

# PINOSILVINI KOT DRAGOCENE BIOAKTIVNE SPOJINE V LESU BOROV

Pinosylvins as valuable bioactive compounds in the wood of pines

prof. dr. Primož Oven\*, dr. Ida Poljanšek, dr. Viljem Vek

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

**Ključne besede:** bor, *Pinus*, ekstraktivi, stilbeni, pinosilvin, kromatografija

**Keywords:** pine, *Pinus*, extractives, stilbenes, pinosylvin, chromatography

## Uvod

Les je hierarhično urejen kompozit, ki ga gradijo spojine z veliko molekulsko maso kot so polisaharidi, celuloza in hemiceluloze ter lignin, ki je spojina fenolnega karakterja. Poleg teh gradnikov celičnih sten se v lesu nahajajo tudi snovi, ki nimajo strukturne vloge. To so praviloma spojine z majhno molekulsko maso, ki jih tradicionalno označujemo z izrazom ekstraktivi. Nekatere ekstraktibilne spojine imajo zelo pomembno funkcijo v primarnem metabolizmu, druge pa so proizvod sekundarnega metabolizma, ki se sproži zaradi starostnih procesov kot je ojedritev ali pa zaradi travmatskih dogodkov, kakršni sta na primer mehanska poškodba in glivna okužba drevesnih tkiv (Smith 2015, Vek in sod. 2014). Zelo pestro skupino sekundarnih metabolitov v lesu in drevesni skorji predstavljajo polifenoli. V lesu listavcev prevladujejo flavonoidi, v lesu iglavcev pa lignani in stilbeni (Willför in sod. 2003a, Willför in sod. 2003b), pri tem pa velja poudariti, da so nekatere spojine značilne samo za posamezen botanični rod. Tako se v lesu borov pojavljajo stilbeni pinosilvin, monometilni eter pinosilvina in priložnostno tudi dimetilni eter pinosilvina (Lindstedt 1951). Pinosilvin in njegovi derivati imajo zelo podobno molekulsko strukturo kot resveratrol, ki je bioaktivna spojina s širokim spektrom farmakoloških lastnosti, kot so antioksidativno in protivnetno delovanje, zaviranje rasti rakastih celic, zniževanje ravni holesterola in izboljšana občutljivost na inzulin (Rimando in Suh 2008). Ker se resveratrol nahaja v grozdnih jagodah, je prisoten v rdečem vinu, komercialno pa ga pridobivajo tudi iz japonskega dresnika. Preliminarne raziskave lastnosti pinosilvina in njegovih derivatov so razkrile, da bi utegnili tudi ti stilbeni posedovati podobne lastnosti kot resveratrol (Park in sod. 2012, Jancinova in sod. 2010). V okviru mednarodnega raziskovalnega projekta »Pinosylvins as novel bioactive agents for food application« (Koordinacija: University of Eastern Finland. Partnerji: Univerza v Ljubljani, Åbo Akademi University, University of Vigo, Latvian State Institut of Wood Chemistry) so potekale obširne razi-

skave, ki so bile usmerjene v analizo vsebnosti pinosilvinov v lesu borov, optimizacijo ekstrakcijskih in izolacijskih metod ter proučevanje bioaktivnosti izoliranih spojin in ekstraktov. Namen pričujočega prispevka je prikazati del rezultatov o izkoristku različnih ekstrakcijskih topil ter vsebnosti pinosilvinov v različnih tkivih debela rdečega (*Pinus sylvestris* L.) in črnega bora (*Pinus nigra* Arnold).

## Material in metode

Pričujoča analiza pinosilvinov je zasnovana na treh drevesih rdečega bora, ki smo jih novembra 2011 posekali na Brdu pri Kranju, na nadmorski višini 470 m. Drevesa smo razžagali in odvezli vzorce beljave, jedrovine ter baze mrtvih in živih vej, ki jih bomo v nadaljevanju imenovali mrtve in žive grče. Vzorce debelnih tkiv in grč bora smo posušili (40 °C, 48 ur) ter zmleli z drobilnikom Retsch SM 2000 ob uporabi suhega ledu (CO<sub>2</sub>), pred ekstrakcijo pa smo zmlete vzorce liofilizacijsko posušili pri - 82 °C in 0,040 mbar. Za Soxhlet ekstrakcijo smo uporabili 2,5 g suhega lesa in ga ekstrahirali z 250 mL topila. Vzorce smo najprej ekstrahirali 4 h s cikloheksanom pri 110 °C, s čimer smo iz lesa odstranili lipofilne ekstraktive. Hidrofilne ekstraktive pa smo iz vzorcev grč ter debelnih tkiv ekstrahirali z mešanico acetona in vode (95:5, v/v) pri 110 °C in 4 h. Po končani ekstrakciji smo pridobljene ekstrakte ustrezno shranili v temne stekleničke ter odvezli 10 mL ekstrakta za gravimetrično določitev celokupnih lipofilnih oziroma hidrofilnih ekstraktivov. Kvalitativno in kvantitativno vrednotenje ekstraktov smo izvedli s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Accela, modularni HPLC sistem, Thermo scientific). Iz ekstraktov smo odparili topilo in suhi ostanek redčili z metanolom. Tako pripravljene vzorce smo prefiltrirali v 1,5 mL temne viala ter filtrate nato direktno injicirali na zanko HPLC sistema. Ločba ekstraktivov je potekala na pentafluorofenilni koloni PFP, ki je bila polnjena z 2,6 µm »solid core« delci (Thermo Accucore). Kromatografska kolona in avtomatski vzorčevalnik sta bila termostatirana na 30 °C oziroma 4 °C. Za

\*[primoz.oven@bf.uni-lj.si](mailto:primoz.oven@bf.uni-lj.si)

mobilno fazo smo uporabili vodo in metanol (»HPLC grade«) ob dodatku mravljinčne kisline. Ločbo spojin smo zagotovili z 10 min gradientom (od 5 % do 95 % MeOH) in pretokom 400  $\mu$ L/min, detekcija pa je potekala s PDA detektorjem pri 275 nm in merjenjem UV spektrov (od 200 nm do 400 nm). Kvalitativno analizo smo izvedli na osnovi primerjave retencijskih časov in UV spektrov ločenih spojin s kromatografskimi standardi pinosilvin ( $\geq 97,0$  %, HPLC) in pinosilvin monometilni eter ( $\geq 97,0$  %, HPLC) (Sigma-Aldrich, Co.). Za vse uporabljene standarde smo določili koncentracijsko območje, v katerem je kromatografska metoda linearna.

## Rezultati in razprava

Gravimetrična analiza vsebnosti lipofilnih in vsebnosti hidrofilnih ekstraktivov v lesu rdečega bora kaže, da je vsebnost lipofilnih ekstraktivov tudi do trikrat večja od vsebnosti hidrofilne frakcije spojin (Slika 1). V proučevanih drevesih rdečega bora je bila vsebnost lipofilnih ekstraktivov največja v mrtvih in živih grčah. V jedrovini je bilo lipofilnih ekstraktivov sicer več kot v beljavi, vendar do trikrat manj kot v grčah. Tudi vsebnost hidrofilnih ekstraktivov je bila največja v grčah, v jedrovini in beljavi pa se ni bistveno razlikovala.

Kromatografska analiza ekstraktov, ki smo jih pridobili z manj polarnim cikloheksanom in bolj polarnim acetonom je razkrila, da je bila ekstrakcijska učinkovitost teh dveh topil različna za dva proučevana stilbena, pinosilvin (PS) in monometilni eter pinosilvina (PSMME). Kromatograma lipofilne in hidrofilne frakcije ekstraktov sta prikazana na slikah 2 in 3. Kromatogram cikloheksanskega ekstrakta (Slika 2) izkazuje očiten vrh, ki smo ga s pomočjo eksterne standarda in spektralne analize identificirali kot PSMME. V cikloheksanskem ekstraktu smo detektirali zelo majhne količine PS, ki pa se je v sistemu uporabljene mobilne faze eluiral pred PSMME (Slika 2). Izrazit vrh, ki sledi PSMME, pripada neidentificirani spojini.

HPLC kromatogram acetonskega ekstrakta mrtve grče (Slika 3) se bistveno razlikuje od kromatograma cikloheksanskega ekstrakta tega tkiva (Slika 2). S pomočjo eksternih standardov smo v acetonskem ekstraktu identificirali tri spojine, lignan notraheleogenin (NTG), pinosilvin (PS) in pinosilvin monometilni eter (PSMME). S kromatografskim sistemom, ki smo ga uporabili v naši raziskavi, se je najprej eluiral najbolj polaren NTG, kot zadnji pa PSMME, ki ima delno nepolarni karakter. Prav zato je mogoče PSMME ekstrahirati v nepolarnem cikloheksanu kot tudi v bolj polarnem sistemu aceton/voda (Slika 3). PS je bolj polaren, zato se ga s cikloheksanom praviloma ekstrahira zelo malo (Slika 2).

S cikloheksanom smo uspeli predvsem iz grč ekstrahirati od 16 mg do skoraj 21 mg PSMME na gram suhega lesa, medtem ko je bilo detektiranega PS v

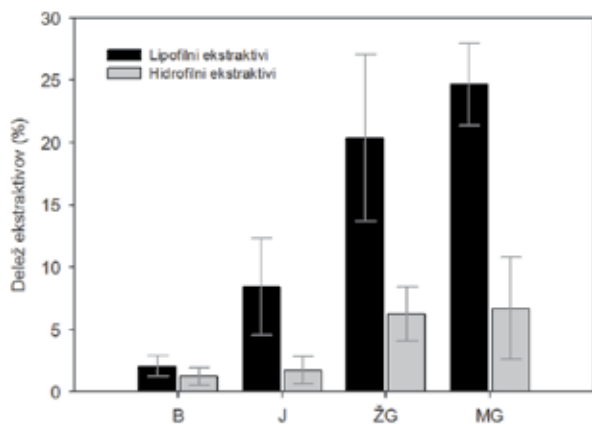
cikloheksanskem ekstraktu zelo malo (od 0,1 do 0,14 mg/g suhega lesa) (Slika 4). Največ PSMME smo s cikloheksanom ekstrahirali in s HPLC detektirali v živih grčah, najmanjše količine PSMME pa smo zabeležili v beljavi. V nasprotju s pričakovani smo v lipofilni ekstrakcijski frakciji jedrovine detektirali relativno malo PSMME (Slika 4).

Pri nadaljnji ekstrakciji istih vzorcev še z acetonom smo pridobili oba ciljna stilbena, PS in PSMME (Slika 5). Primerjava detektiranih količin kaže, da je bil aceton bolj učinkovit kot cikloheksan tako pri ekstrakciji PSMME kot tudi pri ekstrakciji PS (Slika 4 in 5). Tudi v hidrofilni ekstrakcijski frakciji smo največ PSMME detektirali v grčah, sledi jedrovina in nato beljava. Največ pinosilvina (PS) smo detektirali v acetonskem ekstraktu živih grč (7,8 mg/g), nekoliko manj v mrtvih grčah in jedrovini, v ekstraktu beljave pa smo zabeležili bistveno manj PS (0,6 mg/g) kot v ostalih tkivih (Slika 5).

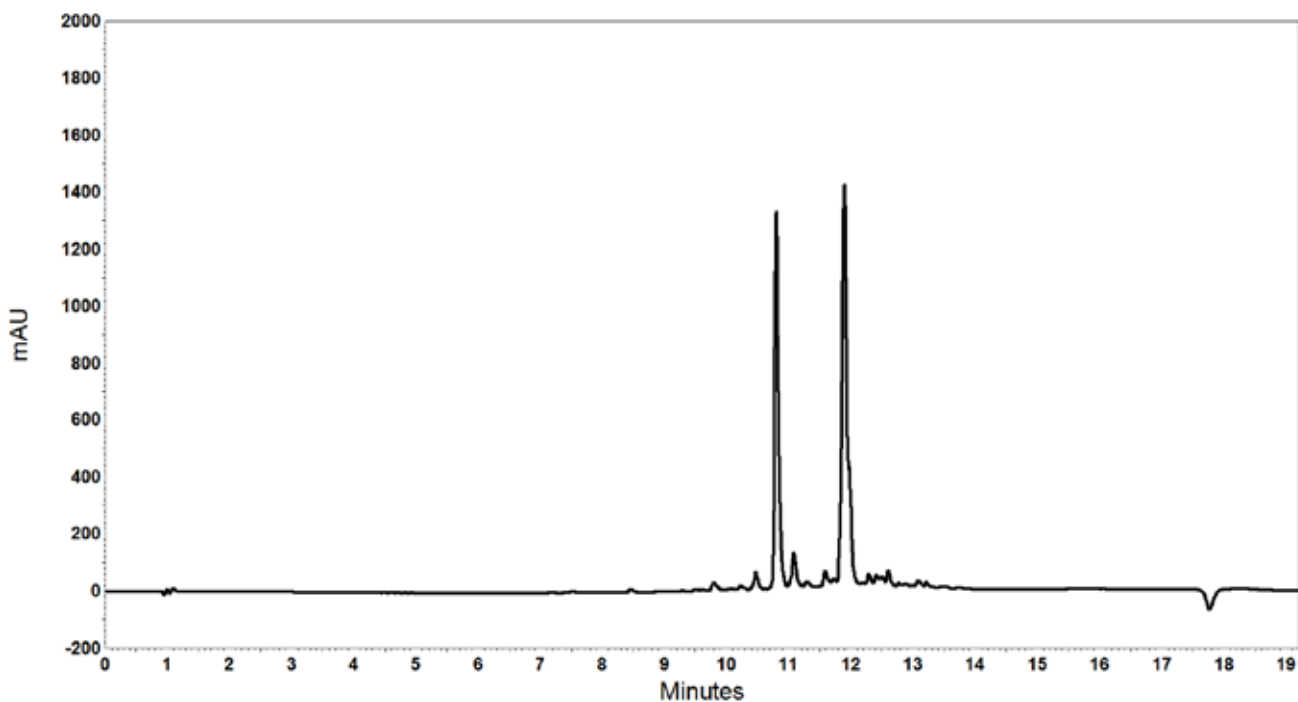
Naši rezultati kažejo, da je aceton primerno topilo za pridobivanje pinosilvina, če je ciljna spojina monometilni eter pinosilvina, pa je smiselno uporabiti zaporedno ekstrakcijo z obema topiloma, cikloheksanom in acetonom. Seveda omenjeni topila nista edina možna izbira za ekstrakcijo stilbenov. Kot primerno ekstrakcijsko topilo se je izkazala tudi vodna raztopina etanola, za ekstrakcijo PS pa tudi voda (Fang in sod. 2013). Naše ugotovitve potrjujejo izsledke o znatnih vsebnostih ekstraktivov v grčah listavcev in iglavcev (Willför in sod. 2004a, Willför in sod. 2004b), ki v predelavi lesa običajno predstavljajo nezaželeno tehnološko napako. V študiji o bioloških aktivnostih obeh stilbenov je dokazano, da je predvsem PS izredno učinkovit pri zaviranju rasti gram pozitivnih in gram negativnih bakterij (Plumed-Ferrer in sod. 2013), naše študije pa dokazujejo njegovo učinkovitost tudi pri zaviranju rasti gliv razkrojevalk lesa (neobjavljeno). Les borov je kakovosten vir pinosilvina, spojina pa ima velik potencial predvsem zaradi antibakterijskih in fungicidnih lastnosti.

## Zahvala

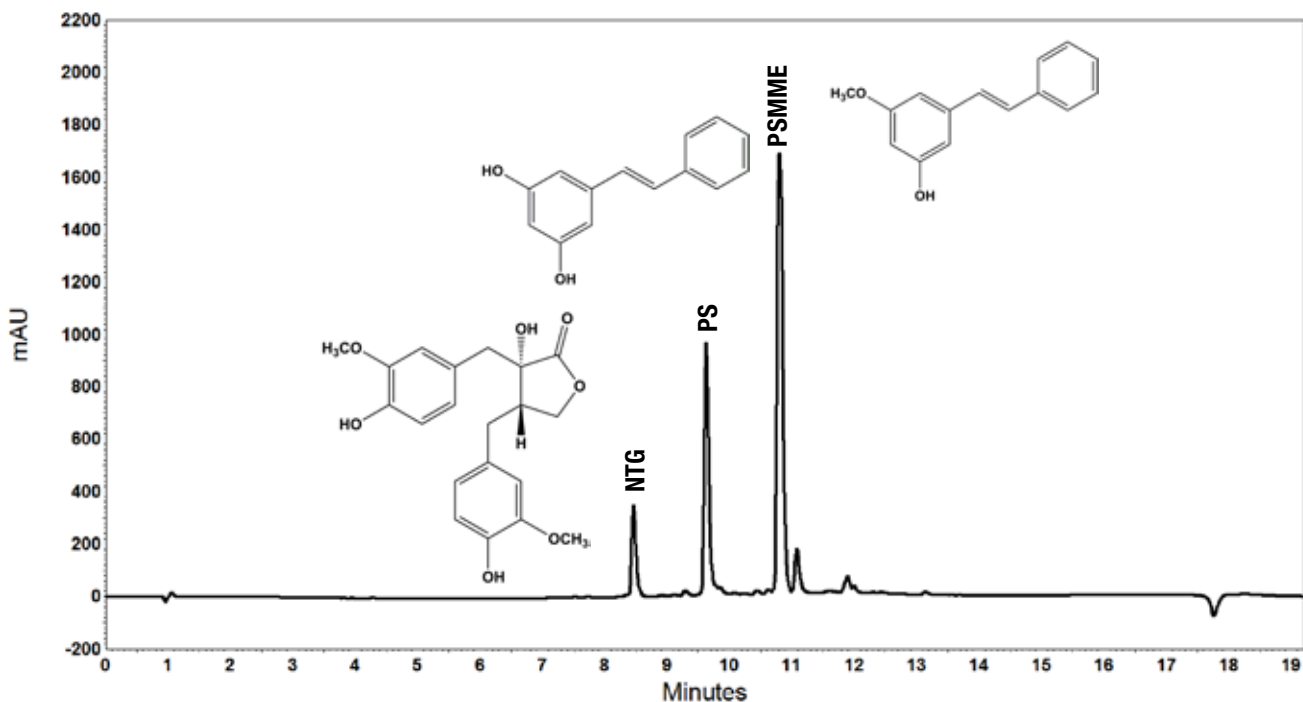
Raziskava je nastala v okviru mednarodnega projekta »Pinobio- Pinosilvins as novel bioactive agents for food application«, ki je potekal v okviru iniciative WoodWisdom Era-Net 2 v okviru 7. OP EU. Slovenski del projekta je financiralo Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport Republike Slovenije. Ob tej priložnosti se zahvaljujemo Kim Turk Križanec za pomoč pri vodenju in usmerjanju administrativnega dela projekta. Za tehnično pomoč pri organizaciji dela na terenu in poseku dreves se zahvaljujemo Protokolarnemu objektu Brdo pri Kranju in vodji tehnične službe mag. Franciju Jagodicu, takratnemu direktorju Zavoda za gozdove Slovenije Joštu Jakši in Janezu Logarju kot vodji Območne enote Kranj.



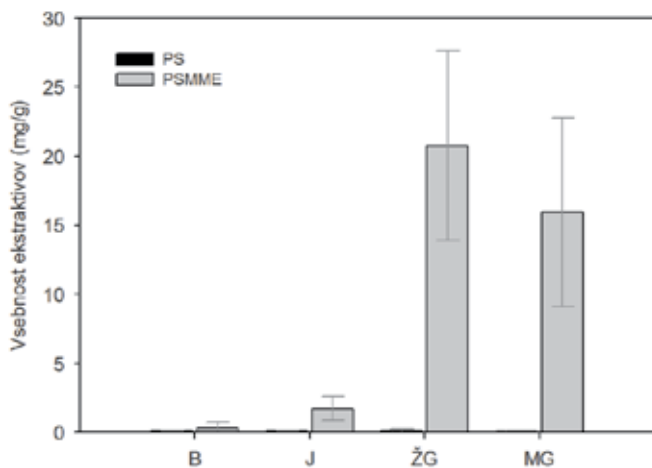
Slika 1: Vsebnost lipofilnih in hidrofilnih ekstraktivov v beljavi (B), jedrovini (J) ter mrtvih (MG) in živih (ŽG) grčah rdečega bora



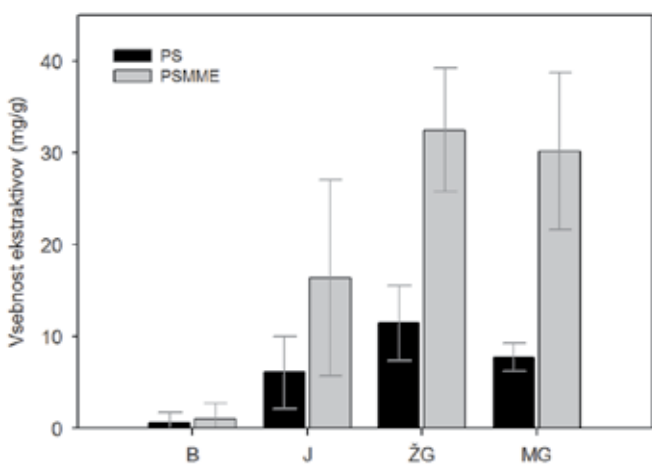
Slika 2: HPLC kromatogram cikloheksanskega ekstrakta mrtve grče rdečega bora



Slika 3: HPLC kromatogram acetonskega ekstrakta mrtve grče rdečega bora



**Slika 4: Vsebnost pinosilvina (PS) in monometilnega etra pinosilvina (PSMME) v cikloheksanskem (Cy) ekstraktu beljave (B), jedrovine (J) ter mrtvih (MG) in živih (ŽG) grčah rdečega bora**



**Slika 5: Vsebnost pinosilvina (PS) in monometilnega etra pinosilvina (PSMME) v acetonskem ekstraktu beljave (B), jedrovine (J) ter mrtvih (MG) in živih (ŽG) grčah rdečega bora**

M., von Wright A. 2013. The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 1: 99-107

- Rimando A.M., Suh N. 2008. Biological/Chemopreventive Activity of Stilbenes and their Effect on Colon Cancer. *Planta Med.*, 74, 13: 1635-1643
- Smith K. 2015. Compartmentalization, Resource Allocation, and Wood Quality. *Curr Forestry Rep*, 1, 1: 8-15
- Vek V., Oven P., Ters T., Poljanšek I., Hinterstoisser B. 2014. Extractives of mechanically wounded wood and knots in beech. *Holzforschung*, 68, 5: 529-539
- Willför S., Hemming J., Reunanen M., Holmbom B. 2003a. Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*, 57, 4: 359-372
- Willför S., Hemming J., Reunanen M., Eckerman C., Holmbom B. 2003b. Lignans and lipophilic extractives in Norway spruce knots and stemwood. *Holzforschung*, 57, 1: 27-36
- 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
- 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

## Viri

- Fang W.W., Hemming J., Reunanen M., Eklund P., Pineiro E.C., Poljanšek I., Oven P., Willför S. 2013. Evaluation of selective extraction methods for recovery of polyphenols from pine. *Holzforschung*, 67, 8: 843-851
- Jancinova V., Nosal R., Lojek A., Ciz M., Ambrozova G., Mihalova D., Bauerova K., Harmatha J., Perecko T. 2010. Formation of reactive oxygen and nitrogen species in the presence of pinosylvin - an analogue of resveratrol. *Neuroendocrinology Letters*, 31: 79-83
- Lindstedt G. 1951. Constituents of pine heartwood XXVI. A general discussion. *Acta Chemica Scandinavica*, 5: 129-138
- Park E.J., Park H.J., Chung H.J., Shin Y., Min H.Y., Hong J.Y., Kang Y.J., Ahn Y.H., Pyee J.H., Lee S.K. 2012. Antimetastatic activity of pinosylvin, a natural stilbenoid, is associated with the suppression of matrix metalloproteinases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 8: 946-952
- Plumed-Ferrer C., Vakevainen K., Komulainen H., Rautiainen M., Smeds A., Raitanen J.E., Eklund P., Willför S., Alakomi H.L., Saarela