnih fenolnih spojin, kot so galna kislina, pirokatehol, floriglucinol, resorcinol, vanilin in flavonoida katehina s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Kot najbolj primerna metoda za ločitev komponent se je izkazala metoda gradientnega izpiranja s programiranim spreminjanjem sestave mobilne faze acetonitril in 2-odstotna vodna raztopina mravljinčne kisline od 2 : 98 do 25 : 75. Ločitev organskih spojin je bila učinkovitejša v mobilni fazi z manjšim deležem mravljinčne kisline. HPLC je primerna metoda za identifikacijo in kvantitativno analizo spojin v različnih tipih vzorcev na širokem področju verige gozdarstva, lesarstva in papirništva.

Ključne besede: les, ekstraktivi, fenolne spojine, katehin, kromatografija, HPLC, ločba

ABSTRACT

The most suitable composition of mobile phase for the separation of simple phenolic compounds such as gallic acid, pyrocatechol, phloroglucinol, resorcinol, vanillin and related compound catechin by the high performance liquid chromatography was investigated. The most appropriate developing mobile system for the separation of these organic compounds was acetonitrile and 2% water solution of formic acid with gradient ratio from 2.98 to 25:75. The best separation of the six organic compounds was achieved using mobile phase with lower content of formic acid. HPLC is a method of choice for qualitative and quantitative analysis compounds in various types of samples in the broad field of forestry-wood-pulp-paper chain.

Key words: wood, extractives, phenolic compounds, catechin, chromatography, HPLC, separation

GDK 84

UDK 630*84:547.562.4

DOI 10.20315/ASetL.108.2

Prispelo / Received: 27. 03. 2015

Sprejeto / Accepted: 24. 12. 2015

1 INTRODUCTION

1 UVOD

Les je zapleten kemični proizvod lesnih rastlin, ki ga sestavljajo polimerni gradniki celičnih sten ter druge nestrukturane spojine, ki so večinoma zunaj ligno-celulozne celične stene in jih pogosto imenujemo ekstraktivi. V lesu se pojavljajo v manjših količinah, vendar pomembno vplivajo na lastnosti lesa (Dinwoodie, 2000, Kai, 1991). Ekstraktivi so večinoma topne organske snovi, ki jih je iz lesa mogoče odstraniti z uporabo topil ustrezne polarnosti, ne da bi se pri tem bistveno spremenila njihova kemična zgradba ali zgradba preostalih strukturnih komponent. Na osnovi topil, s katerimi jih lahko ekstrahiramo iz lesa, jih delimo na lipofilne (voski, maščobe, maščobni alkoholi, maščobne kisline, terpenoidi, steroli in sterolni estri) in hidrofilne (Holmbom, 1999, Sjöström, 1993, Fengel in Wegener, 1989). Hidrofilni ekstraktivi so navadno topni sladkorji in fenolne spojine. Med fenolnimi ekstraktivi

lesa iglavcev in listavcev so najpogostejši enostavni oziroma nizko-molekularni fenoli, lignani, flavonoidi, stilbeni, kinoni in kompleksnejše kemične strukture, kot so kondenzirani in hidrolizirajoči tanini (Willför in sod., 2006). Enostavni fenoli, kot so galna kislina, pirokatehol, vanilin in resorcinol, so lahko razgradni produkti hidrolizirajočih taninov in/ali lignina (Umezawa, 2000), katehin pa je monomerna enota kondenziranih taninov (Fengel in Wegener, 1989).

Pri raziskavah na širšem področju znanosti o lesu se vse pogosteje pojavlja potreba po učinkoviti metodi za določitev posameznih spojin, bodisi spojin, ki sestavljajo les posameznih drevesnih vrst, bodisi produktov različnih kemijskih reakcij (Yusiasih in sod., 2003, Sjöström in Alen, 1999). Ena izmed takšnih metod je tekočinska kromatografija, ki omogoča fizično ločbo posameznih spojin v preiskovanem vzorcu ter nadaljnjo identifikacijo in kvalitativno analizo (Žorž 1991; Waksmundzka-Hajnos and Sherma 2010).

Kromatografija je na splošno skupno ime fizikalno kemijskih metod ločevanja komponent iz zmesi. Ta tehnika nam omogoča identifikacijo in kvantitativno vrednotenje posameznih spojin v raztopini, npr. nizkomolekularnih ekstraktivov v surovem lesnem ekstraktu. Kromatografsko ločbo določajo različne hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze, pri tekočinski kromatografiji je le-ta v tekočem agregatnem stanju (ang. liquid, zato LC - liquid chromatography), pri čemer so različne hitrosti potovanja spojin skozi kolono posledica selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi kolone (Žorž 1991; Waksmundzka-Hajnos and Sherma 2010). Za vrednotenje nizkomolekularnih fitokemikalij se danes najpogosteje uporablja reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (RP-HPLC), kjer je polarnost stacionarne faze manjša kot polarnost mobilne faze. Kot mobilna faza se pri reverzni kromatografiji uporablja mešanica vode (ali pufra) in polarnih organskih topil (npr. metanol ali acetonitril) (Celimene in sod., 1999). Pri HPLC-analizah ekstraktov rastlinskih tkiv sta za učinkovito ločbo bistvenega pomena poznavanje vzorca ter ustrezna izbira stacionarne (kolona) in mobilne faze (topila, sistema topil). Sestavo oziroma polarnost mobilne faze lahko med kromatografsko analizo tudi spreminjamo. Ta način imenujemo gradientno izpiranje ali eluiranje, v nasprotju z izokratskim, pri katerem ostane polarnost mobilne faze v času kromatografske ločbe nespremenjena (Arsenault and McDonald 2007).

Namen pričujoče študije je bil razviti učinkovito HPLC-metodo za kvalitativno in kvantitativno določitev in ločitev nekaterih enostavnih fenolnih spojin in katehina, ki se redno pojavljajo v ekstraktih lesa in skorje različnih drevesnih vrst. V prispevku smo s tekočinsko kromatografijo določevali retencijske čase in tudi koncentracije enostavnih fenolnih spojin in katehina. Tekočinska kromatografija se je izkazala kot najprimernejša metoda za kvalitativno in kvantitativno določevanje enostavnih fenolnih spojin in katehina kot tudi za določevanje organskih spojin v ekstraktih različnih delov drevesa.

Preglednica 1: Izokratska metoda elucije za ločitev zmesi enostavnih fenolnih spojin in katehina

2 MATERIAL IN METODE

2 MATERIALS AND METHODS

Topila, metanol (Sigma-Aldrich, HPLC grade), acetonitril (Sigma-Aldrich, HPLC grade) in mravljinčna kislina (Sigma-Aldrich, >99 %), so bila analitske čistosti. Pripravili smo raztopine različnih koncentracij galne kisline monohidrata (Fluka, >98 %), pirokatehola (Merck, >99 %), floroglucinola (Sigma-Aldrich, >99 %), resorcinola (Kemika, p.a.), vanilina (Fluka, >99 %) in katehina (Sigma-Aldrich, >98 %) v metanolu, z masno koncentracijo 4 mg mL⁻¹. Poleg tega smo za razvoj kromatografske metode pripravili ustrezno koncentrirano zmes izbranih fenolnih spojin. Za izdelavo umeritvenih krivulj smo morali posneti kromatograme standardnih vzorcev različnih koncentracij za vsako preiskovano spojino posebej. Različne koncentracije posameznih organskih spojin so nam omogočile izdelavo umeritvenih krivulj za kvantitativno določevanje teh spojin v mešanici. Vzorce ustreznih koncentracij smo pripravili tik pred meritvijo. Uporabljali smo topila analitske čistosti, saj se nečistoče v topilih lahko nalagajo na stacionarni fazi v kromatografski koloni in se ob spremembi sestave mobilne faze lahko izpirajo ter s tem popačijo kromatogram.

Za separacijo enostavnih fenolnih spojin in katehina smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti na reverzni stacionarni fazi. Za injiciranje smo uporabili 5 µL posameznega vzorca, pri čemer je injiciranje potekalo direktno (brez predhodne derivatizacije). Za separacijo smo uporabili kolono Thermo ODS HYPERSIL C18 (250 x 4,6 mm) z velikostjo delcev stacionarne faze 5 µm. Kolona je bila termostatirana na 22 °C. Za mobilno fazo smo uporabili dve topili, in sicer acetonitril (topilo A, CH₃CN) in vodo (topilo B, H₂O) ob dodatku 2,0 ut. % mravljinčne kisline (HCOOH). Posamezne spojine v preiskovani zmesi smo kromatografsko ločevali z izokratsko in gradientno elucijsko metodo (preglednici 1 in 2), pri čemer je pretok znašal 1 mL min⁻¹. Kromatografska analiza je bila opravljena v treh ponovitvah.

Enostavne fenolne spojine in katehin smo detektirali s fotodiodnim detektorjem "diode array" (Accela,

Table 1: Isocratic elution method for the separation of the mixture of simple phenolic compounds and catechin

Izokratska elucija (I) z acetonitrilom [A] in vodo z 2,0 ut. % mravljinčne kisline [B] Isocratic elution (I) with acetonitrile [A] and water with 2.0 wt.% of formic acid [B]		
Čas elucije / Elution time	Sestava mobilne faze / Mobile phase composition	
t [min]	A [%]	B [%]
0	25	75
35	25	75

Preglednica 2: Gradientna elucijska metoda za zmesi enostavnih fenolnih spojin in katehina

Gradientna elucija (II) z acetonitrilom [A] in vodo z 2,0 ut. % mravljinčne kisline [B] Gradient elution (II) with acetonitrile [A] and water with 2.0 wt.% of formic acid [B]		
Čas elucije / Elution time	Sestava mobilne faze / Mobile phase composition	
t [min]	A [%]	B [%]
0	2	98
5	5	95
35	25	75

PDA detector). Detekcija je potekala pri valovni dolžini 280 nm, za identifikacijo vrhov pa smo uporabili spekter od 200 do 600 nm. Identifikacijo spojin smo napravili na osnovi primerjave retencijskih časov (t_r) in UV spektrov analitskih standardov posameznih organskih spojin.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

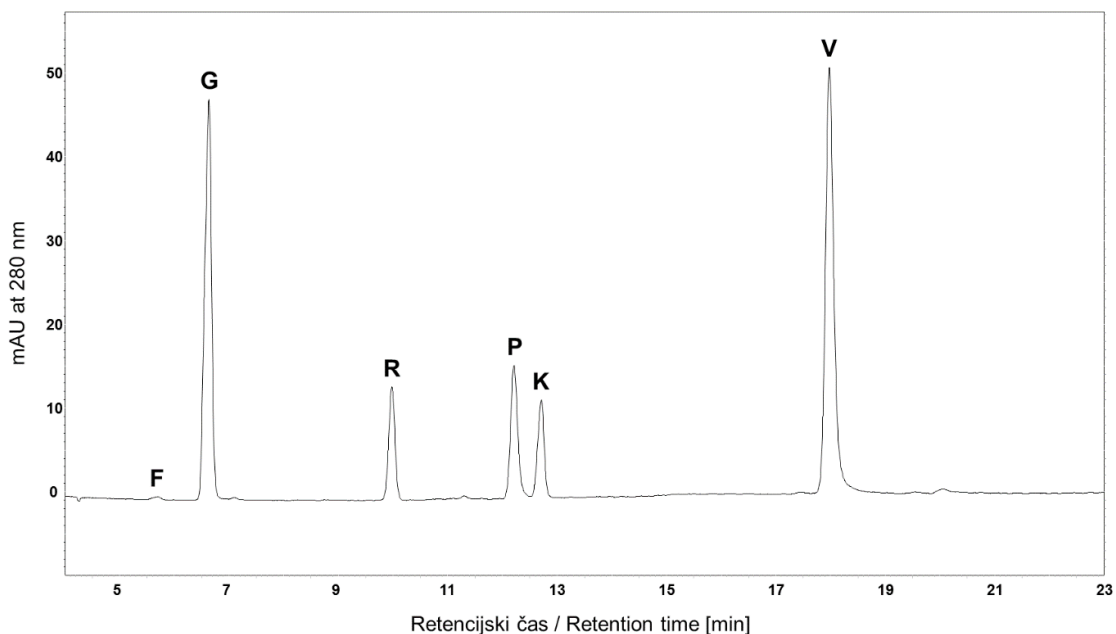
3 RESULTS AND DISCUSSION

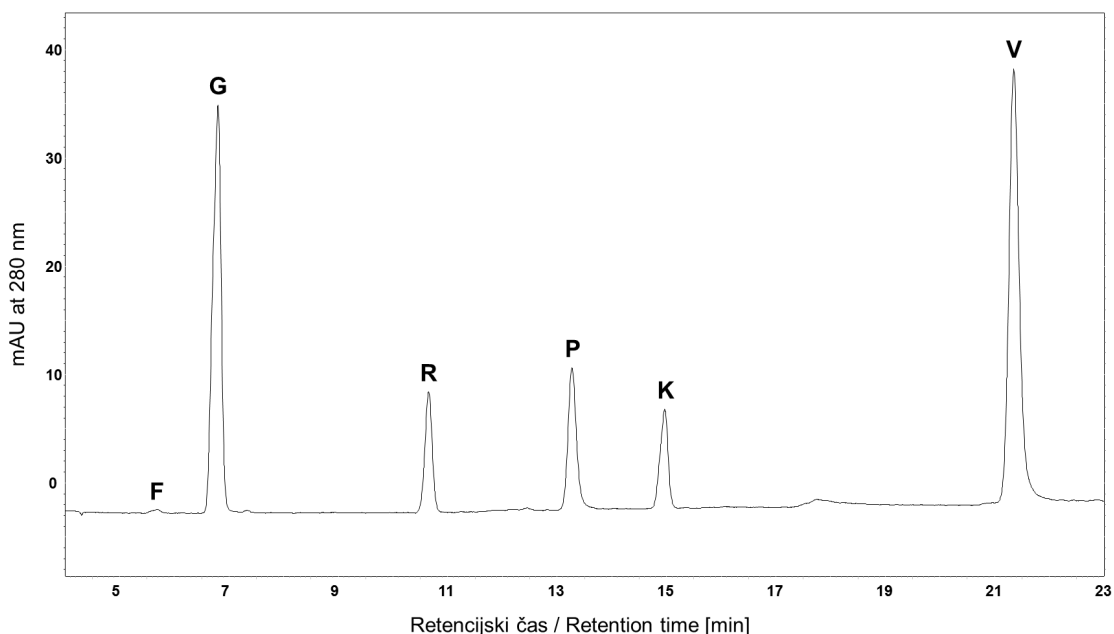
Za separacijo enostavnih fenolnih spojin in katehina smo najprej uporabili izokratsko metodo, nato pa metodo gradientnega izpiranja, s katero smo pospešili izpiranje organskih spojin, katerih polarlost se giblje v širokem območju. Nekatere izmed teh spojin se lahko močneje zadržujejo na koloni, vendar jih lahko s primernim gradientom (sestavo mobilne faze) hitreje izperemo iz kolone. Mešali smo dve topili, in sicer acetonitril in vodo z dodatkom mravljinčne kisline. Izkazalo se je, da izokratska metoda ni bila primerna za dovolj

Table 2: Gradient elution method for the separation of the mixture of simple phenolic compounds and catechin

dobro ločitev šestih izbranih enostavnih fenolnih spojin in katehina (slika 1). Spojine so si med seboj zelo podobne in se relativno malo razlikujejo glede polarlosti, zato imajo podobne retencijske čase. To še zlasti velja za katehin in pirokatehol (preglednica 3), ki ju na kromatogramu (slika 1) težje ločimo kot druge organske spojine, njuna signala se deloma prekrivata. Da zagotovimo dobro ločljivost sorodnih organskih spojin, moramo poleg primerne kolone izbrati tudi primerno mobilno fazo oziroma primerno razmerje topil, zato smo se odločili, da bomo opravili tudi HPLC kromatografijo teh organskih spojin z gradientnim izpiranjem. To pomeni, da se sestava mobilne faze med eksperimentom spreminja.

V splošnem bi bilo boljše ločbo med drugim mogoče doseči s spremembo stacionarne faze (zamenjava kolone), spremembo mobilne faze ali s spremembo elucijske metode. Namen naše študije je bil prav slednji pristop. V naši raziskavi smo tako ohranili kolono

**Slika 1:** HPLC-kromatogram zmesi katehina (K), galne kisline (G), pirokatehola (P), floroglucinola (F), resorcinola (R) in vanilina (V) z izokratskim izpiranjem**Fig. 1:** HPLC chromatogram of the mixture of catechin (K), gallic acid (G), pyrocatechol (P), floroglucinol (F), resorcinol (R) and vanillin (V) acquired with the isocratic elution of the system



Slika 2: HPLC kromatogram zmesi katehina (K), galne kisline (G), pirokatehola (P), floroglucinola (F), resorcinola (R) in vanilina (V) z gradientnim izpiranjem sistema

Fig. 2: HPLC chromatogram of the mixture of catechin (K), gallic acid (G), pyrocatechol (P), floroglucionol (F), resorcinol (R) and vanillin (V) acquired with the gradient elution of the system

in uporabljeni topili, spremenili pa smo elucijsko metodo. Odločili smo se za gradientno metodo, pri čemer smo sestavo mobilne faze spreminjali zvezno. Pred začetkom dela smo posneli t.i. »slepi profil« med celotno spremembo gradienta brez injiciranja vzorca. Gradientna elucijska metoda se je že pri prvih poskusih pokazala kot dobra metoda za ločitev med seboj zelo podobnih nizkomolekularnih fenolnih spojin (Slika 2).

Sistem topil acetonitril / voda / mravljinčna kislina (2 % HCOOH) z gradientno elucijo se je izkazal kot primeren za določitev in ločitev floroglucinola, galne kisline, resorcinola in vanilina. Prav tako nam je uspelo ločiti katehin in pirokatehol, ki sta imela pri izokratski eluciji sprva zelo podobne retencijske čase in so se njuni signali deloma prekrivali. Poudariti velja, da smo relativne retencije posameznih komponent regulirali tudi z dodatkom kisline mobilni fazi. V tabeli 3 so podani retencijski časi enostavnih fenolnih spojin in ka-

Preglednica 3: Zadrževalni časi posameznih fenolnih spojin po različnih elucijskih metodah tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)

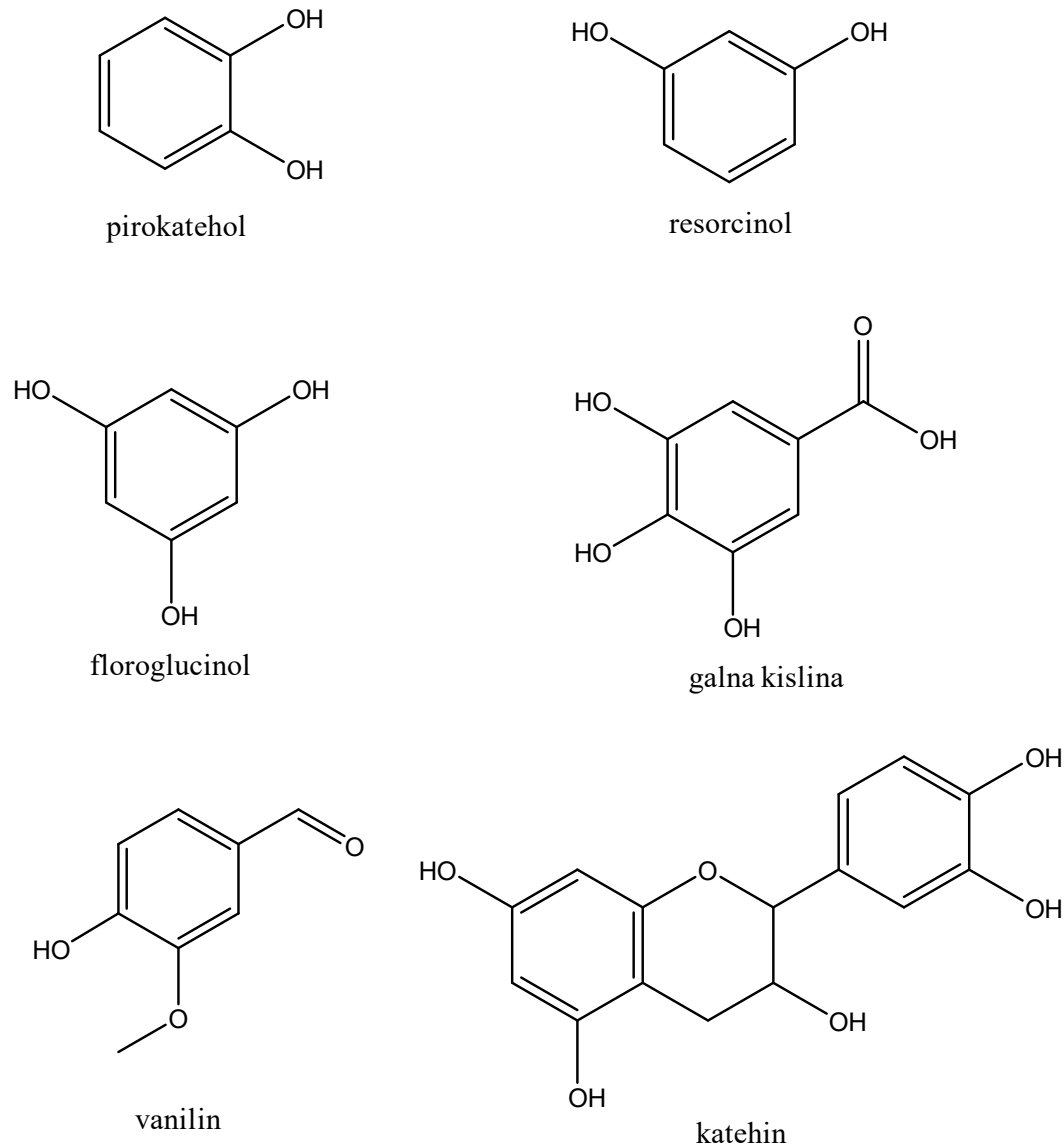
tehina za izokratsko in gradientno metodo v različnih mobilnih fazah in z različnimi gradientnimi elucijskimi razmerji. Koncentracija floroglucinola je bila pod mejo detekcije.

Treba je poudariti, da lahko na osnovi kemijske strukture preučevanih spojin okvirno tudi napovemo vrstni red eluiranih spojin. Floroglucinol in galna kislina, ki sta najbolj polarna, se eluirata prva, sledi ji resorcinol, z dvema *meta*-hidroksilnima skupinama, nato pirokatehol z dvema *orto*-hidroksilnima skupinama, sledi katehin in nazadnje kot najmanj polarna spojina vanilin (slika 3).

Analizirane spojine so v različnih količinah zastopane v tkivih rastlin in seveda tudi dreves. Floroglucinol, resorcinol in pirokatehol se v lesu ne pojavljajo v prosti obliki, pač pa se lahko sprostijo med razgradnjo lignina v različnih termokemičnih procesih. Vanilin je vsem dobro znana spojina prijetnega vonja. Je značilen

Table 3: Retention times of individual phenolic compounds according to different elution methods of high performance liquid chromatography (HPLC)

Vzorec / Sample	Retencijski čas / Retention time [min]	
	Izokratska elucija / Isocratic elution	Gradientna elucija / Gradient elution
Floroglucinol / Phloroglucinol	5,7	5,7
Galna kislina / Gallic acid	6,6	6,8
Resorcinol / Resorcinol	10,1	10,8
Katehin / Catechin	12,8	15,0
Pirokatehol / Pyrocatechol	12,3	13,4
Vanilin / Vanillin	18,1	21,5



Slika 3: Kemijska struktura enostavnih fenolov in katehina

fenolni aldehyd, ki ga najdemo v plodovih vanilije (npr. *Vanilla planifolia*). V preteklosti so sintetični vanilin pridobivali prav iz lignina. Galna kislina je osnovni gradnik skupine hidrolizirajočih taninov, ki se imenujejo galotanini, v nasprotju z elagitanini, kjer je osnovni gradnik elagna kislina. Katehin je flavonoid flavan-3-ol, ki je značilna spojina lesa in skorje številnih vrst (Hagerman, 2002, Harborne, 1989). Med drugim je zastopan v lesu bukve (Vek in sod., 2014, Vek in sod., 2013a, Vek in sod., 2013b) in je pomemben gradnik kondenziranih taninov.

Kvalitativna in kvantitativna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je moderna separacijska analitska tehnika, ki omogoča hitro in natančno analizo vzorcev. HPLC je ena izmed najbolj pogosto uporabljenih analitskih tehnik za preučevanje ekstraktivov lesa, saj ne zahteva zamudne predhodne obdelave vzorcev, ki je sicer nujna pri plinski kromatografiji

Fig. 3: Chemical structure of simple phenols and catechin

(Willför in sod., 2006). Pri tem se je treba zavedati, da je kromatografija »slepa« tehnika, z njo lahko dokažemo obstoj neke (neznane) spojine, ne moremo pa direktno ugotoviti, za katero spojino gre. Kadar želimo identificirati spojino, je treba retencijske čase, značilne za posamezno eluirano spojino, primerjati z retencijskimi časi znanih kromatografskih standardov. Identifikacija na osnovi retencijskih časov je zadostna tehnika pri ciljni analizi, pri ne-ciljni analizi pa je potrebna sklopitev HPLC-sistema s strukturno selektivnimi detektorji, npr. z masnim spektrometrom. Pri vsem tem je zelo pomembna ponovljivost kromatografskih parametrov. Brez nadaljnega drži, da HPLC-kromatografija omogoča analizo, identifikacijo in kvantitativno določitev spojin v naravnih ali sintetičnih produktih. Neizogiben del raziskav s HPLC je praviloma zamuden razvoj kromatografske metode, ki vključuje izbiro najprimernejše mobilne faze, optimiziranje razmerja med

topili, primerno gradientno razmerje in izbiro ustrezne kolone s primerno stacionarno fazo, študijo vpliva temperature na elucijo spojin, izbiro detekcijske valovne dolžine, čemur sledi izvedba preliminarnih raziskav z znanimi vzorci oziroma kromatografskimi standardi in seveda ponovno prilagajanje posameznih kromatografskih parametrov (Snyder in sod., 2010). Izbira stacionarne faze (polnitve kolone) in mobilne faze je najpomembnejši del separacijskega postopka pri HPLC. Izbira je v veliki meri empirična, pri tem pa so seveda v veliko pomoč tudi podatki iz literature.

Predstavljen HPLC-metoda ima prednost zaradi hitrosti in natančnosti analize, lažje kvantifikacije, zanesljivosti ločitve in detekcije velikega števila fenolnih komponent. Signali, ki jih dobimo, so med seboj lepo ločeni in ponovljivi. HPLC je primerna metoda za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje spojin tudi v drugih sistemih, ki se pojavljajo na širšem gozdarskem in lesarskem področju (Sandström in sod., 1996, Hofmann in sod., 2010).

4 SUMMARY

Wood is a complex chemical product of woody plants. It is composed of polymers that build cell walls and nonstructural compounds, which are usually located outside of the cell wall and are often referred to as extractives. They occur in small amounts in wood, but have an important influence on wood properties. The research work in the broader field of wood science needs to identify individual compounds, which build the wood or represent degradation products of various chemical reactions. One of the methods of choice is high performance liquid chromatography (HPLC), which enables separation of individual compounds and their identification as well as quantitative determination. HPLC is probably the most frequently used analytical technique for organic compounds, especially in the analysis of organic compounds in biological matrices, since no time-consuming pretreatment of the samples is needed. The aim of the present study was to develop efficient HPLC method for separation of some selected phenolic compounds such as gallic acid, pyrocatechol, phloroglucinol, resorcinol, vanillin and catechin, which are common to wood and bark extracts of various tree species. Further on, the aim was also to identify and quantitatively evaluate the separated compounds.

Separation of simple phenols and catechin was done by HPLC on reverse stationary phase. Separation was done on a C18 column (250 x 4.6 mm), size of stationary phase particles was 5 µm, and temperature of the column oven was set at 22°C. Mobile phase was a

mixture of acetonitrile (CH₃CN) and water (H₂O) with addition of formic acid (HCOOH). Sample was directly injected on to the column, whereas the flow rate was 1 mL min⁻¹. Detection was carried out using UV detector at 280 nm wavelength. For separation of simple phenols and catechin we initially used the isocratic elution method and thereafter gradient elution, in order to accelerate elution of compounds, which are attached to the stationary phase more strongly. The most appropriate developing mobile system for the separation of these organic compounds was acetonitrile – water solution with the gradient ratio from 2 to 25% of acetonitrile. The best separation of the six organic compounds was achieved using mobile phase with lower content of formic acid.

HPLC is an excellent method for identification and quantitative determination of compounds in wood and bark of trees and is suitable for analysis of other samples in the broad field of forestry-wood-paper chain. Unavoidable parts of such research is the time-consuming development of a separation method, which includes e.g. selection of a suitable mobile phase, optimization of amounts of solvents and a sample, gradient determination and selection of suitable column and stationary phase, influence of temperature on elution and selection of detection wavelength.

5 ZAHVALA

5 ACKNOWLEDGEMENTS

Prispevek je nastal s HPLC-opremo, nabavljeno v okviru raziskovalnega programa P4-0015 »Les in lignocelulozni kompoziti«, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije RS. Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost za finančno podporo programske skupine P4-0015-0481.

6 VIRI

6 REFERENCES

- Arsenault, J.C., McDonald, P.D. *Beginners guide to liquid chromatography*. Waters Corporation, Milford, USA, 2007.
- Dinwoodie J.M. 2000. *Timber: Its nature and behaviour*. Second edition. London, New York, E & FN spon: 257 str.
- Fengel D., Wegener G. 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin, New York, Walter de Gruyter: 613 str.
- Hagerman A.E. 2002. *Tannin chemistry*. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
- Harborne J.B. 1989. *Flavonoids. V: Natural products of woody plants I. Chemicals extraneous to the ligno-celulosic cell wall*. Rowe J.W. (ur.). New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 533-570
- Hofmann T., Retfalvi T., Albert L., Niemez P. 2010. *High-Performance Thin-Layer Chromatographic Assessment of Thermally Modified Wood*. JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC, 23, 3: 227-229

- Holmbom B. 1999. Extractives. V: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Sjöström E. Alén R. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 316
- Kai Y. 1991. Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry. Hon D.N.S. Shiraishi N. (ur.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 215-255
- Sandström M., Norborg M.A., Ericsson A. 1996. Applications of thin-layer chromatography to process control in the pulp and paper field. *Journal of Chromatography A*, 730, 1-2: 373-379
- Sjöström E. 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. 2nd ed. New York, Academic Press, Inc.: 293 str.
- Sjöström E., Alén R. 1999. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. Berlin-New York-London, Springer Verlag: 315 str.
- Snyder R.L., Kirkland J.J., W.J. D. 2010. *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken, New Jersey, Wiley: str.
- Umezawa T. 2000. Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry. Hon D.N.S. Shiraishi N. (ur.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 213-241
- Vek V., Oven P., Humar M. 2013a. Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. *Int Biodeter Biodegr*, 77, 0: 91-97
- Vek V., Oven P., Poljansek I. 2013b. Quantitative HPLC Analysis of Catechin in Wound-Associated Wood and Knots of Beech. *Drvna Industrija*, 64, 3: 231-238
- Vek V., Oven P., Ters T., Poljanšek I., Hinterstoisser B. (2014) Extractives of mechanically wounded wood and knots in beech. In *Holzforschung*, pp. 529.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton - London - New York, 2010.
- Willför S.M., Smeds A.I., Holmbom B.R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112, 1-2: 64-77
- Yusiasih R., Yoshimura T., Umezawa T., Imamura Y. 2003. Screening method for wood extractives: direct cellulose thin-layer chromatography plate. *Journal of Wood Science*, 49, 4: 377-380
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, Samozaložba: 154 str.

