

GDK: 84(045)=163.6

Prispelo / Received: 13.04.2011

Sprejeto / Accepted: 13.06.2011

Izvirni znanstveni članek

Original scientific paper

Določitev galne kisline, pirokatehola, floroglucinola, resorcinola in katehina s tankoplastno kromatografijo

Ida Poljanšek¹, Viljem Vek², Primož Oven³

Izvleček

Preučevali smo primernost šestih različnih zmesi topil – razvijalcev za ločitev enostavnih fenolnih spojin, kot so galna kislina, pirokatehol, floroglucionol, resorcinol, in sorodno spojino katehin s pomočjo tankoplastne kromatografije. Kot najbolj primerna sistema topil za ločitev komponent na stacionarni fazi silikagela na aluminijasti foliji sta se izkazala kloroform – etilacetat – očetna kislina (prostorninsko razmerje; 50 : 50 : 1) in toluen – acetonitril – mravljična kislina (prostorninsko razmerje; 70 : 30 : 1). Ločitev organskih spojin je bila učinkovitejša v sistemih topil, ki so imeli večji delež organskih topil. Spojine smo vizualizirali s pomočjo dveh reagentov, in sicer z železovim(III) kloridom in z vanilin-žveplovim reagentom.

Ključne besede: les, ekstraktivi, fenolne spojine, katehin, tankoplastna kromatografija, TLC, ločba

Thin-layer chromatography of gallic acid, pyrocatechol, phloroglucinol, resorcinol and catechin

Abstract

The suitability of six solvent systems for the thin-layer chromatographic separation of simple phenolic compounds such as gallic acid, pyrocatechol, phloroglucinol, resorcinol and related compound catechin were investigated. The most appropriate developing solvent systems for the separation of these organic compounds were chloroform – ethyl acetate – acetic acid (50 : 50 : 1) and toluene – acetonitrile – formic acid (70 : 30 : 1). The best separation of the five organic compounds was achieved using solvents with higher organic content. Detection was carried out using ferric chloride reagent and vanillin-sulphuric reagent.

Key words: wood, extractives, phenolic compounds, catechin, thin-layer chromatography, TLC, separation

1 Uvod

1 Introduction

Fenoli se v lesu, skorji in drugih organih drevesa pojavljajo v ligninski makromolekuli, ki je gradnik celičnih sten, in v snoveh zunaj ligno-celulozne celične stene. Slednje navadno označujemo z izrazom naravni produkti rastlin ali pa ekstraktivi. Večino fenolnih ekstraktivov lesa listavcev in iglavcev v prosti obliki najpogosteje najdemo v jedrovini in skorji, kot glikozide pa lahko tudi v beljavi (KAI 1991). Številne fenolne spojine imajo za rastline, in seveda tudi za drevesa, pomembne ekološke funkcije, ki izboljšujejo njihove preživitvene možnosti (TAIZ / ZEIGER 2002), bistveno pa določajo tudi lastnosti lesa (DINWOODIE 2000). Med fenolnimi ekstraktivi, izoliranimi iz lesa različnih vrst 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 / SMEDS / HOLMBOM 2006). Galna kislina, pirogalol in resorcinol so lahko razgradni produkti hidrolizirajočih taninov in/ali lignina (UMEZAWA 2000), katehin pa je monomerna enota kondenziranih taninov (FENGEL / LUDWIG 1989).

Pri raziskavah zveze med vsebnostjo in sestavo ekstraktivov ter lastnostmi lesa, variabilnostjo v razporeditvi ekstraktivov v lesu in skorji pri različnih drevesnih vrstah z enakih ali različnih rastišč je nastala potreba po hitri metodi za določitev posameznih spojin sicer različnih razredov fenolnih ekstraktivov (YUSIASIH *et al.* 2003).

Tankoplastno kromatografijo (TLC) uvrščamo v skupino planarnih separacijskih tehnik, pri kateri ločevanje posameznih komponent preiskovanega vzorca poteka

¹ doc.dr., I. P., UL, BF, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, ida.poljansek@bf.uni-lj.si

² V. V., mladi raziskovalec, univ. dipl. inž. les., UL, BF, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, viljem.vek@bf.uni-lj.si

³ izr. prof. dr., P. O., UL, BF, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, primoz.oven@bf.uni-lj.si

med potovanjem mobilne faze (razvijalca) po tanki plasti sorbenta, nanesenega na podlago, v našem primeru na aluminijasto folijo (PROŠEK / PUKL 1991; ZULE 2002). Ker so planarne tehnike običajno odprti sistemi, vpliva na ločevanje komponent vzorca tudi plinska faza v prostoru nad plastjo sorbenta. Plinska faza v kromatografski kadi mora biti nasičena s parami topil razvijalca. Če sta sorbent in razvijalec pravilno izbrana, se posamezne komponente vzorca pri potovanju po sorbentu ločijo, pri čemer separacija temelji na različnih interakcijah med molekulami vzorca, sorbenta in topil. Ločene komponente oziroma sestavine vzorca so na tankoplastnem kromatogramu vidne kot večji ali manjši madeži na plasti sorbenta med točko nanosa in mejo, do katere je pripotovala mobilna faza. Tako ločene komponente je mogoče opazovati v vidni ali v UV-svetlobi (WILLFÖR / SMEDS / HOLMBOM 2006). Selektivnost oziroma občutljivost metode je mogoče izboljšati z obdelavo razvitih plošč s primernim reagentom (npr. FeCl_3 ali vanilin-žveplova kislina), s katerim se orosi kromatografsko ploščo. Uporaba selektivnih reagentov omogoča tudi delno identifikacijo oziroma kvalitativno določitev posamezne znane komponente, na osnovi specifičnih reakcij pa se lahko sklepa tudi o osnovni zgradbi neznanih ločenih komponent iz vzorca in celo njihovih funkcionalnih skupinah (PROŠEK / PUKL 1991).

Namen študije je bil razvoj hitre metode za kvalitativno določitev in ločitev nekaterih fenolnih spojin, ki se redno pojavljajo v ekstraktih lesa in skorje različnih drevesnih vrst.

2 Material in metode

2 *Materials and methods*

Topila so bila analitske čistosti. Tankoplastne plošče so bile TLC Silica Gel 60 F_{254} (aluminijasta folija, 20 x 20 cm) proizvajalca Merck. S tankoplastno kromatografijo smo želeli ločiti šest fenolnih spojin, ki smo jih pripravili kot metanolne raztopine galne kisline monohidrata (Fluka, >98 %), pirokatehola (Merck, >99 %), floroglucinola (Sigma-Aldrich, >99 %), resorcinola (Kemika, p.a.) in katehina (Sigma-Aldrich, >98 %) z masno koncentracijo 4 mg mL^{-1} . Za vizualizacijo spojin na kromatografski plošči smo uporabili dva reagentna, raztopino FeCl_3 (Merck) in mešanico vanilina (Fluka) z žveplovo kislino (Carlo Erba, 96 %). Reagent železov(III) klorid smo pripravili tako, da smo raztopili 1g brezvodnega železovega klorida v 100 mL metanola. Vanilin-žveplov reagent smo pripravili z raztapljanjem 0,5 g vanilina v 10 mL žveplove kisline in etanola v prostorninskem razmerju 40 : 10.

Za razvijanje kromatografskih plošč smo uporabili sledeče mobilne faze (podana so prostorninska razmerja):

(I) Kloroform – metanol – očetna kislina (90 : 10 : 1)

(II) Petroleter – etilacetat – mravljična kislina (40 : 60 : 1)

(III) Kloroform – etilacetat – očetna kislina (50 : 50 : 1)

(IV) Toluen – acetonitril – mravljična kislina (70 : 30 : 1)

(V) Petroleter – metanol – očetna kislina (90 : 10 : 1)

(VI) Butan-1-ol – očetna kislina – voda (60 : 15 : 25)

(VII) Propan-1-ol – voda – očetna kislina (40 : 20 : 10)

(VIII) Butan-1-ol – voda – očetna kislina (40 : 20 : 10)

Mešanico topil za razvijanje kromatografskih plošč smo vedno pripravili dan pred uporabo.

Kromatografske plošče smo razvijali v posebnih kromatografskih kadeh, ki zagotavljajo ponovljivost rezultatov. Na dno kromatografske kadi smo nalili toliko mobilne faze, da je bila TLC-plošča med razvijanjem potopljena približno 5 mm. Pred razvijanjem kromatografskih plošč smo kadi kondicionirali 2 uri. Vzorce fenolnih spojin smo nato nanесли točkovno na kromatografsko ploščo s pomočjo steklene kapilare, ki omogoča nanašanje vzorcev volumna 5 μL . Vzorce smo nanесли 1 cm od spodnjega roba kromatografske plošče. Razmik med nanosi posameznih vzorcev na kromatografski plošči je bil 15 mm. Čas razvijanja plošče je bil približno 30 minut. Ko je mobilna faza pripotovala 10 mm pod zgornji rob, smo kromatografsko ploščo vzeli iz kadi ter jo posušili s tokom toplega zraka.

Razvito kromatografsko ploščo smo opazovali v vidni in UV-svetlobi. Ker določene komponente niso absorbirale svetlobe, smo jih vizualizirali z železovim(III) kloridom oziroma z vanilin-žveplovim reagentom. Nekatero lise so bile vidne že po orositvi z ustreznim reagentom. Po orositvi z železovim(III) kloridom smo kromatografske plošče segrevali v sušilniku 10 minut pri 110 °C, po orositvi z vanilin-žveplovim reagentom pa smo jih segrevali 20 minut pri 120 °C. Po reakciji z ustreznim reagentom so se lise izrazito obarvale v različnih odtenkih (tabela 1).

Kot smo že omenili, opisuje kromatografija ločevanje posameznih komponent preiskovanega vzorca zaradi različnih interakcij s stacionarno in mobilno fazo (PROŠEK / PUKL 1991). Med potovanjem se molekule topljencev za krajši ali daljši čas vežejo na stacionarno fazo. Položaj lis na plošči je odvisen od hitrosti potovanja posameznih komponent. Molekule, ki so se dalj časa zadrževale v mobilni fazi, so na plošči bliže fronti (zgornji del plošče), molekule, ki so bile dalj časa vezane na stacionarno fazo, pa so bliže startu. Položaj posameznih ločenih komponent pri TLC smo označili z vrednostjo R_F , zadrževalnim ali retenzijskim faktorjem (slika 1):

$$R_F = \frac{L_S}{L_0}$$

kjer je:

L_s razdalja od starta do sredine kromatografske lise / the distance travelled by the compound, from the start to the centre of the spot

L_0 razdalja, ki jo je od starta do fronte opravila mobilna faza / the total distance travelled by the solvent, from the start to the the solvent front

3 Rezultati in razprava

3 Results and discussion

V tabeli 1 so podani zadrževalni faktorji R_F enostavnih fenolnih spojin in katehina (slika 2) v različnih mobilnih fazah. Sistemi topil I, II, III in IV so se izkazali kot primerni za določitev galne kisline, pirokatehola in resorcinola.

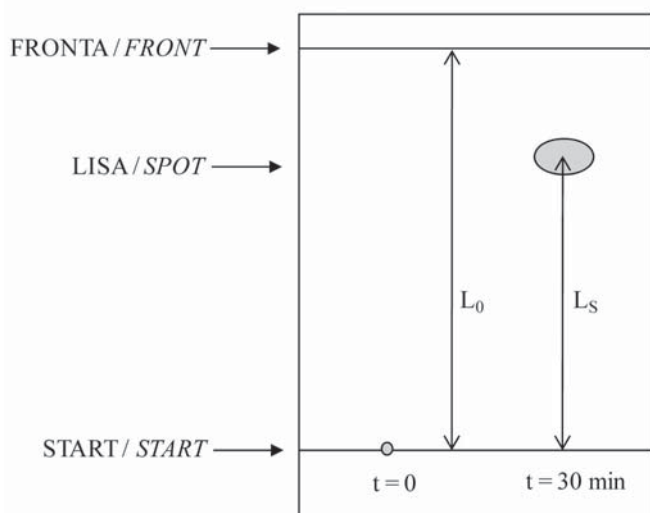
Tabela 1: Vrednosti zadrževalnih faktorjev (RF) enostavnih fenolnih spojin in katehina v različnih mobilnih fazah

Table 1: RF values for the simple phenolic compounds and catechin in different solvent systems

| Vzorec / Sample | R_F | | | | | | | | Detekcija / Visualization | |
|-----------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|--|---|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | FeCl ₃ reagent / FeCl ₃ reagent | Vanilin – žveplena kislina reagent / Vanillin – sulphuric acid reagent |
| Galna kislina / Gallic acid | 0,08 | 0,32 | 0,13 | 0,22 | 0,07 | 0,88 | 0,82 | 0,83 | Vijolična / Purple | Sivo-vijolična / Greyish purple |
| Floroglucinol / Phloroglucinol | 0,14 | 0,45 | 0,32 | 0,41 | 0,05 | 0,91 | 0,83 | 0,92 | Sivo-rjava / Greyish brown | Rumena / Yellow |
| Resorcinol / Resorcinol | 0,36 | 0,62 | 0,54 | 0,57 | 0,04 | 0,93 | 0,85 | 0,93 | Vijolično-modra / Purplish blue | Rdeče-oranžna / Reddish orange |
| Pirokatehol / Pyrocatechol | 0,46 | 0,64 | 0,55 | 0,61 | 0,06 | 0,92 | 0,84 | 0,90 | Zeleno-modra / Greenish blue | Sivo-vijolična / Greyish Purple |
| Katehin / Catechin | 0,07 | 0,25 | 0,09 | 0,21 | 0,07 | 0,92 | 0,84 | 0,88 | Sivo-zelena / Greyish green | Oranžna / Orange |

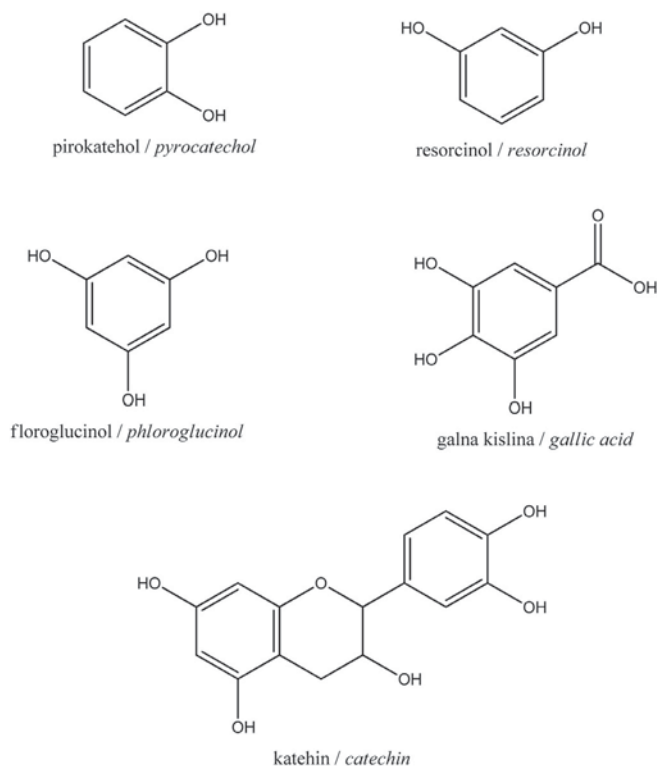
Slika 1: Zadrževalni ali retenzijski faktor (R_F) je enak kvocientu razdalje od starta do sredine kromatografske lise in razdalje, ki jo je od starta do fronte opravila mobilna faza.

Figure 1: Retention factor (R_F value) is determined by dividing the distance travelled by the compound by the total distance travelled by the solvent.



R_F vrednosti za katehin, galno kislino, pirokatehol, floroglucinol in resorcinol so podobne v sistemih topil I, II, III in IV, medtem ko se sistem topil petroleter – metanol – očetna kislina (90 : 10 : 1) kot razvijalec ni izkazal za primernega, saj ločba spojin ni bila zadovoljiva, vse analizirane spojine imajo skoraj enak R_F faktor. Prav tako so se razvijalci – sistemi topil – VI, VII, VIII izkazali za neprimerne mobilne faze, saj se vrednosti R_F analiziranih organskih spojin med seboj skorajda ne razlikujejo. Za ločitev katehina od drugih organskih komponent sta se kot najbolj primerna izkazala sistema zmesi topil petroleter – etilacetat – mravljična kislina (40 : 60 : 1) in kloroform – etilacetat – očetna kislina (50 : 50 : 1), prav tako pa tudi razvijalni sistem topil toluen – acetonitril – mravljična kislina (70 : 30 : 1) (sliki 3 in 4).

Galna kislina je imela podobno mobilnost kot katehin v vseh v našem poskusu uporabljenih sistemih topil – razvijalcih. Katehin in galna kislina se najbolje ločita v razvijalnem sistemu topil petroleter – etilacetat – mravljična kislina (40 : 60 : 1) in v sistemu topil kloroform – etilacetat – očetna kislina (50 : 50 : 1). Pirokatehol, floroglucinol in resorcinol se med seboj lepo ločijo v vseh sistemih topil, razen v zmesi petroleter – metanol – očetna kislina (90 : 10 : 1).



Slika 2: Kemijska struktura enostavnih fenolov in katehina

Figure 2: Chemical structures of the simple phenolic compounds and catechin.

V vseh razvijalnih sistemih topil je jasno izražena zveza med manjšim zadrževalnim faktorjem R_F in naraščajočim številom hidroksilnih skupin v molekuli (BARTON 1967; WEISSMAN 1973) (sliki 3 in 4).

Vse spojine lahko zaznavamo s pomočjo reagentov $FeCl_3$ in vanilin-žveplove kisline. TLC-plošče, ki jih orosimo s $FeCl_3$, imajo svetlo rumeno ozadje, ki omogoča odličen kontrast lisam različnih organskih spojin, barva ozadja in lis organskih spojin pa se obdrži dalj časa, če hranimo TLC-plošče pri sobni temperaturi (slika 3).

Reagent $FeCl_3$ hitro reagira z organskimi molekulami in tvori vijolično ali modro-zeleno barvo s fenoli, kot so galna kislina, pirokatehol, katehol, katehin, ki imajo v svoji strukturi vicinalne hidroksilne skupine (slika 3).

Barvni kompleks resorcinola in floroglucinola s $FeCl_3$ je bil pri sobni temperaturi komajda zaznaven s prostim očesom, šele pri segrevanju TLC-plošč pri 110 °C za 10 minut se pojavijo opazne lise organskih spojin (slika 3).

Reagent vanilin – žveplova kislina je bolj primeren za detekcijo spojin, kot so floroglucinol, resorcinol, katehin, ki imajo vsaj 2 hidroksilni skupini, ki sta vezani v meta ali para položaju in sta brez drugih substituentov na aromatskem obroču. Druge spojine lahko ugotovljamo z reagentom vanilin-žveplove kisline, ko segrejemo TLC-

ploščo na 120 °C za 20 minut. Tako se je izkazalo tudi v našem primeru, po orositvi TLC-plošč so se pojavili lepo obarvani madeži katehina, floroglucinola in resorcinola. Pri galni kislini in pirokateholu pa so opazne lise nastale šele po 20-minutnem segrevanju TLC-plošč pri temperaturi 120 °C (slika 4).

V kombinaciji s stacionarno fazo, ki smo jo uporabili v našem poizkusu, se sistemi topil VI, VII, in VIII, ki jih v literaturi pogosto navajajo kot primerne razvijalce, niso izkazali kot ustrezni sistemi mobilnih faz za ločitev posameznih organskih spojin med seboj (VOVK / SIMONOVSKA / VUORELA 2005; HOFMANN / ALBERT / RETFALVI 2004; SHARMA / T. K. BHAT / SINGH 1998; HOFMANN *et al.* 2008). Vrednosti R_F vseh analiziranih spojin so si med seboj zelo podobne, tako da ne moremo z gotovostjo trditi, katere komponente bi bile v neznanem vzorcu kakšnega lesnega ekstrakta (tabela 1). Za tovrstne raziskave so potrebne zahtevnejše kromatografske metode, kot so plinska kromatografija (GC) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC):

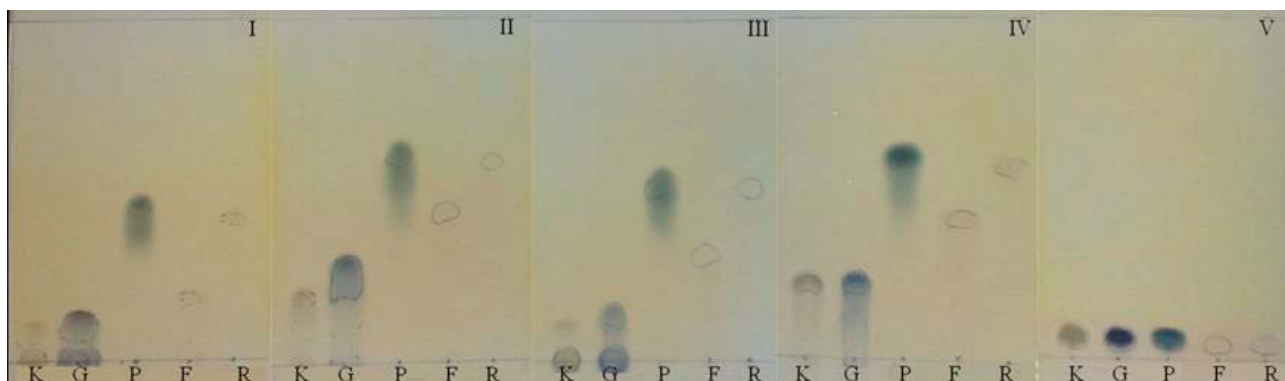
Predstavljeni TLC-sistem ima prednost v uporabi korozivnih reagentov, ki omogočajo širok izbor mobilnih sistemov – razvijalcev za ločitev in detekcijo velikega števila fenolnih komponent. Lise, ki jih dobimo, so zelo lokalizirane in kompaktne. Menimo, da je TLC primerna metoda za kvalitativno vrednotenje tudi drugih sistemov, kot se pojavljajo na širšem gozdarskem in lesarskem področju, najsi gre za onesnažila, iztrebke živali, produkte agresivnih modifikacij, npr. za material, kot je utekočinjen les, ekspresate drevesnega soka ali za kemično identifikacijo lesnih vrst (kemotaksonomija), bodisi za forenzične študije, pri katerih je vključen lignocelulozni material (SANDSTRÖM / NORBORG / ERICSSON 1996; HOFMANN *et al.* 2010).

4 Zaključki

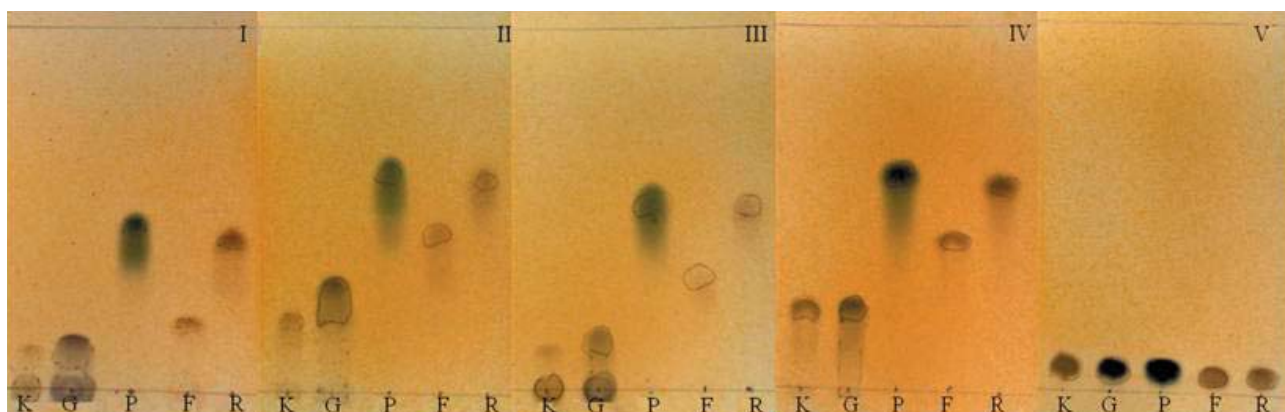
4 Conclusions

Preučevali smo primernost šestih različnih mešanic topil – razvijalcev za ločitev enostavnih fenolnih spojin, kot so galna kislina, pirokatehol, floroglucinol, resorcinol, in sorodno spojino katehin s pomočjo tankoplastne kromatografije.

Kvalitativna tankoplastna kromatografija je planarna separacijska analitska tehnika, ki omogoča hitro analizo in daje prve kvalitativne rezultate analiziranih vzorcev. Ločevanje komponent vzorca poteka med potovanjem mobilne faze po tanki plasti sorbenta, ki je bil v našem primeru silikagel, nanesen na aluminijasto folijo. Na ločevanje spojin vpliva, poleg sorbentov in sistema topil, tudi plinska faza v prostoru nad plastjo sorbenta. Izredno pomembno opravilo pri TLC-kromatografiji je nanašanje



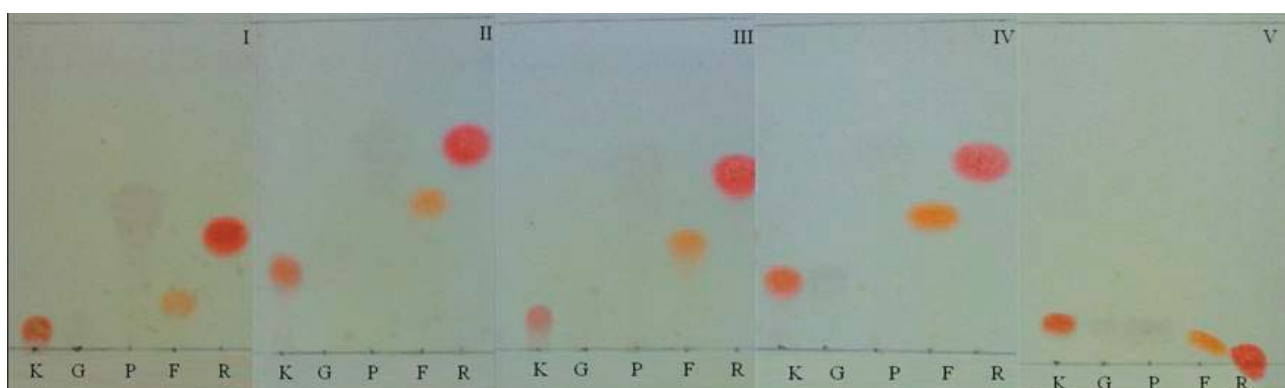
a) po orositvi s FeCl_3 / after spraying with FeCl_3



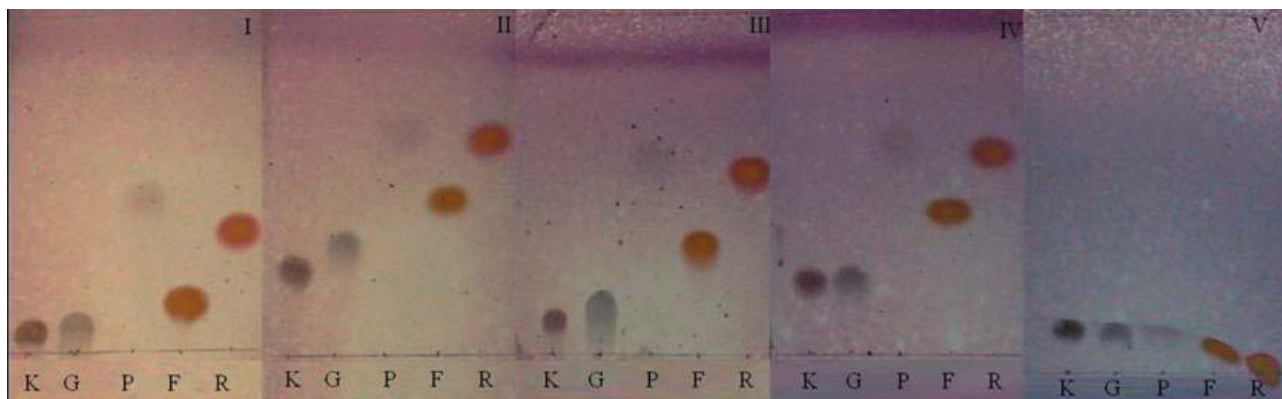
b) po orositvi s FeCl_3 in po 10-minutnem segrevanju v laboratorijskem sušilniku pri $110\text{ }^\circ\text{C}$ / after spraying with FeCl_3 and after 10-minute treatment at $110\text{ }^\circ\text{C}$

Slika 3: Tankoplastni kromatogrami (K) katehina, (G) galne kisline, (P) pirokatehola, (F) floroglucinola in (R) resorcinola v različnih sistemih topil (I-V); a) po orositvi s FeCl_3 ; b) po orositvi s FeCl_3 in po 10-minutnem segrevanju v laboratorijskem sušilniku pri $110\text{ }^\circ\text{C}$

Figure 3: TLC profile of (K) catechin, (G) gallic acid, (P) pyrocatechol, (F) phloroglucinol and (R) resorcinol in different solvent systems (I-V); a) after spraying with FeCl_3 ; b) after spraying with FeCl_3 and after 10-minute treatment at $110\text{ }^\circ\text{C}$



a) po orositvi z vanilin-žveplivim reagentom / after spraying with vanillin-sulphuric reagent



b) po orositvi z vanilin-žveplovim reagentom in po 20-minutnem segrevanju v laboratorijskem sušilniku pri 120 °C / after spraying with vanillin-sulphuric reagent and after 20-minute treatment at 120 °C

Slika 4: Tankoplastni kromatogrami (K) katehina, (G) galne kisline, (P) pirokatehola, (F) floriglucinola in (R) resorcinola v različnih sistemih topil (I-V); a) po orositvi z vanilin-žveplovim reagentom; b) po orositvi z vanilin-žveplovim reagentom in po 20-minutnem segrevanju v laboratorijskem sušilniku pri 120 °C

Figure 4: TLC profile of (K) catechin, (G) gallic acid, (P) pyrocatechol, (F) phloroglucinol and (R) resorcinol in different solvent systems (I-V); a) after spraying with vanillin-sulphuric reagent; b) after spraying with vanillin-sulphuric reagent and after 20-minute treatment at 120 °C

vzorcev. Pri rutinskem delu se največkrat uporabljajo steklene kapilare, s katerimi se v točko nanašajo volumni med 0,2 in 10 μ L. Razdalje med posameznimi nanosi morajo biti dovolj velike, da med razvijanjem ne prihaja do medsebojnega vpliva komponent sosednjih vzorcev. Najpomembnejše opravilo pri izvedbi TLC-postopka je razvijanje kromatograma. TLC-plošče se praviloma razvijajo v posebnih kromatografskih kadeh. Na dnu kadi mora biti toliko razvijalca, da je TLC-plošča med razvijanjem potopljena vanj približno 0,5 cm. Ko je plošča v kadi, prične mobilna faza zaradi kapilarnih sil potovati po plošči navzgor in s seboj nositi molekule komponent vzorca. Pri tem potovanju prihaja med molekulami vzorca, sorbenta in topili do različnih interakcij. Kadar sta sorbent in razvijalec pravilno izbrana, se komponente vzorca lepo ločijo.

V našem primeru sta se kot najbolj primerna sistema topil za ločitev komponent izkazala kloroform – etilacetat – očetna kislina (50 : 50 : 1) in toluen – acetonitril – mravljična kislina (70 : 30 : 1). Ločitev organskih spojin je bila učinkovitejša v sistemih topil, ki so imeli večji delež organskih topil. Spojine smo vizualizirali s pomočjo dveh reagentov, in sicer z železovim(III) kloridom in z vanilin-žveplovim reagentom.

5 Summary

We have investigated the suitability of six solvent systems for the thin-layer chromatographic (TLC) separation of simple phenolic compounds, such as gallic acid, pyrocatechol, phloroglucinol, resorcinol and related compound catechin.

Thin-layer chromatography is a simple and inexpensive technique and is particularly suitable for screening of a large number of samples and monitoring isolation procedures. TLC is routinely used for a first qualitative examination of plant extracts. Quantitative determination can be achieved by densitometric detection. The most used phase has been silica gel. Isolated TLC fractions can be identified by subsequent analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Most of the simple phenolic compounds absorb UV light and can thus be detected using 254 nm UV light. Spraying with 50% solution of sulphuric acid in ethanol is also commonly used.

We report R_f values on silica gel plates for eight solvent systems for gallic acid, pyrocatechol, phloroglucinol, resorcinol and related compound catechin. The trend for lower R_f values for increasing number of hydroxyl group is pointed out. The separation is governed mainly by the number of hydroxyl groups, but pyrocatechol and resorcinol with the same number of hydroxyl groups can also be separated. Identification of different organic compounds is facilitated by the specific colours obtained by spraying with sulphuric acid in ethanol followed by rapid heating in an oven.

The most appropriate developing solvent systems for the separation of these organic compounds were chloroform – ethyl acetate – acetic acid (volume ratio; 50 : 50 : 1) and toluene – acetonitrile – formic acid (volume ratio; 70 : 30 : 1). The best separation of the five organic compounds was achieved using solvents with higher organic modifier content. Detection was carried out using ferric chloride reagent and vanillin-sulphuric reagent.

6 Zahvala

6 Acknowledgements

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

7 Viri

7 References

- BARTON, G. M., 1967. Thin-layer chromatography of guaiacylpropane monomers, selected lignans and phenolic wood extractives. *Journal of Chromatography A* 26, 320-322.
- DINWOODIE, J., 2000. *Timber: Its nature and behaviour*. London, E & FN Spon, 257, s.
- FENGEL, D. / LUDWIG, M., 1989. On the Chemical-Composition of the Water Extracts from Fir Wood (*Abies-Alba-Mill*). *Holz Als Roh-Und Werkstoff* 47, 6: 223-226.
- 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.
- HOFMANN, T. / ALBERT, L. / RETFALVI, T. / VISI-RAJCZI, E. / BROLLY, G., 2008. TLC analysis of the in-vitro reaction of beech (*Fagus sylvatica* L.) wood enzyme extract with catechins. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* 21, 2: 83-88.
- HOFMANN, T. / RETFALVI, T. / ALBERT, L. / NIEMZ, P., 2010. High-Performance Thin-Layer Chromatographic Assessment of Thermally Modified Wood. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* 23, 3: 227-229.
- KAI, Y., 1991. *Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry*. Hon D.N.S. in Shiraishi N. (ur.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 215-255 s.
- PROŠEK, M. / PUKL, M., 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Ljubljana, Kemijski inštitut Boris Kidrič, Zavod Republike Slovenije za šolstvo in šport, 184, s.
- 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.
- SHARMA, O. P. / T. K. BHAT, T. K. / SINGH, B., 1998. Thin-layer chromatography of gallic, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid and tannic acid. *Journal of Chromatography A* 167-171.
- TAIZ, L. / ZEIGER, E., 2002. *Plant Physiology*. Sunderland, Sinauer Associates, 690, s.
- UMEZAWA, T., 2000. *Chemistry of Extractives. V: Wood and Cellulosic Chemistry*. Hon D.N.S. in Shiraishi N. (ur.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 213-241 s.
- VOVK, I. / SIMONOVSKA, B. / VUORELA, H., 2005. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography A* 1077, 2: 188-194.
- WEISSMAN, G., 1973. New Extract Resin from *Araucaria-Angustifolia*. *Holzforschung* 27, 6: 193-197.
- 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.
- ZULE, J., 2002. Metode karakterizacije lesnih ekstraktivnih spojin. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 67, 193-211.