



Technische Universität München



Wissenschaftszentrum
Weihenstephan

PD Dr. Thomas Letzel
Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse;
Technische Universität München
Weihenstephaner Steig 23 · 85354 Freising-Weihenstephan · Germany

Lehrstuhl für Chemisch-Technische
Analyse und Chemische Lebensmittel-
technologie

Herr Dr. Seegmüller
Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft
Hauptstrasse 16
67705 Trippstadt

Direktor:
Prof. Dr. Dr. Harun Parlar

Leiter der Analyt. Forschungsgruppe:
PD Dr. Thomas Letzel

Weihenstephaner Steig 23
85354 Freising-Weihenstephan
Germany
Lieferadresse: Maximus-von-Imhof Forum
2 Raum U 71

Tel +49.8161.71.3780
Fax +49.8161.71.4418
E-Mail: letzel@wzw.tum.de
www.wzw.tum.de/blm/cta;

Freising-Weihenstephan,
29. März 2011

Abschlussbericht zum Projekt:

Charakterisierung der Ellagtannine im Holz rheinland-pfälzischer Eichen

Das Projekt wurde in einer gemeinsamen Kooperation zwischen der Forschungsanstalt für Waldökologie und Forstwirtschaft (FAWF) in Trippstadt sowie der TU-München bearbeitet. Dabei lieferte die FAWF Extrakte aus Holzproben von einer rheinland-pfälzischen Eichen-Dauerbeobachtungsfläche und die TU-München untersuchte die Extrakte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie in Kopplung mit der Flugzeit-Massenspektrometrie (ESI TOF-MS).

Abweichend zur Projektskizze wurde die Quantifizierung von Vescalagin und Castalagin nicht mittels massenspektrometrischer Detektion durchgeführt sondern mittels UV- Detektion.

Dies ergab sich aufgrund hoher Matrixeinflüsse in der MS und demzufolge einer instabilen Detektion der Analyten. Desweiteren war die Sensitivität der UV- Detektion vollkommen ausreichend (1:10 Verdünnung der Extrakte). In Anlehnung an bekannte Literatur [1] wurde deshalb die im Methodenteil erwähnte Wellenlänge gewählt.

Wie in der Projektskizze beschrieben, wurden sämtliche Proben auch mit ESI TOF-MS vermessen um einen sogenannten „chemischen Fingerabdruck“ zu erhalten. Aufgrund der sehr komplexen (noch zu etablierenden) Auswertung mit einer neuen Analysesoftware (Mass Profiler Professional) steht die detaillierte Beurteilung der Proben noch aus.

Literatur

[1] Garcia-Estevez, I. et al., Analytica Chimica Acta, 660, (2010), 171-176

1) Verwendete Lösungen:

- 1a) Stammlösung Vescalagin 1mM in 50 % Methanol
- 1b) Stammlösung Castalagin 1mM in 50 % Methanol
- 1c) Kalib Mix 25 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1d) Kalib Mix 50 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1e) Kalib Mix 75 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1f) Kalib Mix 100 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1g) Kalib Mix 250 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1h) jeden Holzextrakt 1:10 mit 50 % Methanol, verdünnt

- 1i) Bu-4 1:10 25 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1j) Bu-4 1:10 50 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1k) Bu-4 1:10 75 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1l) Bu-4 1:10 100 μ M je Analyt in 50 % Methanol
- 1m) Bu-4 1:10 250 μ M je Analyt in 50 % Methanol

⇒ Bu-4 1:10 mit 50 % Methanol verdünnt und danach dotiert

- Alle Lösungen wurden vor der Abfüllung in ein HPLC-Vial über einen 0.2 μ m RC-Filter filtriert

2) Messmethode UHPLC-UV

Knauer PlatinBlue UHPLC-System

Säule: Blueorchid C18A (100 mm x 2 mm); 1.8 μ m

Fliessmittel A: Wasser + 1 % Essigsäure

Fliessmittel B: 90 % Methanol, 10% Wasser

Injection volume: 2 μ L

Fluss: 0.3 mL / min

Temperatur Autosampler: 15 °C

Temperatur Säulenofen: 20°C

Druckgradient UHPLC: 440 bar- 820 bar

Lösungsmittel-	0 min	0 % B
gradient:	1 min	0 % B
	10 min	50 % B
	13 min	50 % B
	15 min	100 % B
	20 min	100 % B
	21 min	0 % B
	30 min	0 % B

UV Detektion: Wellenlänge 1: 240 nm

Sampling rate: 50 Hz



3) Messmethode UHPLC ESI TOF-MS

Knauer PlatinBlue UHPLC-System

Säule: Blueorchid C18A (100 mm x 2 mm); 1.8 μm

Fliessmittel A: Wasser + 1 % Essigsäure

Fliessmittel B: 90 % Methanol, 10% Wasser

Injection volume: 2 μL

Fluss: 0.3 mL / min

Temperatur Autosampler: 15 °C

Temperatur Säulenofen: 20°C

Druckgradient UHPLC: 440 bar- 820 bar

Lösungsmittel-	0 min	0 % B
gradient:	1 min	0 % B
	10 min	50 % B
	13 min	50 % B
	15 min	100 % B
	20 min	100 % B
	21 min	0 % B
	30 min	0 % B

UV Detektion: Wellenlänge 1: 240 nm

Sampling rate: 50 Hz

Agilent TOF-MS (G6230A)

ESI Jet Stream positive mode

Gas temperature: 350°C

Drying Gas flow: 10 L min⁻¹

Nebulizer pressure: 45 psig

Sheath Gas Temperature: 400°C

Sheath Gas Flow: 9,5 L min⁻¹

Fragmentor: 150 V

PMT: 778 V

Skimmer: 65 V

Scan 100-3200 Da

4) Ergebnisse

4a) Robustheit Analytik (UHPLC-UV)

	Retentionszeit Vescalagin	Retentionszeit Castalagin
Anzahl Messpunkte (n)	40	40
Standardabweichung [%]	< 1	< 0,5

Konzentration [μM]	Standardabweichung Fläche Vescalagin [%] (n=8)	Standardabweichung Fläche Castalagin [%] (n=8)
25	12	18
50	29	11
75	7	9
100	10	6
250	6	3

- Nachweisgrenzen

Detektionslimit LOD: S/N 3:1

Quantifizierungslimit LOQ: S/N 10:1

Analyt	LOD [μM]	LOQ [μM]
Vescalagin	37.3	76.7
Castalagin	26.7	36.8

- Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde mittels Dotierungen auf den mitgelieferten Buchenholzextrakt ermittelt. Die Dotierungen erfolgten analog der Konzentrationen in der Kalibrierung.

Konzentration [μM]	calc. Konz [μM]	Wdf [%]
25	34	135
50	57	115
75	69	92
100	111	111
250	269	107

4b) Ergebnisse Holzextrakte – Quantifizierung (UHPLC-UV)

Rot eingefärbt, ist die jeweils höhere Konzentration pro Baum.

Angegeben sind die Mittelwerte aus 3 Parallelaufarbeitungen mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Vescalagin

Baum Nr.	2	4	5	6	8	9	11	14	15	30	3	7
oben MW Konz. [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	422	296	716	668	424	484	501	600	528	352	---	---
unten MW Konz. [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	685	519	575	1132	549	408	748	521	483	403	444	742

Stabw [$\mu\text{g}/50\text{mg}$] oben/unten	< 61/ < 51	< 45/ < 40	< 6/ < 10	< 75/ < 7	< 16/ < 37	< 15/ < 42	< 38/ < 70	< 48/ < 15	< 7/ < 71	< 19/ < 40	---/ < 93	---/ < 14
Stabw [%] oben/unten	< 15/ < 7	< 15/ < 8	< 1/ < 2	< 11/ < 1	< 4/ < 7	< 3/ < 10	< 8/ < 9	< 8/ < 3	< 1/ < 15	< 5/ < 10	---/ < 21	---/ < 2

Castalagin

Baum Nr.	2	4	5	6	8	9	11	14	15	30	3	7
oben MW Konz. [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	321	229	582	454	299	332	311	433	350	245	---	---
unten MW Konz. [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	443	366	385	760	338	274	508	287	342	289	243	633

Stabw [$\mu\text{g}/50\text{mg}$] oben/unten	< 40/ < 6	< 25/ < 39	< 7/ < 25	< 24/ < 10	< 11/ < 37	< 33/ < 14	< 15/ < 5	< 16/ < 14	< 24/ < 31	< 12/ < 18	---/ < 3	---/ < 7
Stabw [%] oben/unten	< 12/ < 1	< 11/ < 11	< 1/ < 7	< 5/ < 1	< 4/ < 11	< 10/ < 5	< 5/ < 1	< 4/ < 5	< 7/ < 9	< 5/ < 6	---/ < 1	---/ < 1

Detaillierte Auswertung siehe Anhang: UHPLC-UV_Kalibration_070311/_080311/_090311

4c) Ergebnisse Holzextrakte – Statistik (UHPLC-UV)

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von allen untersuchten Bäumen jeweils oben und unten. Bei der Berechnung von Vescalagin unten und Castalagin unten wurde die Probe 10 (Baum 6) unberücksichtigt gelassen, da dort eine viel höhere Konzentration von Vescalagin bzw. Castalagin ermittelt wurde (siehe unter 4b) Tabelle Vescalagin bzw. Castalagin).

Vescalagin oben

MW [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [%]
499	133	27

Vescalagin unten

MW [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [%]
552	129	23

Castalagin oben

MW [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [%]
356	104	29

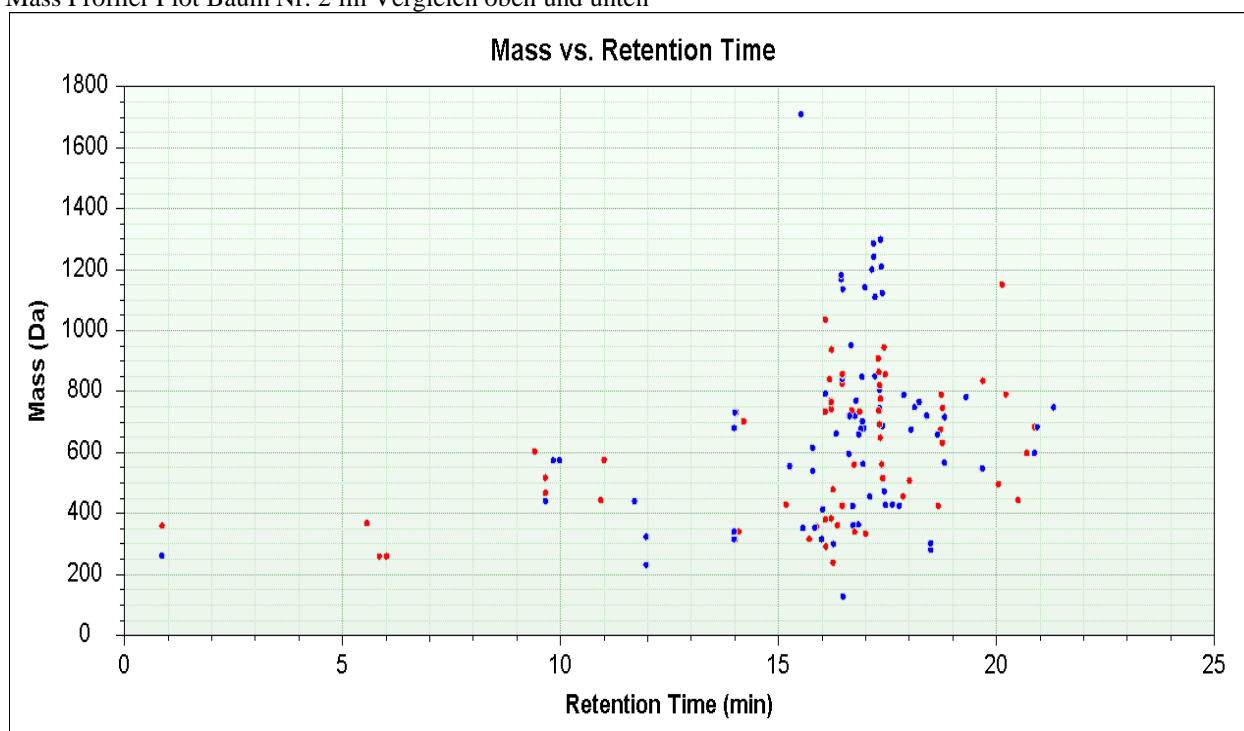
Castalagin unten

MW [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [$\mu\text{g}/50\text{mg}$]	Stabw [%]
374	113	30

Detaillierte Auswertung siehe Anhang: UHPLC-UV_Kalibration_070311/_080311/_090311

4d) chemischer Fingerabdruck (UHPLC-ESI TOF-MS)

Mass Profiler Plot Baum Nr. 2 im Vergleich oben und unten



Rot = Probe 8 (Baum 4 oben)

Blau = Probe 15 (Baum 4 unten)

Bei einem Mass Profiler Plot wird die Masse der Retentionszeit gegenübergestellt. Dabei beschreibt jeder Punkt einen Analyten mit der korrespondierenden Retentionszeit, der akkuraten Masse und dessen Intensität.

Aufgrund der noch zu entwickelnden Auswerttechnik ist momentan nur die bildgebende Darstellung möglich.

Somit können noch keine vergleichenden Aussagen getätigt werden, da die Datenerkennung, der Datenexport sowie die Nutzung der exportierten Daten noch nicht valide möglich sind.



Zusammenfassung

Die UHPLC-UV Methode zur Quantifizierung der Analyten Vescalagin und Castalagin ist sehr robust. Eine eindeutige Tendenz über erhöhte Konzentrationen am Kronenansatz (oben) bzw. am Stammfuss (unten) ist nicht erkennbar. Die Abweichung zwischen allen bisher gemessenen Bäumen beträgt 27 % bzw. 29 % für Vescalagin oben bzw. Castalagin oben und 23 % bzw. 30 % für die beiden Analyten unten, wobei dort Probe 10 (Baum 6) aufgrund erhöhter Werte nicht eingerechnet wurde.

In einem anschliessenden, geplanten Projekt sollen weitere Bäume quantifiziert und ein chemischer Fingerabdruck erstellt werden. Zur detaillierten Auswertung des chemischen Fingerabdrucks ist neben dem visuellen Ergebnis, eine softwarebasierte Etablierung und Validierung, hinsichtlich Datenerkennung, Datenexport und Nutzung der Daten, aller gemessenen Holzextrakte durchzuführen.

Wir danken für die erfolgreiche Zusammenarbeit und freuen uns auf weitere, gemeinsame Projekte.

Liebe Grüße aus Freising!