

# VSEBNOST EKSTRAKTIVOV V SKORJI IN LESU ROBINIJE (*ROBINIA PSEUDOACACIA* L.)

## CONTENT OF EXTRACTIVES IN BARK AND WOOD OF BLACK LOCUST (*ROBINIA PSEUDOACACIA* L.)

Viljem VEK<sup>1</sup>, Blaž VIVOD<sup>2</sup>, Ida POLJANŠEK<sup>3</sup>, Primož OVEN<sup>4</sup>

(1) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, viljem.vek@bf.uni-lj.si

(2) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, blaz.vivod@bf.uni-lj.si

(3) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, ida.poljansek@bf.uni-lj.si

(4) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, primoz.oven@bf.uni-lj.si

### IZVLEČEK

Raziskali smo vsebnost in sestavo ekstraktivov v lesnih tkivih in skorji robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Vzorce njenega lesa in skorje smo ekstrahirali v aparatu Soxhlet z acetonom. Acetonske ekstrakte smo preiskali gravimetrično in s tem izmerili vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov. Z UV-Vis spektrofotometrom smo kolorimetrično izmerili vsebnost celokupnih fenolov. Ekstrakte lesa in skorje robinije smo nato detajlno preiskali s sistemom za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). S to tehniko smo v ekstraktih identificirali in kvantitativno ovrednotili dihidrorobinetin. Največje vsebnosti celokupnih hidrofilnih ekstraktivov, totalnih fenolov in dihidrorobinetina smo izmerili v vzorcih jedrovine. Značilno manj ekstraktivov je bilo v vzorcih beljave in skorje. Aksialne variabilnosti v vsebnosti topnih komponent za les in skorjo robinije nismo dognali. Ugotovili smo, da je jedrovina robinije bogat vir fenolnih ekstraktivov.

**Ključne besede:** robinija, ekstraktivi, HPLC, dragocene spojine, biorafinarije

### ABSTRACT

The content and composition of extractives in the wood and bark tissue of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) were investigated. Wood and bark samples were extracted using a Soxhlet apparatus with acetone. The extracts were gravimetrically examined to measure total hydrophilic extractive content. Total phenolic content was measured colorimetrically with a UV-Vis spectrophotometer. The wood and bark extracts were further investigated using high-pressure liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify dihydrorobinetin in the extracts. The contents of total hydrophilic extractives, total phenols and dihydrorobinetin were higher in heartwood than in the sapwood and bark. No relationship was found between the height at which the samples were taken from the stem and the content of soluble components in the wood and bark. The heartwood of black locust represents a rich potential source of phenolic extractives.

**Key words:** black locust, extractives, HPLC, value-added compounds, biorefinery

GDK 813.2+81+811.7:176.1Robinia pseudoacacia L.(045)=163.6  
DOI 10.20315/ASetL.119.2

Prispelo / Received: 24. 4. 2019  
Sprejeto / Accepted: 16. 6. 2019

## 1 UVOD

### 1 INTRODUCTION

Les in skorja sta tkivna polimerna kompozita, ki ju v večji meri sestavljajo celuloza, lignin in hemiceluloze. Redna sestavina skorje je tudi suberin, ki pa se v lesu pojavlja samo v travmatskih tkivih (Oven, 1998). Delež strukturnih gradnikov je v lesu od 95 % do 98 % (Holmbom, 2011). Poleg strukturnih gradnikov les in skorja vsebujeta tudi nestrukturne komponente (Fengel in Wegener, 1989; Holmbom, 2011), ki jih je možno iz rastlinskih tkiv pridobiti na razmeroma enostaven način, s postopkom ekstrakcije, zato jih mnogokrat imenujemo kar ekstraktivi. Ekstraktive lahko delimo na osnovi topnosti v različno polarnih topilih. Tako ločimo hidrofilne ekstraktive, torej spojine, topne v polarnih topilih,

kot sta npr. voda ali aceton, ter na lipofilne ekstraktive, ki so topni v nepolarnih organskih topilih, npr. v toluenu in n-heksanu (Willför in sod., 2006; Jansson in Nilvebrant, 2009; Vek in sod., 2017). Predstavniki lipofilnih ekstraktivov v ksilemskih in floemskih tkivih so npr. nasičene in nenasičene maščobne kisline, triacilgliceroli, voski, steroli in terpenoidi (Holmbom, 1999; Zule in Može, 2003; Vek in sod., 2014). Hidrofilni ekstraktivi pa so npr. lesni sladkorji (mono- in oligosaharidi), fenolne kisline, flavonoidi, stilbeni, kinoni, lignani in tanini (Willför in sod., 2004). Za ekstrakcijo lesa in skorje lahko uporabljamo različna topila, pri čemer pa je izbira topila odvisna od ciljnih spojin, ki jih želimo pridobiti z ekstrakcijo. V preteklosti se je za ekstrakcijo lesnih tkiv največ uporabljalo aceton, ki velja za izre-

dno učinkovito ekstrakcijsko topilo in zaradi tega tudi za referenčno topilo (Holmbom, 1999; Willför in sod., 2006).

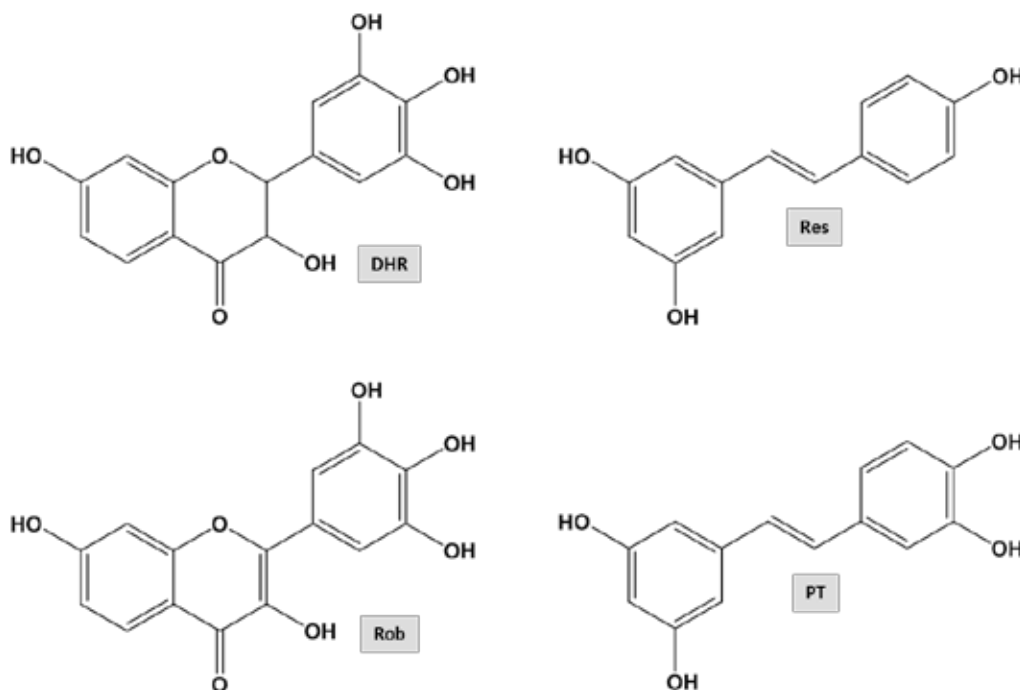
Vsebnost, sestava in delež ekstraktivov so v drevesu izredno variabilni in praviloma kažejo na fiziološko funkcijo drevesnih tkiv. Za večino iglavcev in listavcev je največji delež ekstraktivov značilen za grče, sledi jedrovina, najmanj pa jih je v beljavi (Kai, 1991; Yanchuk in sod., 1988; Vek, 2013; Vek in sod., 2014). Vsebnost ekstraktivov je nadalje odvisna od drevesne vrste, geografske lege, rastišča, klimatskih razmer, starosti drevesa oziroma tkiv, letnega časa ter stanja drevesa (Panshin in De Zeeuw, 1980; Fengel in Wegener, 1989; Kai, 1991; Höll, 2000; Vek in sod., 2014). Izredno zanimiva skupina ekstraktivov so polifenoli, ki imajo v lesu in skorji predvsem zaščitno in obrabno funkcijo (Oven in sod., 2010; Vek in sod., 2013a), v izolirani obliki pa izkazujejo širok spekter bioaktivnosti, saj delujejo fungicidno in antibakterijsko, antioksidativno, protivnetno, za nekatere spojine pa je dokazano, da zavirajo rast tumorskih celic (Dixon in sod., 2005; Valimaa in sod., 2007; Plumed-Ferrer in sod., 2013; Tavčar Benkovič in sod., 2014). Ekstraktivi lesa in skorje pomembno vplivajo na številne lastnosti lesa, med drugim tudi na barvo, higroskopsnost, dimenzijsko stabilnost in naravno odpornost (Rowe, 1989; Torelli in sod., 2006).

Drevesnih vrst z zelo odpornim oziroma naravno obstojnim lesom je v Evropi relativno malo (Dünisch in sod., 2010), mednje pa zagotovo sodi robinija (*Robinia pseudoacacia* L.) (Magel in sod., 1991; Rademacher in

sod., 2016). Po standardu EN 350-2 (1994) les robinije uvrščamo v najvišji odpornostni razred. Robinija je tujerodna drevesna vrsta, ki dobro uspeva predvsem na Madžarskem, Nemčiji ter na Slovaškem in Poljskem (Rademacher in sod., 2016; Vítková in sod., 2017), pri nas pa je najpogostejša v sredozemskem in panonskem svetu ter toplih predelih dinarskega sveta (Brus, 2005).

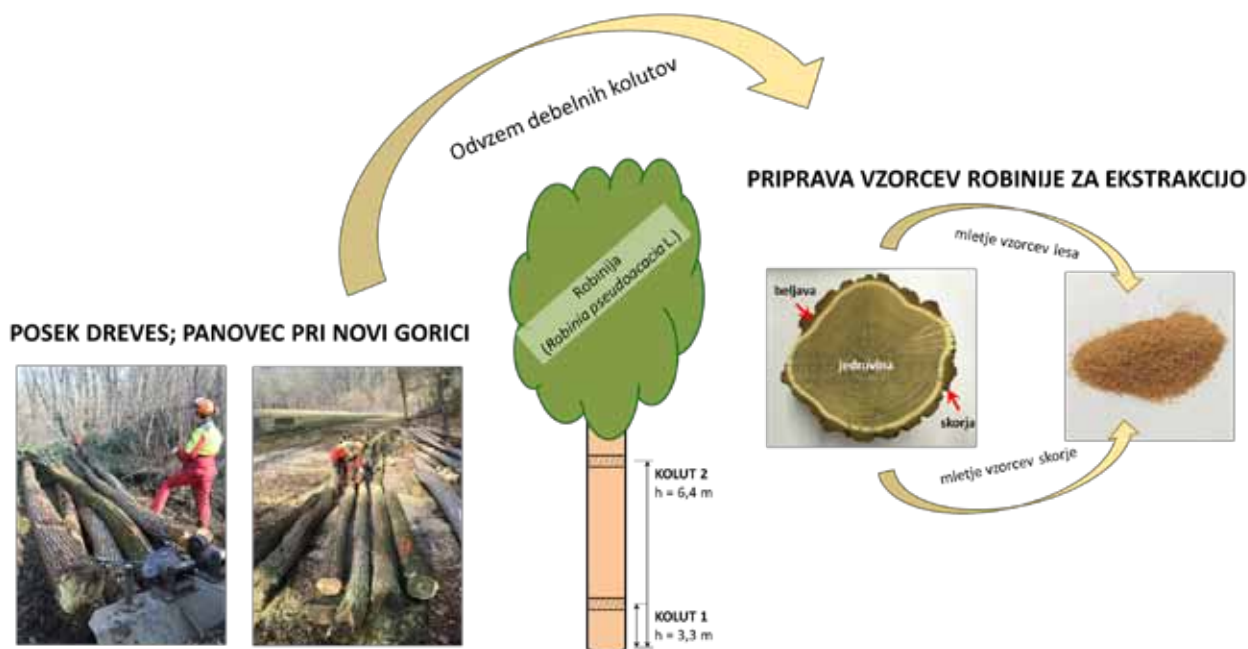
Visoko naravno odpornost lesa robinije literatura pojasnjuje z vsebnostjo in bioaktivno funkcijo fenolnih ekstraktivov (Sergent in sod., 2014; Rademacher in sod., 2016). Kot poročajo Magel in sod. (1994), so glavne spojine v ekstraktih lesa robinije flavanonol dihidrorobinetin, flavonol robinetin ter derivati hidroksicimetne kisline (slika 1). V lesu robinije se flavonoidi pojavljajo večinoma v prosti obliki, kot aglikoni. Poročila številnih raziskovalnih skupin, tudi rezultati naših preliminarnih raziskav, kažejo, da je dominantna spojina ekstraktov lesa robinije dihidrorobinetin (Magel in sod., 1994; Vek in sod., 2019b). Les robinije poleg omenjenih fenolov vsebuje tudi resveratrol in piceatanol (slika 1) (Sergent in sod., 2014), ki delujeta antimikrobno (Piotrowska in sod., 2012; Plumed-Ferrer in sod., 2013). Adultna jedrovina naj bi vsebovala več piceatnola, kot ga vsebujejo tkiva japonskega dresnika, ki na splošno velja kot bogat vir stilbenov (Sergent in sod., 2014).

Vsebnost in sestava ekstraktivov v lesu robinije iz slovenskih rastišč doslej še ni bila preiskovana, zato smo v tej študiji podrobno preučevali kemijsko sestavo ekstraktov skorje in lesa robinije (*Robinia pseudo-*



**Slika 1:** Kemijske strukture dihidrorobinetina (DHR), resveratrola (Res), robinetina (Rob) in piceatnola (PT)

**Fig. 1:** Chemical structures of dihydrorobinetin (DHR), resveratrol (Res), robinetin (Rob) and piceatannol (PT)



**Slika 2:** Shematski prikaz vzorčenja dreves robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) in priprave materiala za ekstrakcijo

**Fig. 2:** Schematic presentation of the sampling of black locust trees (*Robinia pseudoacacia* L.) and preparation of the material for extraction

*acacia* L.) iz primestnega gozda Nove Gorice. Cilji naše študije so bili: (a) ekstrahirati les in skorjo robinije z napravo Soxhlet, (b) gravimetrično ovrednotiti delež celokupnih ekstraktivov, (c) izmeriti vsebnost celokupnih fenolov ter (d) izmeriti vsebnost dihidrorobinetina v skorji in lesu.

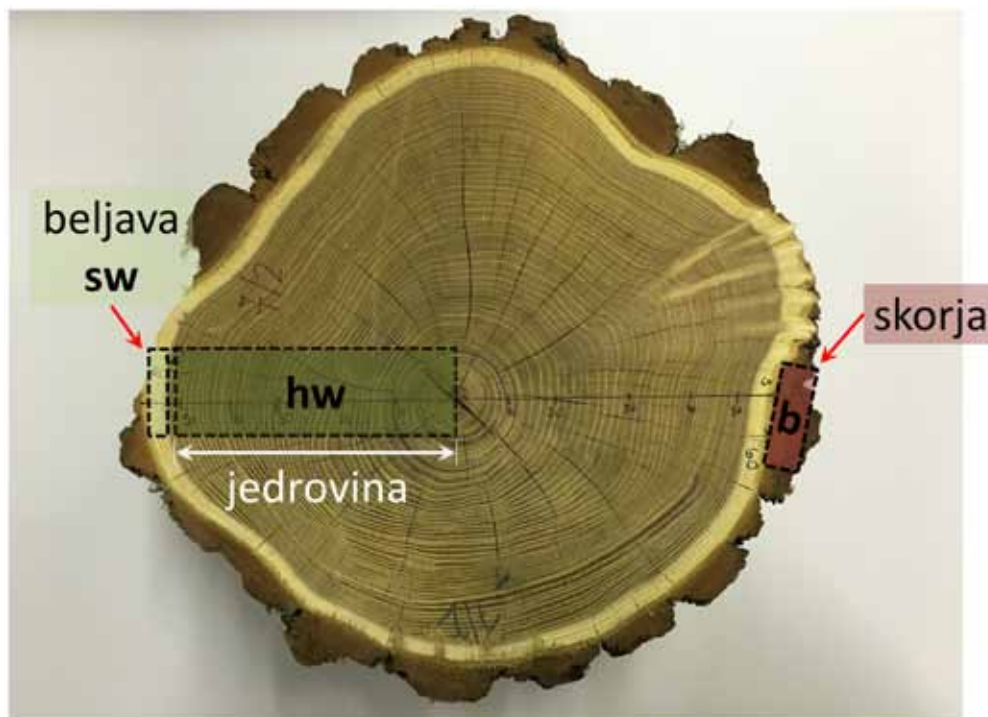
## 2 MATERIAL IN METODE

### 2 MATERIAL AND METHODS

#### 2.1 Material

#### 2.1 Material

Raziskavo smo zasnovali na treh adultnih drevesih robinije (*Robinia pseudoacacia* L.), ki smo jih pridobi-



**Slika 3:** Shema vzorčenja na kolutu debla navadne robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Koluti so bili odvzeti na 3,3 m in 6,4 m. sw, beljava; hw, jedrovina, b, skorja.

**Fig. 3:** Scheme of sampling on a stem disc of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Discs were taken at 3.3 m and 6.4 m. sw, sapwood; hw, heartwood; b, bark.

li v primestnem gozdu Panovec pri Novi Gorici (Vek, 2017). Iz vsakega drevesa smo izžagali dva vzorčna koluta, enega na višinah 3,30 m, drugega pa na 6,40 m (slika 2). Kolute smo prepeljali na Oddelek za lesarstvo, prešteli število branik in s tem ocenili starost kolotov in jih nato zračno posušili (slika 3).

Potem smo na vseh kolutih označili mesta odvzema vzorcev. Iz vsakega koluta smo odvzeli en vzorec skorje (b), en vzorec beljave (sw) in več vzorcev jedrovine (hw) v radialnem nizu v centripetalni smeri proti strženu. Vzorce lesa, ki smo jih dobili z razrezom kolotov, smo sušili prek noči pri 50 °C in jih nato dezintegrirali z laboratorijskim rezalnim mlinom Retsch SM 2000. Pri tem smo uporabili sito z odprtiniami s premerom 1 mm. Pomlete vzorce lesa smo nato hranili v zaprtih polipropilenskih prahovkah v temnem in hladnem prostoru.

## 2.2 Ekstrakcija

### 2.2 Extraction

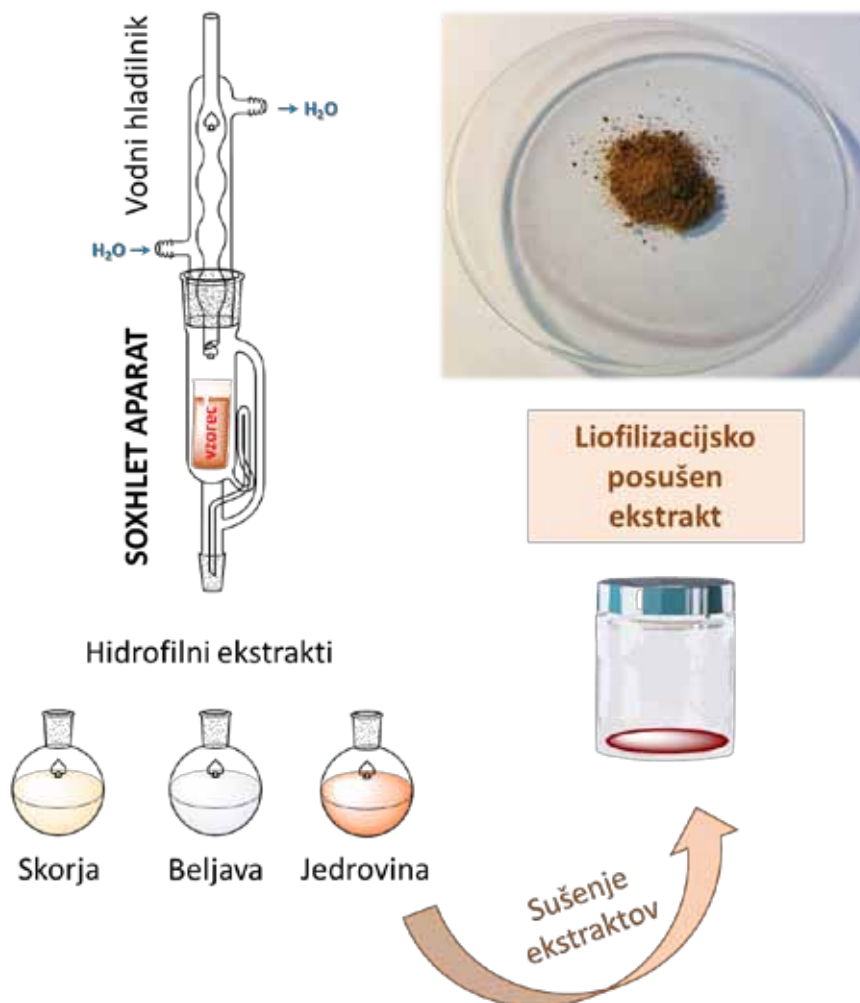
Prah lesa in skorje smo pred ekstrakcijo liofilizacijsko sušili pri 0,045 mbar in -85 °C v liofilizatorju Christ

Alpha 1-4 LD. Ekstrakcija vzorcev lesa je potekala v aparatu Soxhlet (slika 4). Za ekstrakcijo skorje in lesa robinije smo uporabili polarno topilo, mešanico acetona in vode v volumskem razmerju 9:1 (v/v). V celulozne tulce smo natehtali 2,5 g absolutno suhega vzorca (dw). Ekstrakcija je potekala 6 ur pri temperaturi 110 °C. En masni delež vzorca smo ekstrahirali s stotimi volumskimi deleži topila, torej je bilo razmerje vzorec-topilo 1:100 (w/v) (Vek in sod., 2019b).

## 2.3 Gravimetrična analiza celokupnih hidrofilnih ekstraktivov

### 2.3 Gravimetric analysis of total hydrophilic extractives

Vsebnost oziroma delež celokupnih hidrofilnih ekstraktov v ekstraktih navadne robinije (*R. pseudoacacia*) smo določili gravimetrično. Topilo smo evaporirali oziroma ekstrakt posušili do suhega ostanka. Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v vzorcih robinije smo izrazili v deležih in v miligramih glede na gram suhega lesa (% , mg/g dw) (Vek in sod., 2014).



**Slika 4:** Shematski prikaz procesa ekstrakcije vzorcev robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) z aparatom Soxhlet

**Fig. 4:** Schematic presentation of the extraction process of black locust samples (*Robinia pseudoacacia* L.) with a Soxhlet apparatus



## 2.4 Spektrofotometrična analiza celokupnih fenolov

### 2.4 Spectrophotometric analysis of total phenols

Vsebnost celokupnih fenolov v skorji in lesu robinije (*R. pseudoacacia*) smo izmerili kolorimetrično s Perkin Elmer spektrofotometrom Lambda (UV-Vis) po metodologiji, ki je opisana v Vek in sod. (2013b). Referenčna spojina je bila galna kislina. Ekstraktom in raztopinam galne kisline smo dodali z vodo redčeni Folin-Ciocalteu fenolni reagent in vodno raztopino natrijevega karbonata (7,5 g/l). Reakcijske zmesi smo inkubirali 120 min ter jim nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Semi-kvantitativno vrednotenje je potekalo z enačbo premice umeritvene krivulje, ki smo jo definirali z merjenjem absorbanco vodnih raztopin galne kisline (GA) s koncentracijami od 1 mg/l do 500 mg/l. Linearnost modela za napovedovanje vsebnosti celokupnih fenolov smo potrdili s koeficientom determinacije ( $R^2$ ), ki je bil  $> 0,99$ . Vsebnost celokupnih fenolov v skorji in lesu smo izrazili kot miligramske ekvivalente galne kisline (GAE) na gram suhega lesa (mg GAE/g dw) (Vek in sod., 2013b).

## 2.5 Kromatografska analiza vsebnosti dihidro-robinetina

### 2.5 Chromatographic analysis of dihydrorobinetin

Natančno kvalitativno in kvantitativno vrednotenje ekstraktov skorje in lesa robinije (*R. pseudoacacia*) je

potekalo na modularnem sistemu za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Accela HPLC, Thermo Fischer Scientific) (slika 5). Topilo ekstraktov smo uparili v vakuumski komori pri 10 kPa, suhe ekstrakte pa smo nato redčili z metanolom analitske čistosti. Ekstrakte skorje in lesa smo prefiltrirali skozi poliamidne filtre (Chromafil, 0,22  $\mu\text{m}$ ) v temne 1,5 ml vialne. Kromatografska ločba ekstraktivov je potekala na Thermo Accucore oktadecilsilil (ODS) koloni, kolona je bila termostatirana na 30 °C. Za mobilno fazo smo uporabili metanol (topilo A) in vodo (topilo B), topila sta vsebovali 0,1 % mravljinčne kisline. Za ločbo dihidrorobinetina (DHR) smo uporabili 20-minutni gradient od 5 do 95 % topila A, pri čemer je pretok mobilne faze znašal 1 ml/min. Dihidrorobinetin v ekstraktih smo ugotavljali s fotodiodnim detektorjem (PDA) pri 280 nm, snemali smo tudi spekter v območju od 200 nm do 400 nm.

Identifikacijo vrhov smo opravili na osnovi primerjave retencijskih časov in UV spektrov ločenih komponent s časi in spektri raztopin kromatografskega standarda, torej dihidrorobinetina v »HPLC« čistosti ( $\geq 95\%$ ) (slika 1). Za kvalitativno vrednotenje ekstraktov skorje in lesa smo uporabili tudi HPLC standard za robinetin in piceatanol (Sigma Aldrich) (slika 1). Za DHR smo napravili kalibracijo. Kvantitativna analiza je temeljila na primerjavi površin vrhov ločenega DHR v ekstraktu s površinami vrhov različno koncentriranega standarda DHR. Za določitev kalibracijske premice



**Slika 5:** Sistem Accela za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, Thermo Fischer Scientific) na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete

**Fig. 5:** Accela system for high performance liquid chromatography (HPLC, Thermo Fischer Scientific) at the Department of Wood Science and Technology of the Biotechnical Faculty

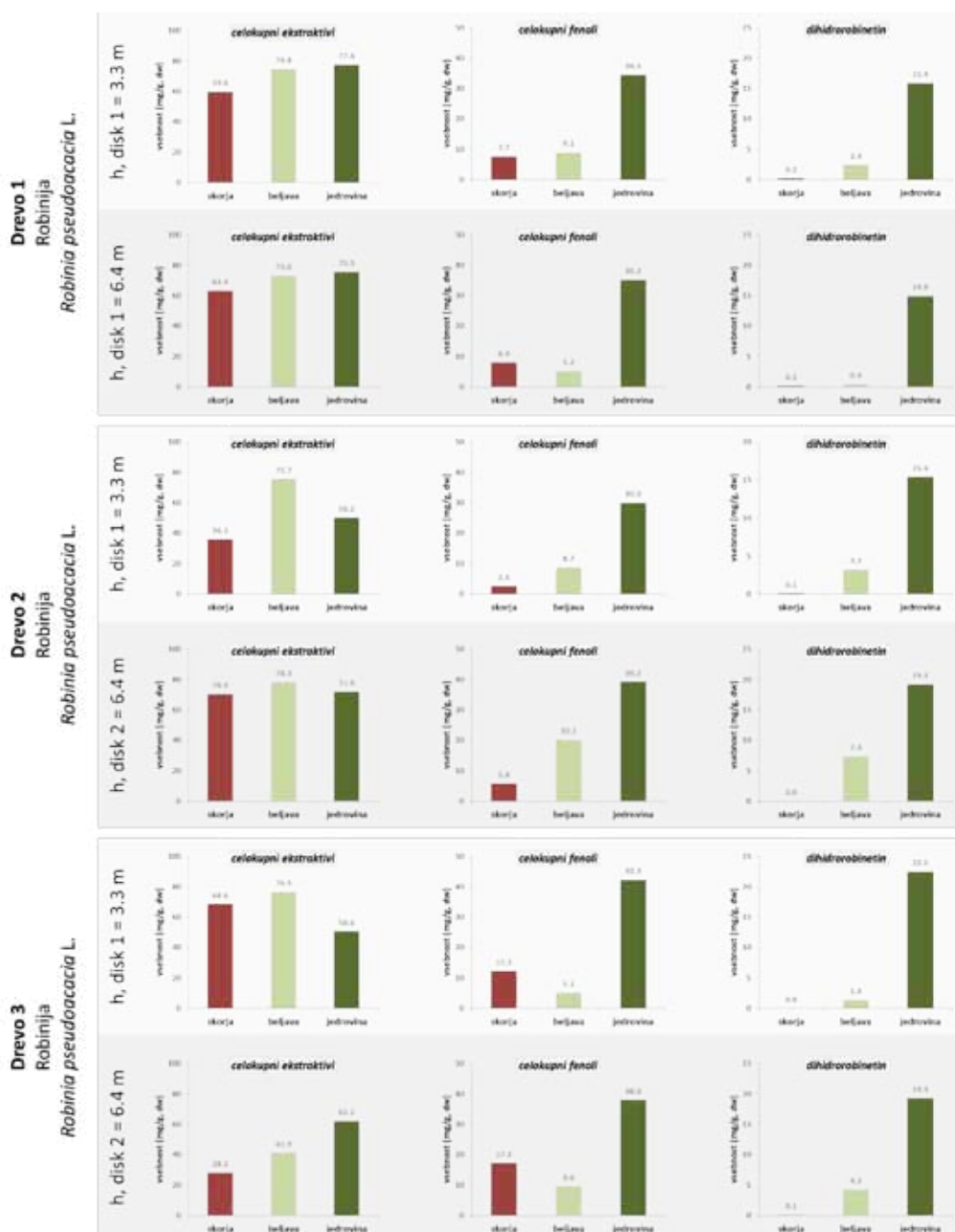
smo pripravili deset različno koncentriranih raztopin DHR (hplc standard, 1-500 mg/g) in jih injicirali na zanko sistema HPLC. Linearnost metode HPLC potrjuje koeficient determinacije linearnega regresijskega modela, ki je večji od 0,99 ( $R^2 \geq 0,99$ ) (De Angelis in sod., 2018; Poljanšek in sod., 2019; Vek in sod., 2019b).

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

#### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Z ekstrakcijo skorje in lesa navadne robinije (*R. pseudoacacia*) smo pridobili rjavo do temnorjavo obarva-

ni ekstrakt (slika 4). Količine acetonskega ekstrakta so bile relativno velike, saj smo iz 1 grama lesa (hw) v povprečju pridobili 69,79 mg hidrofilnih ekstraktivov. Učinkovitost opravljene ekstrakcije nekako potrjujejo tudi rezultati raziskave, s katero smo ugotovili, da je vsaj 4-urna ekstrakcija (vsaj 18 ekstrakcijskih ciklov) z acetonom v aparatu Soxhlet najprimernejša konvencionalna metoda za ekstrakcijo lesa robinije (Vek in sod., 2018; Vek in sod., 2019b). Rezultati kemijske raziskave so pokazali, da smo z ekstrakcijo v aparatu Soxhlet iz lesa in skorje v povprečju pridobili 63,95 mg/g



**Slika 6:** Vsebnost celokupnih ekstraktivov, celokupnih fenolov in dihidrorobinetina v skorji, beljavi in jedrovini treh vzorčnih dreves navadne robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) iz primestnega gozda Panovec pri Novi Gorici. Rezultati so prikazani za vzorce diskov, ki so bili odvzeti na dveh višinah; h = 3,3 m in 6,4 m.

**Fig. 6:** Content of total extractives, total phenols and dihydrorobinetin in the bark, sapwood and heartwood of three sampled black locust trees (*Robinia pseudoacacia* L.) from the Panovec suburban forest near Nova Gorica. Results are presented for the samples of discs which were taken at two heights: 3.3 m and 6.4 m.

**Preglednica 1:** Povprečne vsebnosti ekstraktivov v vzorcih skorje, beljave in jedrovine proučevanih dreves navadne robinije (*Robinia pseudoacacia* L.)

Vzorec debela	Celokupni ekstraktivi (% w/w)		Celokupni fenoli (mg GAE/g dw)		Dihidrorobinetin (mg/g dw)	
	avg	SD	avg	SD	avg	SD
skorja / bark	5,44 a	1,78	8,95 a	5,15	0,09 a	0,08
beljava / sapwood	7,57 a	0,20	9,64 a	5,53	3,17 a	2,46
jedrovina / heartwood	6,39 a	2,16	36,64 b	11,13	17,98 b	7,15

a - b; različne črke na stolpcih opisujejo statistično značilne razlike pri 95% intervalu zaupanja (LSD test).

a - b; different letters within the same column indicate statistically significant differences at a 95% confidence level (LSD test).

(SD, 20,26 mg/g) celokupnih hidrofilnih ekstraktivov, 28,82 mg/g (SD, 15,84 mg/g) celokupnih fenolov in 13,97 mg/g (SD, 9,422 mg/g) dihidrorobinetina.

### 3.1 Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v skorji in lesu robinije

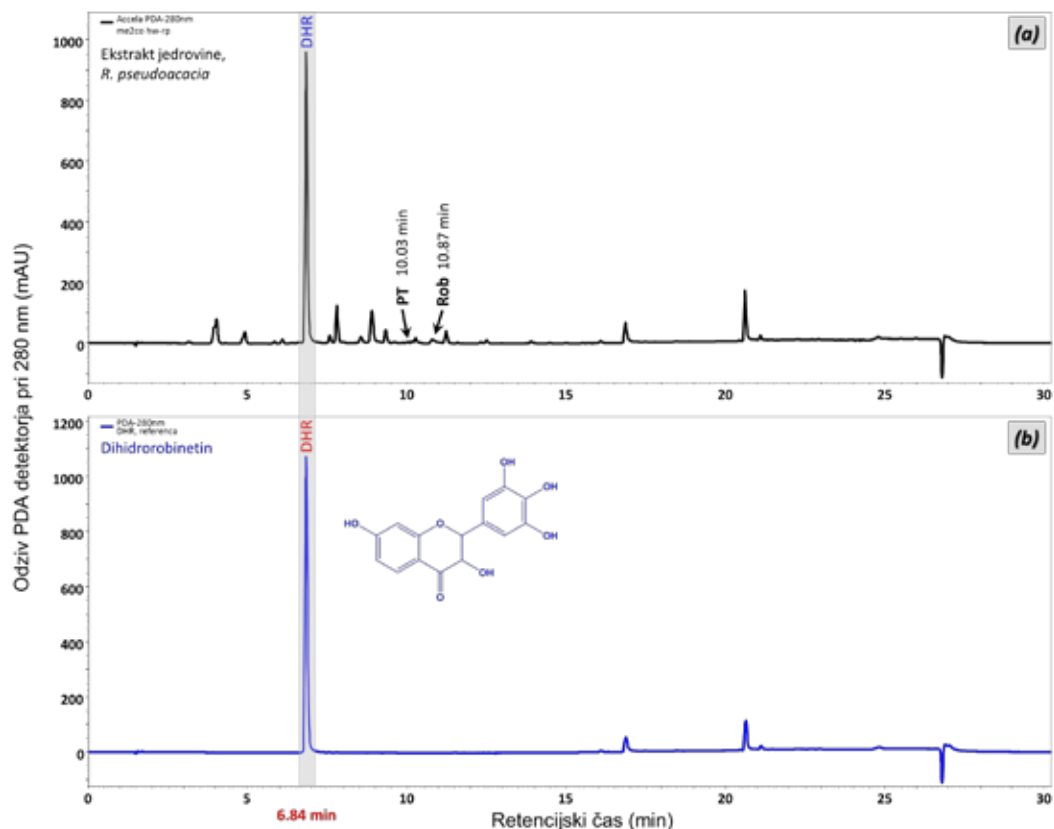
#### 3.1 Content of total hydrophilic extractives in the bark and wood of black locust

Kot je razvidno iz slika 6, je bilo hidrofilnih ekstraktivov v beljavi in jedrovini preiskovanih dreves več kot v skorji. Največ ekstraktivov smo pridobili iz vzorcev

**Table 1:** The average contents of extractives in the samples of bark, sapwood and heartwood of the investigated trees of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.)

jedrovine iz koluta prvega drevesa, in sicer smo v povprečju iz teh ekstrahirali 77,4 mg/g dw totalnih ekstraktivov. Najmanj ekstraktivov smo pridobili iz vzorcev skorje in beljave diska, ki je bil odvzet iz tretjega drevesa na višini 6,4 m (slika 6).

Nadaljnja statistična analiza ni pokazala značilne razlike v vsebnosti celokupnih hidrofilnih ekstraktivov med skorjo in lesom (preglednica 1) (ANOVA,  $p = 0,2269$ ). O podobnem ekstrakcijskem donosu poročajo tudi Sablik in sod. (2016), ki za jedrovino robinije poročajo 7,41% celokupnih ekstraktivov. Več ekstraktivov



**Slika 7:** Kromatograma HPLC-PDA ekstrakta robinije (*Robinia pseudoacacia* L.) in referenčne spojine, posneta pri 280 nm. (a) Acetonski ekstrakt jedrovine robinije. (b) Rastopina referenčne spojine (HPLC standard) za identifikacijo in kvantitativno kromatografsko analizo dihidrorobinetina (DHR).

**Fig. 7:** HPLC-PDA chromatograms of black locust extract (*Robinia pseudoacacia* L.) and a reference compound, monitored at 280 nm. (a) Acetone extract of black locust heartwood. (b) The reference compound (HPLC standard) for identification and quantitative chromatographic analysis of dihidrorobinetin (DHR).

so z mešanico metanola in vode (1:1, v/v) pridobili iz skorje (9,56 %) (Sablik in sod., 2016). Vzorci beljave drevesa št. 2 in vzorci beljave spodnjega koluta drevesa št. 3 so vsebovali celo nekoliko več hidrofilnih ekstraktivov kot vzorci jedrovine. Slednje lahko pripišemo topnim sladkorjem (npr. saharoza, glukoza in fruktoza), ki so uskladiščeni v beljavi, deloma pa tudi proteinom in drugim nedetektiranim spojinam, ki se poleg fenolov ekstrahirajo iz lesa robinije (De Filippis in Magel, 2012).

### 3.2 Vsebnost celokupnih fenolov v skorji in lesu robinije

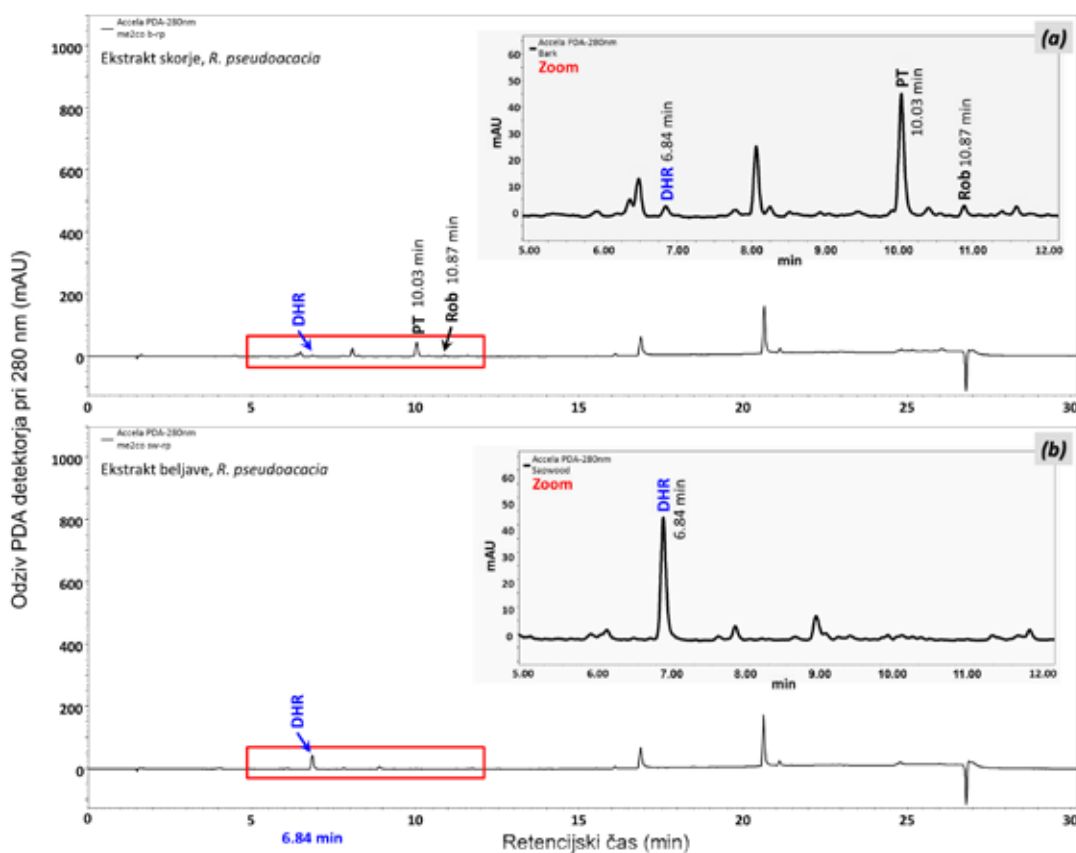
#### 3.2 Content of total phenols in the bark and wood of black locust

Semi-kvantitativna kolorimetrična analiza z UV-Vis spektrofotometrom je potrdila, da jedrovina robinije (*R. pseudoacacia*) vsebuje več fenolnih ekstraktivov kot beljava in skorja (ANOVA,  $p < 0,050$ ). Delež fenolnih ekstraktivov v lesu robinije lahko dosega več kot 4 % posušene lesne mase (slika 6). Ugotovili smo, da jedrovina vsebuje značilno več fenolnih ekstraktivov kot beljava in skorja, pri čemer je vsebnost fenolov v jedrovini štirikrat višja (preglednica 1) (LSD test).

### 3.3 Vsebnost dihidrorobinetina v skorji in lesu robinije

#### 3.3 Content of dihydrorobinetin in the bark and wood of black locust

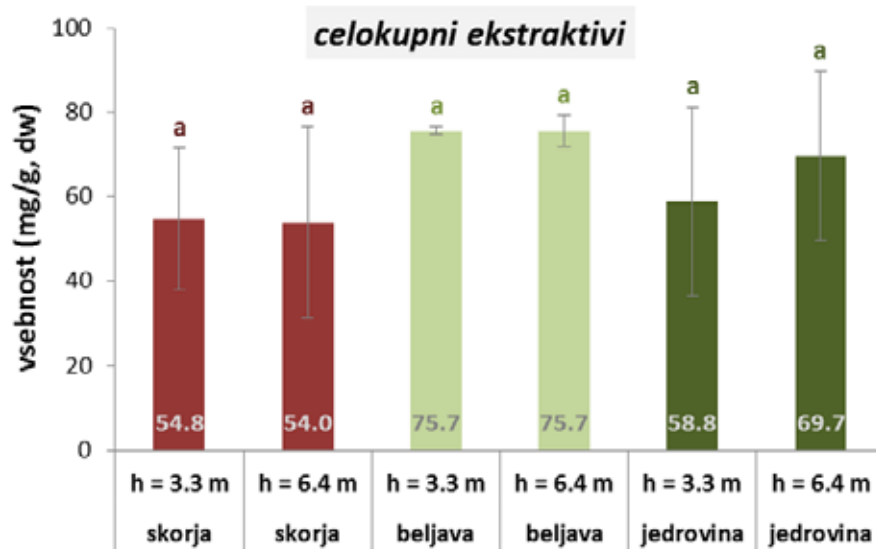
Z natančno kvalitativno in kvantitativno analizo HPLC smo preučili pojav dihidrorobinetina v ekstraktih skorje ter beljave in jedrovine robinije (*R. pseudoacacia*). Dihidrorobinetin (DHR) je karakteristična spojina lesnih ekstraktov robinije (Smith in sod., 1989; Magel in sod., 1994), kar potrjujejo tudi rezultati naše analize HPLC, saj so za kromatografske vrhove za DHR značilni najmočnejši odzivi detektorja (slika 7). Poleg DHR smo v ekstraktih potrdili tudi robinetin in piceatanol, vendar pa te spojine niso bile predmet pričujoče raziskave (slika 7 in slika 8). V hidrofilnih ekstraktih lesa robinije (*R. pseudoacacia*) so poleg dihidrorobinetina še galna kislina, elagna kislina, tetrahidroksi in trihidroksimetoksi dihidroflavonol, robinetin, likviritigenin, izolikviritigenin, levkorobinetinidin, fustin, fisetin, dihidrofisetin, robtein, butein, robtin, butin, robinin, dihidromiricetin, miricetin, piceatanol, resveratrol, siringenin in dimerni prorobinetinidini (Scheidemann in Wetzell, 1997; Meszaros in sod., 2007; Sanz in sod.,



**Slika 8:** Kromatograma HPLC-PDA ekstraktov robinije (*Robinia pseudoacacia* L.), posneta pri 280 nm. (a) Acetonski ekstrakt skorje robinije. (b) Acetonski ekstrakt skorje robinije. DHR, dihidrorobinetin; PT, piceatanol; Rob, robinetin.

**Fig. 8:** HPLC-PDA chromatograms of black locust extracts (*Robinia pseudoacacia* L.) monitored at 280 nm. (a) Acetone extract of black locust bark. (b) Acetone extract of black locust sapwood. DHR, dihidrorobinetin; PT, piceatanol; Rob, robinetin.





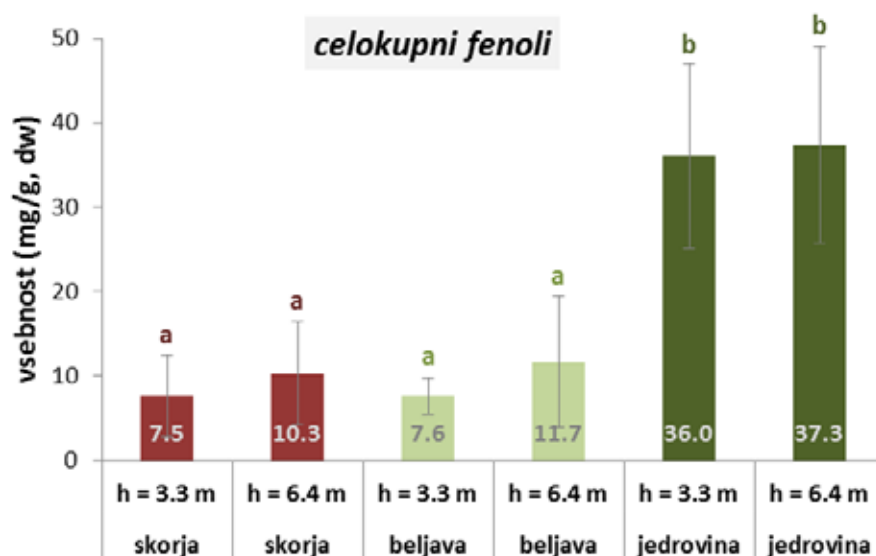
**Slika 9:** Vsebnost celokupnih hidrofilnih ekstraktivov v skorji, beljavi in jedrovini robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Vzorci so bili odvzeti na dveh višinah: 3,3 m in 6,4 m.

**Fig. 9:** The content of total hydrophilic extractives in the bark, sapwood and heartwood of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Samples were taken at two heights: 3.3 m and 6.4 m.

2011; Hosseinihashemi in sod., 2013; Sergent in sod., 2014; Destandau in sod., 2016).

DHR Kot je razvidno iz slika 6 in preglednica 1, smo iz jedrovine ekstrahirali značilno več DHR kot iz beljave in skorje (LSD test). Vsebnost DHR v jedrovini je bila skoraj 6-krat večja kot v beljavi (preglednica 1). O skoraj identičnih rezultatih poročajo tudi Bostyn S. in sod. (2018), ki so v jedrovini robinije z metodo HPLC izmerili 16 mg/g DHR, Sanz in sod. (2011); (2012b) pa so v jedrovini izmerili bistveno večjo vsebnost DHR (32,27

mg/g). Analiza variance je pokazala značilne razlike v vsebnosti DHR med preučevanimi tkivi (ANOVA,  $p < 0,050$ ). Naša raziskava je pokazala, da je bil DHR tudi v skorji robinije (slika 10). Zdi se, da fenolov skorje z uporabljeno ekstrakcijsko metodo oziroma topilom nismo mogli zadovoljivo ekstrahirati. Literatura poroča, da so v skorji predvsem polifenoli z višjo molekularno maso, torej kondenzirani tanini, ki naj bi bili inkrustirani v celično steno in zato težje ekstraktibilni (Smith in sod., 1989; Holmbom, 2011). Kondenzirani tanini



**Slika 10:** Vsebnost celokupnih fenolov v skorji, beljavi in jedrovini robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Vzorci so bili odvzeti na dveh višinah: 3,3 m in 6,4 m.

**Fig. 10:** The content of phenols in the bark, sapwood and heartwood of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Samples were taken at two heights: 3.3 m and 6.4 m.

prorobinetinidinskega tipa naj bi bili tudi v ksilemskih tkivih robinije (Reinprecht in sod., 2010; Sanz in sod., 2012a).

### 3.4 Variabilnost v vsebnosti ekstraktivov v debelu robinije

#### 3.4 Variability in the content of extractives in the stem of black locust

Splošno znano je, da je za les živih dreves poleg bolj izrazite radialne variabilnosti značilna tudi longitudinalna/aksialna variabilnost v vsebnosti in sestavi fenolnih ekstraktivov (Yanchuk in sod., 1988; Kai, 1991; Vek in sod., 2013b). Kot je razvidno iz spodnjih grafov (slika 9, slika 10 in slika 11), nam te trditve ni uspelo potrditi (LSD test). To bi lahko pojasnili s premajhno razdaljo med vzorčnimi koluti oziroma premajhnim številom vzorčenih diskov na drevo.

Porazdelitev celokupnih fenolnih ekstraktivov in DHR je bila za preučevana tkiva identična, to potrjuje tudi relativno močna soodvisnost med rezultati merit. S statistično analizo smo ugotovili značilno korelacijo med spektrofotometrično določeno vsebnostjo celokupnih fenolov in kromatografsko določeno vsebnostjo dihidrorobinetina v lesu robinije (linearna regresija,  $p < 0,0050$ ). Na osnovi podatkov, ki smo jih dobili z relativno hitro in enostavno spektrofotometrično ter dolgotrajno in drago analizo HPLC, lahko v beljavi oziroma jedrovini z vsebnostjo celokupnih fenolov pojasnimo več kot 90 % variabilnosti v vsebnosti DHR v lesu robinije ( $R^2 > 90\%$ ). O podobnih ugotovitvah obstajajo poročila tudi za lesna tkiva drugih drevesnih

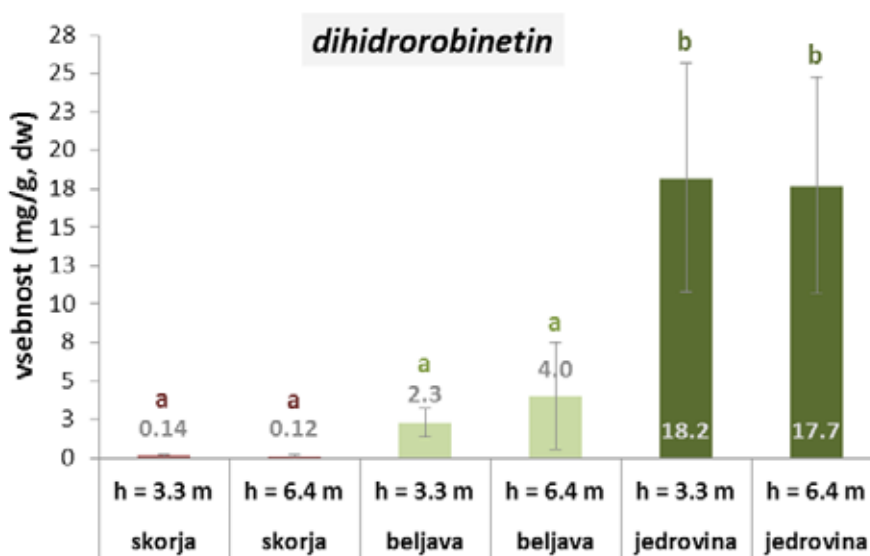
vrst (Karppanen in sod., 2007; Vek in sod., 2018). Omejeno statistično relacijo med rezultati spektrofotometričnih in kromatografskih analiz je po našem mnenju možno uporabiti v bolj praktičnih primerih, npr. za hitro in robustno vrednotenje kemijskih lastnosti lesa in lesenih konstrukcijskih elementov.

Pričujoča analiza ekstraktivov v debelih tkivih robinije (*R. pseudoacacia*) je pokazala, da je jedrovina, ki dejansko sestavlja največji volumski/masni delež debla, bogat vir fenolnih ekstraktivov. Dokazano je, da so ekstraktivi lesa robinije bioaktivne spojine, ki izkazujejo antimikrobne, fungistatične in antioksidativne lastnosti (Katiki in sod., 2013; Marinas in sod., 2014; Sablik in sod., 2016), kar dokazujejo tudi naše raziskave (Vek, 2017; Vek in sod., 2019a). Uporaba bioaktivnih ekstraktivov iz lesne biomase v, na primer, zaščitnih pripravkih za les bi lahko zmanjšala negativno breme na okolje, ki ga imajo pripravki s sintetičnimi biocidi po koncu življenjskega cikla (Singh in Singh, 2012).

## 4 ZAKLJUČKI

### 4 CONCLUSIONS

Preiskali smo kemijsko sestavo hidrofilnih ekstraktov lesa in skorje robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Potrdili smo, da je opisana ekstrakcijska metoda z aparatom Soxhlet in acetonom ustrezna za pridobivanje hidrofilnih ekstraktivov iz lesa in skorje robinije. Jedrovina robinije se je izkazala kot potencialen surovinski vir za ekstrakcijo zelenih »low volume/high value« kemikalij. Fenolne spojine robinije imajo namreč dokazane antimikrobne, fungistatične oziroma antioksidante



**Slika 11:** Vsebnost dihidrorobinetina v skorji, beljavi in jedrovini robinije (*Robinia pseudoacacia* L.). Vzorci so bili odvzeti na dveh višinah: 3,3 m in 6,4 m.

**Fig. 11:** The content of dihydrorobinetin in the bark, sapwood and heartwood of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Samples were taken at two heights: 3.3 m and 6.4 m.

lastnosti, zato izkazujejo velik aplikativni potencial (Katiki in sod., 2013; Marinas in sod., 2014; Sablik in sod., 2016). Ekstrakcija in pridobivanje dragocenih polifenolov iz lesa in skorje robinije bi lahko bila nov, inovativni način rabe robinije, ki jo sicer v največji meri še vedno uporabljamo kot podporne kole v sadovnjakih in vinogradih (Torelli, 2003; Vítková in sod., 2017).

## 5 POVZETEK

### 5 SUMMARY

Extractives, which are frequently defined as the non-structural components of wood and bark, are known to have very important physiological functions in various tissues of living trees. Moreover, these compounds have proven antioxidant, antimicrobial and fungistatic properties and therefore have large potential for practical application in numerous products, e.g. from preservative solutions to food supplements. The goal of the present study was to investigate the contents of extractives in the bark and wood of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), which is listed as an alien and invasive tree species by the UIA (Urban Innovative Actions, Applause project).

The aim of the present study was to investigate the content of extractives and the content of dihydrorobinetin in the bark and wood tissue of black locust (*R. pseudoacacia*). Black locust trees were harvested in the Panovec suburban forest near the city of Nova Gorica, Slovenia. Two stem discs were taken from each harvested tree, one at a height of 3.3 m and the other at 6.4 m. Wood and bark samples were sawn from the discs, dried and prepared for extraction. Samples of bark, sapwood and heartwood of black locust were prepared for the chemical analyses. Samples were extracted in a Soxhlet apparatus with an acetone/water mixture (9:1, v/v). First, acetone extracts were gravimetrically examined to measure the total hydrophilic extractive content. Afterwards, total phenolic content in the wood and bark extracts was measured colorimetrically with a UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer lambda UV-Vis) according to the Folin-Ciocalteu method. Detailed qualitative and quantitative analysis of dihydrorobinetin (DHR) was done with a high-pressure liquid chromatography system (Accela HPLC system, Thermo Scientific). Compounds of extract were separated on an ODS column filled with 2.6 µm solid core particles and detected with a photodiode array (PDA) at 280 nm. The chromatographic method was linear in the selected concentration range (1 mg/l - 100 mg/l) for DHR. Standards of robinetin and piceatannol were used for identification. DHR was identified and quantified in the extracts of all the black locust samples taken.

Soxhlet extraction of black locust bark and wood yielded an average of 54.4 mg/g and 69.8 mg/g of non-structural components, respectively, which were soluble in acetone. Higher amounts of total hydrophilic extractives in sapwood samples can be explained by the presence of soluble sugars and other undetected compounds which were extracted from samples with acetone. However, the chemical analysis revealed the highest contents of total hydrophilic extractives, total phenols and dihydrorobinetin in the samples of heartwood. Lower amounts of phenolic extractives were extracted from sapwood and bark samples. Bark is generally characterized by the presence of condensed tannins which are not able to be extracted. Correlated to the results of gravimetry and spectrophotometry, the highest yield of DHR was obtained by extracting the heartwood samples with acetone. A gram of dried black locust heartwood yielded an average of 18 mg of DHR. The amount of DHR in heartwood is six times higher than that in sapwood. Samples taken at different heights on the stem did not vary with respect to the content of the soluble components in the wood and bark.

The results of our investigation clearly show that black locust heartwood, which actually represents the largest volume/mass share in the tree stem, is a rich source of phenolic extractives. Finally, extraction of bark and woody biomass represents an important part of the biorefinery concept.

## 6 ZAHVALA

### 6 ACKNOWLEDGEMENTS

Zahvala Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in UIA (*Urban Innovative Actions*, projekt Applause, UIA02-228). Prispevek smo pripravili v okviru raziskovalnih dejavnosti programske skupine P4-0015. Zahvaljujemo se ge. Heleni Zorn in g. Milošu Merviču iz Zavoda za Gozdove Slovenije (Krajevna enota Tolmin) za pomoč pri organizaciji in izvedbi poseka dreves.

## 7 LITERATURA

### 7 REFERENCES

- Bostyn S., Destandau E., Charpentier J.-P., Serrano V., Seigneuret J.-M. in sod. 2018. Optimization and kinetic modelling of robinetin and dihydrorobinetin extraction from *Robinia pseudoacacia* wood. *Industrial Crops and Products*, 126, 22–30.
- Brus R. 2005. *Dendrologija za gozdarje*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 408 str.
- De Angelis M., Romagnoli M., Vek V., Poljanšek I., Oven P. in sod. 2018. Chemical composition and resistance of Italian stone pine (*Pinus pinea* L.) wood against fungal decay and wetting. *Industrial Crops and Products*, 117: 187–196.

- De Filippis L., Magel E. 2012. Identification of biochemical differences between the sapwood and transition zone in *Robinia pseudoacacia* L. by differential display of proteins. *Holzforschung*, 66, 4: 543–549.
- Destandau E., Charpentier J.P., Bostyn S., Zubrzycki S., Serrano V. in sod. 2016. Gram-scale purification of dihydrorobinetin from *Robinia pseudoacacia* L. wood by centrifugal partition chromatography. *Separations*, 3: 3.
- Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165, 1: 9–28.
- Dünisch O., Richter H.G., Koch G. 2010. Wood properties of juvenile and mature heartwood in *Robinia pseudoacacia* L. *Wood Science and Technology*, 44, 2: 301–313.
- EN 350-2 (1994) Durability of wood and wood-based products - Natural durability of solid wood - Part 2: Guide to natural durability and treatability of selected wood species of importance in Europe. CEN (European committee for standardization), Brussels.
- Fengel D., Wegener G. 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. (ur.) Berlin-New York, Walter de Gruyter: 613 str.
- Höll W. 2000. Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees. V: *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*. Savidge R.A. in sod. (ur.). (Cell and Molecular Biology of Wood Formation, Oxford, U.K., BIOS Scientific Publishers Ltd: 347–362.
- Holmbom B. 1999. Extractives. V: *Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking*. Sjöström E. in sod. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 316 str.
- Holmbom B. 2011. Extraction and utilisation of non-structural wood and bark components. V: *Biorefining of forest resources*. Alén R. (ur.). (Biorefining of forest resources, book 20). Helsinki, Paper Engineers' Association/Paperi ja Puu Oy: 178–224.
- Hosseinihashemi S.K., Safdari V., Kanani S. 2013. Comparative chemical composition of n-hexane and ethanol extractives from the heartwood of black locust. *Asian Journal of Chemistry*, 25, 2: 929–933.
- Jansson M.B., Nilvebrant N.V. 2009. *Wood extractives*. V: *Wood Chemistry and Wood Biotechnology (Pulp and Paper Chemistry and Technology)*. Ek M. in sod. (ur.). (Wood Chemistry and Wood Biotechnology (Pulp and Paper Chemistry and Technology), Berlin, De Gruyter: 147–171.
- Kai Y. 1991. *Chemistry of Extractives*. V: *Wood and Cellulosic Chemistry*. Hon D.N.S. in sod. (ur.). (Wood and Cellulosic Chemistry, New York, Marcel Dekker, Inc.: 215–255.
- Karppanen O., Venäläinen M., Harju A.M., Willför S., Pietarinen S. in sod. 2007. Knotwood as a window to the indirect measurement of the decay resistance of Scots pine heartwood. *Holzforschung*, 61, 5: 600–604.
- Katiki L.M., Ferreira J.F.S., Gonzalez J.M., Zajac A.M., Lindsay D.S. in sod. 2013. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. *Veterinary Parasitology*, 192, 1–3: 218–227.
- Magel E., Jayallemand C., Ziegler H. 1994. Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of nonstructural carbohydrates and wood extractives across the trunk. *Trees-Structure and Function*, 8, 4: 165–171.
- Magel E.A., Drouet A., Claudot A.C., Ziegler H. 1991. Formation of heartwood substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. I. Distribution of phenylalanine ammonium lyase and chalcone synthase across the trunk. *Trees - Structure and Function*, 5, 4: 203–207.
- Marinas I.C., Oprea E., Geana E.I., Chifriuc C., Lazar V. 2014. Antimicrobial and antioxidant activity of the vegetative and reproductive organs of *Robinia pseudoacacia*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79, 11: 1363–1378.
- Meszaros E., Jakab E., Varhegyi G. 2007. TG/MS, Py-GOMS and THM-GIC/MS study of the composition and thermal behavior of extractive components of *Robinia pseudoacacia*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 79, 1–2: 61–70.
- Oven P. 1998. Odziv drevesnih tkiv na poškodbe in infekcijo. 1. Živa skorja. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 55: 113–133.
- Oven P., Merela M., Vek V. 2010. Response of Wood In Beech to Mechanical Wounding. V *Wood Structure and Properties* 10, Zvolen: 63–66.
- Panshin A., De Zeeuw C. 1980. *Textbook of Wood Technology*. (ur.) New York, McGraw-Hill: 722 str.
- Piotrowska H., Kucinska M., Murias M. 2012. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 750, 1: 60–82.
- Plumed-Ferrer C., Väkeväinen K., Komulainen H., Rautiainen M., Smeds A. in sod. 2013. The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms (vol 164, pg 99, 2013). *International Journal of Food Microbiology*, 166, 1: 163–163.
- Poljanšek I., Oven P., Vek V., Raitanen J.E., Hemming J. in sod. 2019. Isolation of pure pinosylvins from industrial knotwood residue with non-chlorinated solvents. *Holzforschung*, 73, 5: 475–484.
- Rademacher P., Rousek R., Fodor F., Baar J., Koch G. in sod. 2016. *Robinia Wood Research – new innovations for a traditional material*. V: Conference theme. Sopron, University of West Hungary, Sopron.
- Reinprecht L., Zubkova G., Marchal R. 2010. Decay resistance of laminated veneer lumbers from black locust wood *Wood Research*, 55, 2: 39–52.
- Rowe J.W. 1989. *Natural products of woody plants: Chemicals extraneous to the lignocellulosic cell wall*. (ur.) Berlin, Springer-Verlag: 1243 str.
- Sablik P., Giagli K., Paril P., Baar J., Rademacher P. 2016. Impact of extractive chemical compounds from durable wood species on fungal decay after impregnation of nondurable wood species. *European Journal of Wood and Wood Products*, 74, 2: 231–236.
- Sanz M., de Simon B.F., Cadahia E., Esteruelas E., Munoz A.M. in sod. 2012a. Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica Chimica Acta*, 732: 33–45.
- Sanz M., de Simon B.F., Esteruelas E., Munoz A.M., Cadahia E. in sod. 2011. Effect of toasting intensity at cooperage on phenolic compounds in acacia (*Robinia pseudoacacia*) heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7: 3135–3145.
- Sanz M., Fernández de Simón B., Esteruelas E., Muñoz Á.M., Cadahia E. in sod. 2012b. Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoacacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels. *Analytica Chimica Acta*, 732: 83–90.
- Scheidemann P., Wetzal A. 1997. Identification and characterization of flavonoids in the root exudate of *Robinia pseudoacacia*. *Trees-Structure and Function*, 11, 5: 316–321.
- Sergent T., Kohnen S., Jourez B., Beauve C., Schneider Y.J. in sod. 2014. Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol. *Wood Science and Technology*, 48, 5: 1005–1017.
- Singh T., Singh A.P. 2012. A review on natural products as wood protectant. *Wood Science and Technology*, 46, 5: 851–870.
- Smith A.L., Campbell C.L., Walker D.B., Hanover J.W. 1989. Extracts from black locust as wood preservatives: Extraction of decay resistance from black locust heartwood. *Holzforschung*, 43, 5: 293–296.
- Tavčar Benković E., Grohar T., Žigon D., Švajger U., Janeš D. in sod. 2014. Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 52: 23–28.
- Torelli N. 2003. Robinija (*Robinia pseudoacacia* L.) in njen les. *Les*, 54, 1–2: 6–10.

- Torelli N., Trajković J., Sertić V. 2006. Influence of phenolic compounds in heartwood of Silver fir (*Abies alba* Mill.) on the equilibrium moisture content. *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, 64, 4: 341–342.
- Valimaa A.L., Honkalampi-Hamalainen U., Pietarinen S., Willför S., Holmbom B. in sod. 2007. Antimicrobial and cytotoxic knot-wood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 2: 235–243.
- Vek V. 2013. Extractives in wounded wood and knots of common beech (*Fagus sylvatica* L.). PhD Thesis. Ljubljana, University of Ljubljana, Biotechnical faculty: 162 str.
- Vek V., Oven P., Humar M. 2013a. Phenolic extractives of wound-associated wood of beech and their fungicidal effect. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 0: 91–97.
- Vek V., Oven P., Poljanšek I. 2013b. Content of Total Phenols in Red Heart and Wound-Associated Wood in Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Drvna industrija*, 64, 1: 25–32.
- Vek V. 2017. Formulations of extractives and nanocellulose for protection of wood and wood-based composites. Final project report. Slovenian Research Agency, Ljubljana.
- Vek V., Oven P., Poljanšek I. 2018. Comparison of two extraction and two chromatographic methods in analysis of beech wood extractives. *European Journal of Wood and Wood Products*, 76, 1: 389–392.
- Vek V., Oven P., Ters T., Poljanšek I., Hinterstoisser B. 2014. Extractives of mechanically wounded wood and knots in beech. *Holzfor-schung*, 68, 5: 529–539.
- Vek V., Poljanšek I., Humar M., Oven P. 2019a. Fungicidal and antio-xidant properties of extractives from wood of black locust and Scots pine. Manuscript in preparation.
- Vek, V., Poljanšek, I., Oven, P., 2019. Efficiency of three conventional methods for extraction of dihydrorobinetin and robinetin from wood of black locust. *European Journal of Wood and Wood Pro-ducts*, 77: 891–901.
- Vítková M., Müllerová J., Sádlo J., Pergl J., Pyšek P. 2017. Black locust (*Robinia pseudoacacia*) beloved and despised: A story of an in-vasive tree in Central Europe. *Forest Ecology and Management*, 384: 287–302.
- Willför S., Nisula L., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B. 2004. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. *Holzfor-schung*, 58, 4: 335–344.
- Willför S.M., Smeds A.I., Holmbom B.R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112, 1–2: 64–77.
- Yanchuk A.D., Spilda I., Micko M.M. 1988. Genetic variation of extrac-tives in the wood of trembling aspen. *Wood Science and Techno-logy*, 22, 1: 67–71.
- Zule J., Može A. 2003. GC analysis of extractive compounds in beech wood. *Journal of Separation Science*, 26, 14: 1292–1294.