

DOLOČITEV VSEBNOSTI FLAVONOIDOV V BUKOVINI S KOLORIMETRIČNO METODO

Determination of flavonoid content in beechwood by colorimetric method

Izvleček: Vsebnost flavonoidov v metanolnih ekstraktih lesnih tkiv mehansko poškodovane bukve (*Fagus sylvatica* L.) ter v bukovi in smrekovi grči smo proučevali kolorimetrično. Po dodatku reagenta $AlCl_3$ smo ekstraktom izmerili absorbanco pri 415 nm z UV-Vis spektrofotometrom. Rezultati spektrofotometrične raziskave so pokazali, da se deleži celokupnih flavonoidov v metanolnih ekstraktih različnih delov lesa bukve in grč med seboj razlikujejo. Visoka koncentracija celokupnih flavonoidov je bila značilna za ekstrakt reakcijske cone in bukove grče, relativno visok delež flavonoidov pa smo določili tudi v diskoloriranem lesu. V poranitvenem lesu, beljavi in smrekovi grči je bil delež celokupnih flavonoidov manjši. Kolorimetrična analiza, ki temelji na uporabi $AlCl_3$ kot barvnega reagenta, predstavlja primerno metodo za določevanje deleža celokupnih flavonoidov v različnih tipih lesa in grčah.

Ključne besede: bukev, smreka, metanolni ekstrakt, flavonoidi, UV-Vis spektrofotometrija, aluminijev klorid $AlCl_3$, kvercetin, reakcijska cona, beljava, diskoloriran les, poranitveni les, grča.

Abstract: Content of flavonoids was determined colorimetrically in methanol extracts of different types of beechwood tissues (*Fagus sylvatica* L.) and knots. After addition of $AlCl_3$ reagent, absorbances of extracts were measured at 415 nm by UV-Vis spectrophotometer. Results of spectrophotometric research revealed variability in total flavonoid contents among different categories of beechwood tissues, including beech and spruce knots. High amounts of total flavonoids were characteristic for reaction zone and beech knot extracts, while in the sapwood, wound-wood and spruce knot contents of flavonoids were lower. Furthermore, relative high concentration of total flavonoids was also determined for the red heart extract. Colorimetric analysis based on the aluminum chloride reagent represents a suitable method for determination of total flavonoid contents in wood and knots extracts.

Key words: beech, spruce, methanol extract, flavonoids, UV-Vis spectrophotometry, aluminum chloride $AlCl_3$, quercetin, reaction zone, sapwood, discolored wood, wound-wood, knot.

UVOD

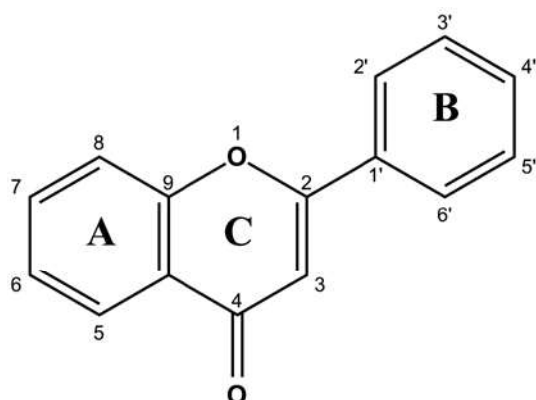
Rastline sintetizirajo na tisoče aromatskih spojin, ki vsebujejo po eno ali več fenolnih skupin in jih imenujemo fenolne spojine, rastlinski fenoli, polifenoli ali polifenolne spojine (Abram in Simčič, 1997). Flavonoidi so fenolne

snovi, ki imajo v molekuli 15 ogljikovih atomov urejenih v difenilpropansko ogrodje ($C_6 - C_3 - C_6$). Osnovno ogrodje flavonoidov je 2-fenilbenzopiron (Slika 1). Obroče v 2-fenilnilkromen-4-onski enoti označujemo z oznakami A, C in B.

V naravi se flavonoidi lahko pojavljajo kot samostojne spojine, pogostejše pa nastopajo kot 3-O-glikozidi. Sladkorne enote se lahko vežejo na C3 atom obroča C, na C5 ali C7 atom obroča A in redkeje tudi na obroč B (Abram in Simčič, 1997; Vermerris in Nicholson, 2006). Glikonsko enoto lahko predstavlja npr. glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza in tudi kompleksnejši oligo-

* 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

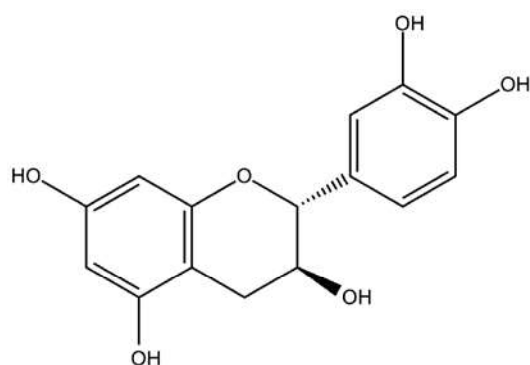


Slika 1. Osnovno strukturno formulo flavonoidov predstavlja 2-fenilkromen-4-on

saharidi, aglikonski del pa je lahko povezan tudi z amino skupinami, lipidi in terpenoidi (Fengel in Wegener, 1984; Kure, 2006; Vermerris in Nicholson, 2006).

Flavonoide lahko klasificiramo glede na stopnjo oksidacije C3 enote na 12 razredov, torej na flavone, flavonole, katehine (flavan-3-ole), flavanone, dihidroflavonole, proantocianidine ali levkoantocianidine (flavan-3,4-diole), antocianidine, izoflavonoide (3-fenilbenzopiran), neoflavone (4-fenilbenzopiran), halkone, dihidrokalkone in avrone (Abram in Simčič, 1997).

Flavonoidi predstavljajo zelo razširjeno skupino v polarnih topilih topnih spojin. Nekateri viri navajajo, da je identificiranih več kot 5000 flavonoidov (Abram in Simčič, 1997; Kai, 1991). Ker na antioksidacijsko sposobnost spojin vpliva položaj in razporeditev -OH skupin, predvsem tistih na B obroču, so vsi flavonoidi s 3',4'-dihidroksi ali 3',4',5'-trihidroksi skupinami dobri antioksidanti (Abram in Simčič, 1997), vključno s katehinom, ki je redna sestavina ekstraktivov številnih lesnih vrst (Choi in sod., 2001; Mantani in sod., 2001). V lesu zavirajo kolonizacijo tkiva z glivami in odvrčajo ksilofagne insekte, vplivajo na naravno odpornost in trajnost lesa ter so pogosto tiste fenolne spojine, ki dolo-



Slika 2. (+)-katehin

čajo barvo lesa (Fengel in Wegener, 1984; Kai, 1991; Koch in sod., 2003; Malterud in sod., 1985; Mantani in sod., 2001; Pietarinen in sod., 2006; Pohjamo in sod., 2003).

Pri kemijski analizi lesa se zaradi različnih raziskovalnih ciljev pogosto srečamo s problemom določitve vsebnosti določene snovi ali skupine spojin v preiskovanem vzorcu, kar se v primeru heterogene skupine molekul, kakršni so fenolni ekstraktivi, izkaže za resen problem. Za potrebe sumarne analize lesa (ang.: summative analysis), pogosto zadostuje že informacija o vsebnosti celokupnih fenolnih ekstraktivov v lesu, kar je mogoče določiti spektrofotometrično (Scalbert in sod., 1989; Umezawa, 2000; Vek in sod., 2010). Pogosto pa želimo dobiti tudi podatek o zastopnosti posameznih razredov fenolov v ekstrakcijski zmesi. Tudi za določitev vsebnosti celokupnih flavonoidov v rastlinskih tkivih je na voljo spektrofotometrična metoda, ki pa je bila v raziskavah lesa dokaj redko uporabljena (Brighente in sod., 2007; Diouf in sod., 2009; Quettier-Deleu in sod., 2000).

V pričujoči raziskavi smo določili vsebnost celokupnih flavonoidov v različnih kategorijah lesnih tkiv debela navadne bukve ter v smrekovi in bukovi grči z AlCl_3 kolorimetrično metodo.

MATERIAL IN METODA

V spektrofotometrično analizo smo vključili vzorčni kolut debela mehansko poškodovane bukve (*Fagus sylvatica* L.). Bukev z nekaj metrov dolgo mehansko poškodbo je bila posekana na jugozahodnem pobočju primestnega gozda Rožnik v Ljubljani.

Na kolutu smo na osnovi rastnih posebnosti označili mesta vzorčenja ter izžagali vzorce zdrave beljave (B), reakcijske cone (RC), rdečega srca (RS) in poranitvenega lesa (PL) tako, kot je opisano v Vek in sod. (2010). V raziskavo smo vključili tudi bazo žive veje bukve in smreke, kar bomo v nadaljevanju navajali kot bukovo (*Grča-B*) in smrekovo grčo (*Grča-S*). Homogenizacijo vzorcev različnih tipov lesnega tkiva in grč smo izvedli na rotacijskem mlinu *Retsch ZM200*, s čimer smo pridobili 0,5 mm lesno frakcijo.

Za ekstrakcijo in spektrofotometrično analizo smo uporabili kemikalije proizvajalcev *Sigma-Aldrich* oziroma *Fluka*.

Sledila je ekstrakcija flavonoidov s 70 % metanolom (aq) (*Sigma*, HPLC grade), pri čemer je razmerje vzorec/topilo (R) znašalo 1:10 (slika 3). Vzorce smo ob stalnem mešanju pri sobni temperaturi na večmestnem magnetnem mešalu ekstrahirali 6 ur (Albert in sod., 2003). Ekstrate smo nato prefiltrirali z uporabo presesalne buče in Büchnerjevega lija (*Whatman GF/C*) in jih do pričetka spektrofotometrične analize hranili pri temperaturi 4 °C.

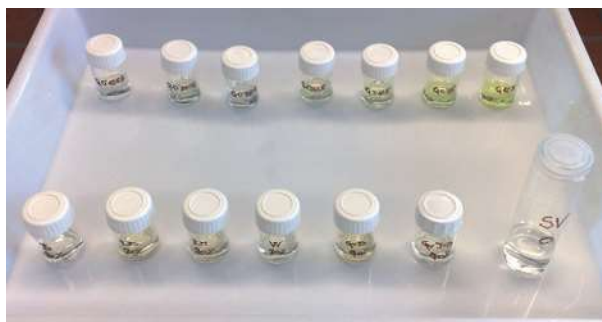


Slika 3. Ekstrakcija s 70 % metanolom (aq) na večmestnem magnetnem mešalu

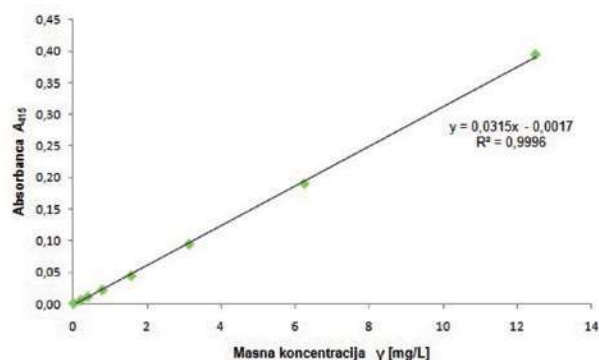
Vsebnost celokupnih flavonoidov v ekstraktih mehansko poškodovane bukve ter ekstraktih grč bukve in smreke smo določili spektrofotometrično po $AlCl_3$ metodi, ki jo opisuje Diouf s sodelavci (2009) ter temelji na uporabi aluminijevega klorida kot barvnega reagenta (Lamaison in Carnat, 1990; Quettier-Deleu in sod., 2000). Predhodno smo pripravili 2 % metanolno raztopino aluminijevega klorida (*Fluka*, $AlCl_3 \times 6H_2O$, *purum p.a.*) ter standardne raztopine kvercetina (*Sigma*, anhydrous) z masnimi koncentracijami 12,50; 6,250; 3,125; 1,562; 0,7812; 0,3906; 0,1953 mg/L. Slednje so služile za formiranje 7-točkovne umeritvene krivulje.

Pred spektrofotometričnimi meritvami smo k 2 mL metanolnega ekstrakta tkiv in v raztopine kvercetina dodali po 2 mL $AlCl_3$ barvnega reagenta. Hkrati smo pripravili tudi slepi vzorec (ang.: method blank), pri čemer smo 70 % metanolu (aq) dodali enak alikvot 2 % metanolne raztopine $AlCl_3$. Tako pripravljene vzorce smo dobro premešali, nakar je sledila 1-urna inkubacija pri sobni temperaturi (slika 4) (Diouf in sod., 2009).

Po inkubaciji smo z UV-Vis spektrofotometrom *Perkin-Elmer Lambda 2* pomerili absorbance vzorcev in standardnih raztopin kvercetina proti referenci, torej 70 % metanolu (aq), pri 415 nm, kot navaja Brighente s sodelavci (2007).



Slika 4. Metanolni ekstrakti lesa bukve in grč po dodatku $AlCl_3$ barvnega reagenta

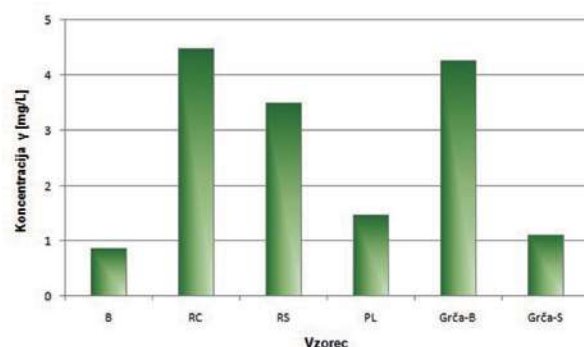


Slika 5. Umeritvena krivulja za kvercetin z enačbo premice in vrednostjo koeficienta determinacije R^2 . Absorbanca je bila merjena pri valovni dolžini 415 nm.

Delež celokupnih flavonoidov v lesnih tkivih smo izračunali na osnovi absorbanc A_{415} z rešitvijo premice regresijskega modela umeritvene krivulje za kvercetin (slika 5). Končne rezultate smo izrazili v ekvivalentih masnih koncentracij kvercetina [mg/L].

REZULTATI IN RAZPRAVA

Reagent $AlCl_3$ se pri kolorimetrični metodi za določanje flavonoidov uporablja zato, ker aluminijev klorid tvori kislinsko stabilen kompleks s C4 keto skupino ter C3 ali C5 hidroksilno skupino flavonoidov (Bohm, 1998). Poleg tega aluminijev klorid tvori kislinsko labilne komplekse z orto-hidroksilno skupino na A ali B-obroču flavonoidov (Bohm, 1998). Dodatek vodne raztopine HCl zato povzroči razpad aluminijevih kompleksov na orto položajih obroča A in B. Nastanek in razpad aluminijevih kompleksov je povezan s premikom spektralnih pasov, kar je mogoče zabeležiti z UV-Vis spektrofotometrom. Ker v našem poskusu kisline nismo dodali, lahko domnevamo, da smo z meritvami pridobili vpogled v vsebnost celokupnih flavonoidov v



Slika 6. Koncentracija celokupnih flavonoidov v ekstraktih lesa bukve (B = zdrava beljava, RC = reakcijska cona, RS = rdeče srce, PL = poranitveni les) ter bukovi (Grča-B) in smrekovi (Grča-S) grči

ekstraktih lesa. Vsebnost celokupnih flavonoidov v metanolnih ekstraktih različnih lesnih tkiv mehansko poškodovane bukve ter v ekstraktih bukove in smrekove grče prikazuje slika 6.

Koncentracija celokupnih flavonoidov je bila najvišja v metanolnih ekstraktih reakcijske cone in bukove grče (4,5 in 4,3 mg/mL). Relativno visoko koncentracijo flavonoidov smo izmerili tudi v ekstraktu rdečega srca (3,5 mg/L). Nasprotno, nižje koncentracije flavonoidov smo določili v ekstraktih beljave in poranitvenega lesa ter smrekove grče (0,86, 1,5 oz. 1,1 mg/L).

Delež flavonoidov je bil najvišji v ekstraktu reakcijske cone, kar sovпада s kompartmentalizacijsko funkcijo teh tkiv, v katerih se očitno kopičijo bioaktivni flavonoidi, kot sta npr. taksifolin in (+)-katehin (slika 2). Slednje je mogoče pojasniti z odzivom živih parenhimskih celic na delovanje biotskih in abiotskih dejavnikov v poškodovanih tkivih (Schwarze in Baum, 2000; Shain, 1967).

Visok delež flavonoidov v diskoloriranem lesu proučevane bukve lahko pripišemo sodelovanju teh spojin pri formiranju barvnih substanc oziroma barve v centralnem delu debla (Albert in sod., 2003; Torelli, 2001). Dokazano je, da imata pri formiranju barve jedrovine in diskoloriranega lesa pri določenih drevesnih vrstah pomembno vlogo dihidrokvercetin in (+)-katehin (Dellus in sod., 1997; Mayer in sod., 2006). Flavan-3-oli oziroma katehini imajo namreč pomembno funkcijo tudi pri obrambnih odzivih rastlin na oksidativni stres in pri bukvi nastopajo v fazi formacije diskoloracije (Hofmann in sod., 2004).

Najnižjo koncentracijo flavonoidov smo določili v ekstraktu beljave. Nekoliko višji delež flavonoidov kot vzorec beljave je vseboval ekstrakt poranitvenega lesa, kar dokazuje, da se flavonoidi sintetizirajo že v beljavi. Prav pojava flavonoidov v beljavi bukve bi bil lahko razlog za relativno dober kompartmentalizacijski potencial te drevesne vrste.

Izredno visoka koncentracija flavonoidov je značilna tudi za bukovo grčo. Očitno je, da se že na bazi zdravih vej sintetizira visoka koncentracija snovi, ki imajo v drevesu zaščitno funkcijo. Pri listavcih in iglavcih se odziv ksilemskih tkiv na bazi veje po odlomu ali odmrtnosti veje nekoliko razlikuje. Pri listavcih se razvije zaščitna cona, ki zatesni eksponirano mesto, pri iglavcih pa se baza veje (grča) prepoji z oleinsko smolo, zaščitna cona pa izostane. Menimo, da ima povečana vsebnost flavonoidov v bukovi grči pasivno zaščitno vlogo, ki je v tkivu verjetno prisotna od določenega leta dalje. Nasprotno smo ugotovili za ekstrakt smrekove grče, saj je ta vseboval znatno manjši delež flavonoidov, ki je primerljiv koncentraciji flavonoidov v beljavi. Kljub temu, da grče iglavcev predstavljajo bogat vir bioaktivnih polifenolov, (Willför in sod., 2004a; Willför

in sod., 2004b), pa so spojine flavonoidnega značaja v teh tkivih manj pogoste.

Rezultati preliminarne raziskave potrjujejo primernost kolorimetrične analize, ki temelji na uporabi $AlCl_3$ barvnega reagenta, za spektrofotometrično določevanje deleža celokupnih flavonoidov v lesnih tkivih. Rezultati analize kažejo, da je vsebnost flavonoidov večja v tkivih, ki imajo v drevesu bodisi pasivno zaščitno funkcijo (baza zdravih vej - grče) in v tkivih (reakcijske cone), ki nastanejo kot aktiven obrambni odziv živih parenhimskih celic na neugodne posledice poškodovanja.

ZAHVALA

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

VIRI

1. **Abram V., Simčič M. (1997)** Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48, 573-589
2. **Albert L., Hofmann T., Nemeth Z. I., Retfalvi T., Koloszar J., Varga S., Csepregi I. (2003)** Radial variation of total phenol content in beech (*Fagus sylvatica* L.) wood with and without red heartwood. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 61, 3: 227-230
3. **Bohm B. A. (1998)** Introduction to Flavonoids. Harwood Academic Publishers, Netherlands, 503
4. **Brighente I. M. C., Dias M., Verdi L. G., Pizzolatti M. G. (2007)** Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45, 2: 156-161
5. **Choi J. H., Kim H. S., Jung M. J., Choi J. S. (2001)** (+)-Catechin, an antioxidant principle from the leaves of *Pinus densiflora* that acts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Nat. Prod. Sci.*, 7: 1-4
6. **Dellus V., Mila I., Scalbert A., Menard C., Michon V., Herve Du Penhoat C. L. M. (1997)** Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochemistry*, 45, 8: 1573-1578
7. **Diouf P. N., Stevanovic T., Cloutier A. (2009)** Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. *Wood Science and Technology*, 43, 5-6: 457-470
8. **Fengel D., Wegener G. (1984)** Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. W. de Gruyter, Berlin-New York, 613
9. **Hofmann T., Albert L., Retfalvi T. (2004)** Quantitative TLC Analysis of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin from *Fagus sylvatica* L. with and without Red Heartwood. *Jpc-Journal of Planar Chromatography*, 17, 350-354
10. **Kai Y. (1991)** Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry. Hon D.N.S. in Shiraishi N. (Ur.), Marcel Dekker, Inc., New York, 215-255
11. **Koch G., Puls J., Bauch J. (2003)** Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwood (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung*, 57, 4: 339-345
12. **Kure S. (2006)** Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 69
13. **Lamaison J. L., Carnat A. (1990)** Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activités antioxydantes chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 65, 315-320
14. **Malterud K. E., Bremnes T. E., Faegri A., Moe T., Dugstad E. K.**

- S., Anthonsen T., Henriksen L. M. (1985)** Flavonoids from the Wood of *Salix caprea* as Inhibitors of Wood-Destroying Fungi. *Journal of Natural Products*, 48, 4: 559-563
15. **Mantani N., Imanishi N., Kawamata H., Terasawa, K., Ochiai H. (2001)** Inhibitory effect of (+)-catechin on the growth of influenza A/PR/8 virus in MDCK cells. *Planta Medica*, 67, 3: 240-243
 16. **Mayer I., Koch G., Pulse J. (2006)** Topochemical investigations of wood extractives and their influence on colour changes in American black cherry (*Prunus serotina* Borkh.). *Holzforschung*, 60, 6: 589-594
 17. **Pietarinen S., Willför S., Ahotupa M., Hemming J., Holmbom B. (2006)** Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*, 52, 5: 436-444
 18. **Pohjamo S. P., Hemming J. E., Willför S. M., Reunanen M. H. T., Holmbom B. R. (2003)** Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*, 63, 2: 165-169
 19. **Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.-C., Bailleul F., Trotin F. (2000)** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 1-2: 35-42
 20. **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
 21. **Schwarze F. W. M. R., Baum S. (2000)** Mechanisms of reaction zone penetration by fungi in wood of beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.*, 146, 129-140
 22. **Shain L. (1967)** Resistance of Sapwood in Stems of Loblolly Pine to Infection by *Fomes Annosus*. *Phytopathology*, 57, 1034-1045
 23. **Torelli N. (2001)** Odziv drevja na globoke in površinske poškodbe na primeru bukve (*Fagus sylvatica* L.) s poudarkom na nastanku in ekologiji ranitvenega lesa ("rdeče srce"). *Gozdarski vestnik*, 59, 2: 85 - 94
 24. **Umezawa T. (2000)** Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry. Hon D.N.S. in Shiraishi N. (Ur.), Marcel Dekker, Inc., New York, 213-241
 25. **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
 26. **Vermerris W., Nicholson R. (2006)** Phenolic Compound Biochemistry. Springer Science+Business Media B.V., Netherlands, 276
 27. **Willför S., Nisula L., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B. (2004a)** Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species. *Holzforschung*, 58, 6: 650-659
 28. **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. *Holzforschung*, 58, 4: 345-354