HAL
open science

Structure and oligomers distribution of commercial Tara (Caesalpina spinosa) hydrolysable tannin

Samuele Giovando, Antonio Pizzi, Harald Pasch, Naomi Pretorius

To cite this version:

Samuele Giovando, Antonio Pizzi, Harald Pasch, Naomi Pretorius. Structure and oligomers distribution of commercial Tara (Caesalpina spinosa) hydrolysable tannin. PRO LIGNO - Open Access Scientific Journal in the Field of Wood Engineering, 2013, 9 (1), pp.22-31. hal-01596680

HAL Id: hal-01596680

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01596680v1

Submitted on 28 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ONLINE ISSN 2069-7430
ISSN-L 1841-4737

PRO LIGNO
www.proligno.ro

Vol. 9 N° 1 2013
pp. 22-31

STRUCTURA ŞI DISTRIBUȚIA OLIGOMERILOR TANINULUI HIDROLIZABIL DIN SPECIA LEMNOASĂ TARA (*Caesalpina spinosa)*

STRUCTURE AND OLIGOMERS DISTRIBUTION OF COMMERCIAL TARA (*Caesalpina spinosa*) HYDROLYSABLE TANNIN

Samuele GIOVANDO
Dr. - Silva Chimica
Adresa/Address: Via Torre 7, San Michele Mondovi (CN), Italy

Antonio PIZZI*
Prof.Dr. - LERMAB, ENSTIB, University of Lorraine, Epinal, France
Adresa/Address: 27 rue Philippe Seguin, BP 1041, 88051 Epinal cedex 9, France
Tel.: (+33) 329296117. E-mail: antonio.pizzi@enstib.uhp-nancy.fr

Harald PASCH
Prof. - Polymer Research Institute, University of Stellenbosch
Adresa/Address: Stellenbosch, South Africa

Naomi PRETORIUS
Mrs. - Polymer Research Institute, University of Stellenbosch
Adresa/Address: Stellenbosch, South Africa

Rezumat:
Taninul extras cu solvent din specia lemnoasă tara (sortiment comercial) a fost examinat printr-o tehnică de spectroscopie de masă asistată de desorpție/ionizare cu laser (MALDI-TOF) şi cromatografie de lichide la presiune ridicată (HPLC). A rezultat că extractul de tara este compus dintr-o serie de oligomeri ai acidului poligalic legați printr-o legătură esterică de acidul quinic. Aceştia constituie oligomerii în proporție ridicată în compoziția taninului. Sunt prezente de asemenea şi alte lanțuri de acid poligalic legate de una sau două unitați repetate, reprezentate de acidul cafeic şi acizii quinic metilat, galic metilat, cafeic metilat. Modul ion negativ MALDI-TOF a arătat că unele reziduuri de carbohidrați ar fi încă prezente, legate de materialul polifenolic al extractului, dar proporția acestora este foarte scăzută, cum era de aşteptat la taninul extras cu solvent.

Cuvinte cheie: *extract de tara; tanin; taninuri hidrolizabile; structură; lemn; MALDI; HPLC; oligomeri poligalici; acid quinic; Caesalpina spinosa.*

INTRODUCERE

Încă de la introducerea sa de către Karas şi Hillenkamp în 1987, tehnica de ionizare utilizată în spectroscopia de masă (MALDI) a extins considerabil utilizarea spectroscopiei de masă către studiul moleculelor mari şi s-a dovedit a fi o metodă avansată pentru caracterizarea atât a polimerilor sintetici, cât şi a celor naturali (Bahr *ş.a.* 1992, Ehring *ş.a.* 1992, Danis *ş.a.* 1992, Danis şi Karr 1993, Pasch şi Resch 1996, Pasch şi Gores 1995).

Abstract:
Solvent extracted commercial Tara tannin extract have been examined by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The Tara extract has been found to be composed of a series of oligomers of polygallic acid attached by an ester link to one quinic acid. They constitute the oligomers in higher proportion in the extract. Other polygallic chains linked to one only or two repeating units such as caffeic acid and methylated quinic, methylated gallic and methylated caffeic acids are also present. Negative ion mode MALDI-TOF showed that some carbohydrate residues appear to still be present, linked to the polyphenolic material of the extract but their proportion is very low as would be expected of a solvent extracted tannin.

Key words: *Tara extract; tannin; hydrolysable tannins; structure; wood; MALDI; HPLC; polygallic oligomers; quinic acid; Caesalpina spinosa.*

INTRODUCTION

Since its introduction by Karas and Hillenkamp in 1987, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) mass spectrometry has greatly expanded the use of mass spectrometry towards large molecules and has revealed itself to be a powerful method for the characterization of both synthetic and natural polymers (Bahr *et al.* 1992, Ehring *et al.* 1992, Danis *et al.* 1992, Danis and Karr 1993, Pasch and Resch 1996, Pasch and Gores 1995). Fragmentation of analyte molecules upon laser irradiation can be

* Autor corespondent / Author to whom all correspondence should be addressed

Fragmentarea moleculelor de analit prin iradierea laser poate fi redusă în mod substanțial, prin înglobarea lor într-o matrice ce absoarbe lumina. Ca urmare, molecule intacte de analit se desorb şi ionizează împreună cu matricea şi pot fi analizate cu un spectrometru de masă. Această tehnică de ionizare blândă este combinată cu precădere cu analizoare de masă TOF (viteza ionilor – timpul de zbor depinde de masa particulelor). De aceea, spectroscopia TOF-MS prezintă o serie de avantaje, cum ar fi: capacitatea de a furniza un spectru de masă complet per probă, un domeniu nelimitat de masă, cantitatea mică de analit necesară şi costul relativ scăzut al echipamentului. Recent această tehnică s-a dovedit utilă pentru elucidarea structurii taninurilor naturale complexe, precum taninurile flavonoide condensate (Pasch *ş.a.* 2001, Yeoh Beng Hoong *ş.a.* 2010, Navarrete *ş.a.* 2010, Oo *ş.a.* 2009) şi taninurile hidrolizabile (Pasch şi Pizzi 2002, Pizzi *ş.a.* 2009).

Taninul de tara este un agent tanant pentru pielărie, apreciat în mod particular prin culoarea lui foarte deschisă, culoare pe care o imprimă şi pielii tratate cu acesta. Acesta este un produs comercial obținut prin extracția cu solvenți din păstăile arborelui *Caesalpina spinosa,* această industrie fiind dezvoltată în Peru. Taninul de Tara este un exponent important al familiei taninurilor hidrolizabile derivate din lemn, coajă sau alte materii vegetale (Haslam 1966). Cu toate că structura aproximativă a acestui tanin este ştiută, există doar câteva publicații referitoare la structura sa (Garro Galves *ş.a.* 1997, Armitage *ş.a.* 1961). Dată fiind valoarea lui ridicată nu s-a încercat niciodată o investigare detaliată şi o distribuție a oligomerilor în acest extract hidrolizabil.

Această lucrare examinează în detaliu aceste aspecte prin HPLC şi metoda spectroscopiei de masă MALDI-TOF.

STUDIUL EXPERIMENTAL

Spectroscopia de masă MALDI-TOF a fost realizată pe probe în condiții prezentate mai jos.

Metoda MALDI-TOF-MS

Spectrul a fost înregistat pe un instrument tip Shimadzu Biotech AXIMA TOF 2. Sursa de iradiere a fost un laser pulsatoriu cu azot cu lungimea de undă de 337nm. Lungimea unui puls de laser a fost de 3ns. Măsurătorile au fost fost realizate utilizând următoarele condiții: polaritate pozitivă, deplasare liniară, puterea (voltaj 20kV), 100-150 pulsuri per spectru. Tehnica de extracție întârziată a fost folosită aplicând timpi de întârziere de 200-800ns.

Pregătirea probelor pentru metoda MALDI-TOF

Proba a fost dizolvată în acetonă (4mg/mL, acetonă 50% vol. soluție apoasă). Soluția cu proba a fost amestecată cu o soluție de acetonă (10mg/mL în acetonă) a matricei. Ca matrice s-a folosit acid 2,5 - dihidroxi benzoic. Pentru intensificarea formării

substantially reduced by embedding them in a light absorbing matrix. As a result intact analyte molecules are desorbed and ionized along with the matrix and can be analysed in a mass spectrometer. This soft ionization technique is mostly combined with time-of-flight (TOF) mass analysers. This is so as TOF-MS present the advantage of being capable to provide a complete mass spectrum per event, for its virtually unlimited mass range, for the small amount of analyte necessary and the relatively low cost of the equipment. Recently this technique has proved particularly useful for the elucidation of the structure of complex natural tannins such as condensed flavonoid tannins (Pasch *et al.* 2001, Yeoh Beng Hoong *et al.* 2010, Navarrete *et al.* 2010, Oo *et al.* 2009) and of hydrolysable tannins (Pasch and Pizzi 2002, Pizzi *et al.* 2009).

Tara tannin is a valuable tanning agent for leather particularly appreciated for its very light colour and the very light colour it imparts to leather prepared with it. It is commercially derived by solvent extraction of the pods of *Caesalpina spinosa*, this industry being particularly developed in Peru. It is an important exponent of the family of hydrolysable tannins derived from wood, bark and other vegetable matter (Haslam 1966). While the approximate structure of this tannin has been known there are only very few publications relating to its structure (Garro Galves *et al.* 1997, Armitage *et al.* 1961). Considering its high value a detailed investigation and distribution of the oligomers in this hydrolysable extract has never been undertaken.

This paper examines in detail these aspects by HPLC and by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

EXPERIMENTAL

The Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was carried out on this sample according to the following conditions.

MALDI-TOF-MS

The spectrum was recorded on a Shimadzu Biotech AXIMA TOF 2 instrument. The irradiation source was a pulsed nitrogen laser with a wavelength of 337nm. The length of one laser pulse was 3ns. The measurements were carried out using the following conditions: polarity-positive, flight path-linear, mass-high (20kV acceleration voltage), 100-150 pulses per spectrum. The delayed extraction technique was used applying delay times of 200-800ns.

MALDI-TOF Sample Preparation

The sample was dissolved in acetone (4mg/mL, acetone 50% vol. water solution). The sample solution was mixed with an acetone solution (10mg/mL in acetone) of the matrix. As the matrix 2,5 - dihydroxy benzoic acid was used. For the

ionilor s-a adăugat în matrice NaCl (10mg/ml în apă). Soluțiile cu probă şi matricea au fost amestecate în proporție de 3 părți soluție de matrice + 3 părți soluție de polimer + 1 parte soluție de NaCl şi probe de 0,5 la 1µL din soluția rezultată prin amestecare au fost plasate în ținta MALDI. După evaporarea solventului MALDI a fost introdus în spectrometru. S-a utilizat metoda de pregătire a probei cu picătura uscată.

Pentru a obține masa moleculară a componentelor chimice corespunzătoare maximelor din spectrul de masă înregistrat în modul pozitiv, din valoarea acestor maxime trebuie să fie extrasă valoarea 23Da (1Da = 1,660 538 86 (28)×10^{-27} kg) corespunzătoare ionilor Na^+ din matrice

Spectrul obținut şi interpretarea rezultatelor sunt prezentate în Fig. 1-3, 6 şi Tabelul 1.

Înălțimea maximelor de absorbție din spectrul MALDI-TOF este proporțională cu numărul de molecule care formează acel vârf, de aceea, pentru a caracteriza substanța din punct de vedere cantitativ, cantitatea este multiplicată cu masa moleculară a structurii corespunzătoare.

Cromatografia de lichide la presiune ridicată (HPLC)

HPLC din extractul de tara s-a realizat în următoarele condiții:

- s-a folosit apă ultra-pură (tratată cu un sistem Millipore Milli-Q sau similar);
- sistem HLPC Waters Alliance;
- Coloana: Merck – LiChroCART 125-4 – Lichrospher 100 RP-18 (5µm);
- Detector: Waters 2996 PDA;
- Faza mobilă:

A: Soluții apoase $(NH_4)_2HPO_4$ / H_3PO_4.

S-au cîntărit la o balanță analitică 5.765g de H_3PO_4 şi 6.603g de $(NH_4)_2HPO_4$ într-un pahar de măsură de 100 ml şi s-a umplut cu apă. Soluția a fost ulterior diluată 1:100 cu apă (10ml de soluție concentrată la 1000ml într-un balon cotat).

B: Acetonitril – grad de puritate HPLC

C: Acetonitril / Apă 1:1

500 ml de apă la 1000 ml soluție acetonitril, preparată în balon cotat

- eliberare solvent: Waters 2695.
- Eluție (procedeu chimic de eliberare a unei substanțe de pe absorbantul său prin spălare): vezi Tabelul 1.

enhancement of ion formation NaCl was added to the matrix (10mg/ml in water). The solutions of the sample and the matrix were mixed in the proportions 3 parts matrix solution + 3 parts polymer solution + 1 part NaCl solution and 0.5 to 1µL of the resulting solution mix were placed on the MALDI target. After evaporation of the solvent the MALDI target was introduced into the spectrometer. Dry droplet sample preparation method was used.

To each peak value in the resulting positive mode spectrum must be subtracted of 23Da of the Na^+ of the matrix to obtain the molecular weight of the chemical species of the peak.

The Spectrum obtained and the interpretation of the peaks are shown in Figs. 1-3, 6 and in Table 1.

The height of a MALDI-TOF peak is proportional to the numbers of molecules giving that peak, therefore, in order to characterize the substance quantitatively, the amount is multiplied by the molecular weight of the corresponding structure.

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC of tara extract was done under the following conditions:

- ultrapure water was used(treated with Millipore Milli-Q system or similar);
- HPLC system Waters Alliance;
- Column: Merck – LiChroCART 125-4 – Lichrospher 100 RP-18 (5µm);
- Detector: Waters 2996 PDA;
- Mobile phase:

A: Aqueous solution $(NH_4)_2HPO_4$ / H_3PO_4.

Using an analytical balance weight exactly 5.765 g of H_3PO_4 and 6.603g of $(NH_4)_2HPO_4$ in a 100 ml glass measuring flask and fill with water. Solution is further diluted 1:100 with water (10 ml of concentrated solution to 1000 ml in volumetric flask).

B: Acetonitrile HPLC grade

C: Acetonitrile / Water 1:1

500 ml of water to 1000 ml acetonitrile solution in volumetric flask

- Solvent delivery: Waters 2695.
- Elution: see Table 1.

Tabelul 1/ Table 1

	TIMP/TIME[1]	DEBIT/FLOW[2]	% A	% B	% C	% D	CURV
1		1,00	95	5	0	0	
2	25	1,00	35	65	0	0	7

[1] minutes - [2] mL/min

- Gestionare date : Waters – Empower 2.

- Data handling: Waters – Empower 2.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

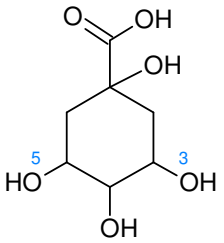
Înălțimea vârfului spectrului MALDI-TOF este proporțională cu numărul de molecule care determină acel vârf, prin urmare, pentru a cuantifica

RESULTS AND DISCUSSION

The height of a MALDI-TOF peak is proportional to the numbers of molecules giving that peak, therefore, in order to quantify the polymeric

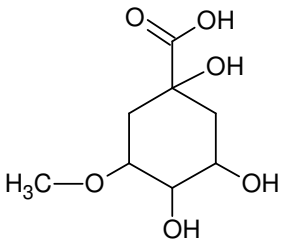
fracția polimerică prin masă, intensitatea relativă a vârfului trebuie să fie multiplicată de masa moleculară a structurii corespunzătoare. Se cunosc un număr de monomeri diferiți care fac parte din structura extractului de tara. Aceştia sunt:

Q =



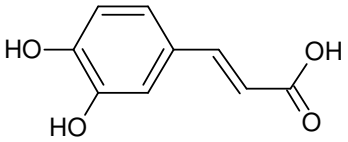
Acid quinic/Quinic acid

MQ =



Acid quinic metilat / Methylated Quinic acid

C =



Acid cafeic / Caffeic Acid

Moleculele de acid quinic şi galic sau structurile metilate sunt legate între ele printr-o grupare esterică formată între gruparea acidă a acidului galic şi gruparea alcoolică a acidului quinic. Acelaşi tip de legătură se formează între gruparea acidă a acidului cafeic şi gruparea alcool a acidului quinic (ca şi la acidul clorogenic) sau structurile metilate corespunzătoare.

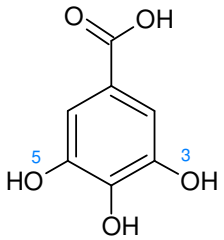
În secvența moleculelor de acid galic (structuri de acid poligalic), o moleculă este legată de altă moleculă prin gruparea ester dintre gruparea acidă a unuia şi gruparea alcool a altui acid galic.

În Fig. 1-3 sunt prezentate spectrele în mod pozitiv MALDI-TOF ale extractului de tara. Se poate observa că în acest tanin hidrolizabil sunt prezente molecule repetate de 152Da de acid galic.

Tabelul 2 indică interpretarea spectrelor MALDI-TOF din extract de tara ce rezultă din Fig. 1-3.

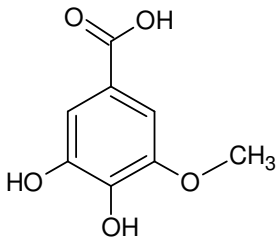
fraction by weight, the peak relative intensity has to be multiplied by the molecular weight of the corresponding structure. A number of different monomers are known to take part in the structure of Tara extract. These are:

G =



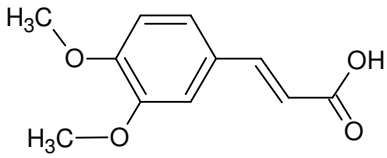
Acid galic / Gallic acid

MG =



Acid galic metilat / Methylated Gallic acid

DC =



Acid cafeic di-metilat / Dimethylated Caffeic acid

Quinic acid and gallic acid units, or the corresponding methylated structures, are linked together by an ester group between the acid group of the gallic acid and an alcoholic group of the quinic acid. The same type of linkage is formed between the acid group of caffeic acid with an alcohol group of the quinic acid (as in chlorogenic acid) or their correspondent methylated structures.

In the sequences of gallic acid units (polygallic acid structures), one unit is linked with another by an ester group between the acid group of one and the alcoholic group of another gallic acid.

In Fig. 1 to 3 are reported the positive MALDI-TOF spectra of Tara extract. It can be observed that in this hydrolysable tannin repeating units of 152Da (gallic acid unit) are present.

Table 2 shows the interpretation of the MALDI-TOF spectra of Tara extract derived from Figs. 1 to 3.

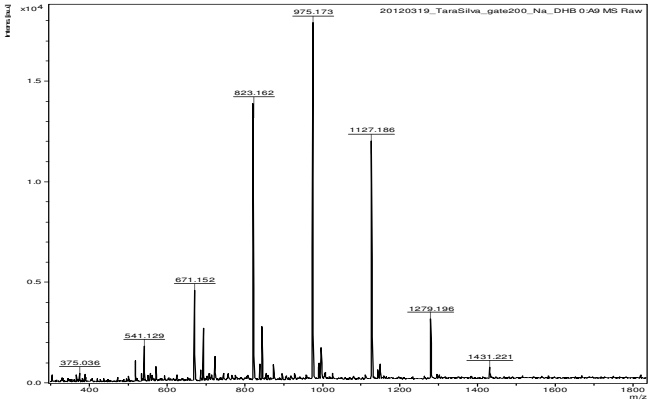


Fig. 1.
Spectrul de masă MALDI-TOF a taninului comercial de tara extras cu solvent (mod pozitiv cu NaCl); domeniul de masă: 300-1850Da / MALDI-TOF (positive mode with NaCl) of solvent-extracted commercial Tara tannin extract; mass range: 300-1850Da.

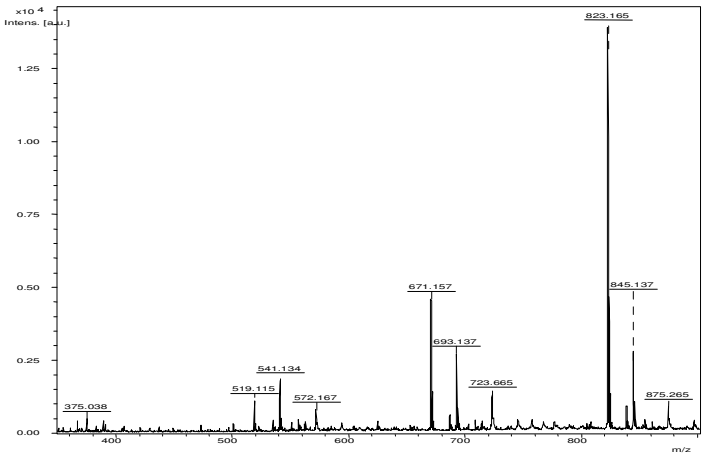


Fig. 2.
Spectrul de masă MALDI-TOF a taninului comercial de tara extras cu solvent (mod pozitiv cu NaCl); detaliu pentru domeniul de masă: 390-900Da / MALDI-TOF (positive mode with NaCl) of solvent-extracted commercial Tara tannin extract; zoomed range: 350-900Da.

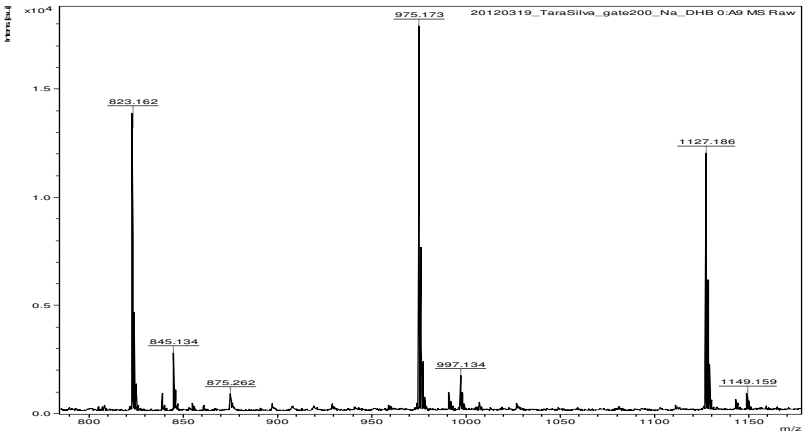


Fig. 3.
Spectrul de masă MALDI-TOF a taninului comercial de tara extras cu solvent (mod pozitiv cu NaCl); detaliu pentru domeniul de masă: 785-1175Da / MALDI-TOF (positive mode with NaCl) of solvent-extracted commercial Tara tannin extract; zoomed range: 785-1175Da.

Tabelul 2 / Table 2

***Interpretarea maximelor spectrale ale extractului de tara cu solvent obținute prin metoda* MALDI-TOF / MALDI-TOF peaks interpretation for Tara solvent extract**

M+Na+ (exp)		Structura moleculară / Molecular structure	Număr de molecule monomerice/Number of monomeric units	Proporții relative Date primare/Relative Proportions Raw data	Proporții relative % de masă/Relative Proportions % by weight
351.2		G-Q (negative ion mode)	2	2	0.1%
368.7		G-Q (negative ion mode)	2	2	0.1%
375,0		C-Q (Chlorogenic acid)	2	4	0,3%
519,1		Q-G-G	3	9	0,8%
541,1		Q-Q-G	3	15,5	1,5%
572,1		DC-Q-MG	3	6,5	0,7%
671,1		Q-G-G-G	4	40,5	4,8%
685,2		MQ-G-G-G	4	4,5	0,5%
693,1		Q-Q-G-G	4	23	2,8%
723,6		DC-Q-G-MG	4	10,5	1,4%
823,1		Q-G-G-G-G	5	124	18,2%
837,2		MQ-G-G-G-G	5	7	1,0%
845,1		Q-Q-G-G-G	5	24	3,6%
875,2		DC-Q-G-G-MG	5	7	1,1%
975,1		Q-G-G-G-G-G	6	160,5	28,1%
989,2		MQ-G-G-G-G-G	6	7	1,2%
997,1		Q-Q-G-G-G-G	6	14	2,5%
1127,1		Q-G-G-G-G-G-G	7	107	21,7%
1141,2		MQ-G-G-G-G-G-G	7	4	0,8%
1149,1		Q-Q-G-G-G-G-G	7	6,5	1,3%
1279,1		Q-G-G-G-G-G-G-G	8	27	6,2%
1431,2		Q-G-G-G-G-G-G-G-G	9	5	1,3%
				TOTAL	**100%**

Vârfurile de 519, 671, 823, 975, 1127, 1279 şi 1431Da (Tabelul 2) din extractul de tara reprezintă principala serie de structuri care sunt esterii acidului quinic cu incremente de masă de 152Da.

Vârfurile de 541, 693, 845, 997 şi 1149Da (Tabelul 2) reprezintă a doua serie de esteri constând din două molecule de acid quinic şi o secvență de molecule de acid galic având incremente de masă de 152Da.

Vârfurile de 375, 572, 723 şi 875Da (Tabelul 2) aparțin unei alte serii minore în care acidul clorogenic (acid quinic+acid cafeic) este legat de o secvență de molecule de acid galic. Unele molecule sunt parțial metilate.

Vârfurile de 685, 838, 990, 1142 (culoare roz in Tabelul 2) aparțin unei alte serii minore în care o secvență de molecule de acid galic este legată de acid quinic metilat.

Din toate cele de mai sus şi incremental evident repetat de 152Da al masei moleculare în seria principală de oligomeri se pare că taninul comercial de tara extras cu solvent conține în principal taninuri hidrolizabile compuse din galotaninuri, în care structura acidului poligalic este esterificată în acid quinic (Fig. 4).

The peaks at m/z of 519, 671, 823, 975, 1127, 1279 and 1431Da (Table 2) in the Tara extract represent the main series of structures that are esters of quinic acid with the mass increments of 152Da.

The peaks at m/z of 541, 693, 845, 997 and 1149Da (Table 2) represent a second series of esters consisting of two quinic acid units and a sequence of gallic acid units having a mass increment of 152Da.

The peaks at m/z of 375, 572, 723 and 875Da (Table 2) belong to another minor series where a chlorogenic acid (quinic acid + caffeic acid) is linked with a sequence of gallic acid units. Some units are partially methylated.

The peaks at m/z of 685, 838, 990, 1142 (pink series in Table 2) belong to another minor series where the sequence of gallic acid units is linked with a methylated quinic acid.

From all the above and the evident 152Da repeating jump in molecular weight in the main series of oligomers it appeared that solvent extracted commercial Tara tannin contains mainly hydrolysable tannins composed by gallotannins, where a polygallic acid structure is esterified on quinic acid (Fig. 4).

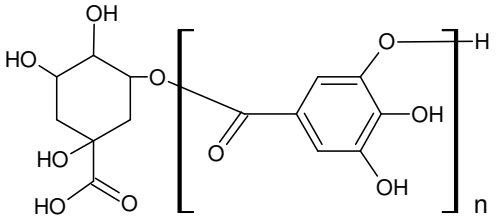


Fig. 4.
Structura principală a galotaninurilor prezente în taninul de tara / Main structure of gallotannins present in Tara tannin.

Prin urmare, cel mai înalt vârf (maxim) spectral detectat în extractul comercial corespunde unei serii de structuri prezentate în Fig. 5, respectiv o succesiune de molecule de acid galic, unde **n** din Fig. 4 poate varia de la 0 la 8. În loc de acid quinic pot fi de asemenea alte molecule de monomer, dintre celelalte indicate mai sus, la care aceste lanțuri de acid poligalic pot fi ataşate prin legături esterice.

Thus the highest peaks detected in the commercial extract corresponds to the series of structures shown in Fig. 5, namely a sequence of gallic acid units, where **n** of Fig. 4 can vary from 0 to 8. Instead of quinic acid, there can also be other monomeric units among the other indicated above on which these polygallic acid chains can be attached by ester linkages.

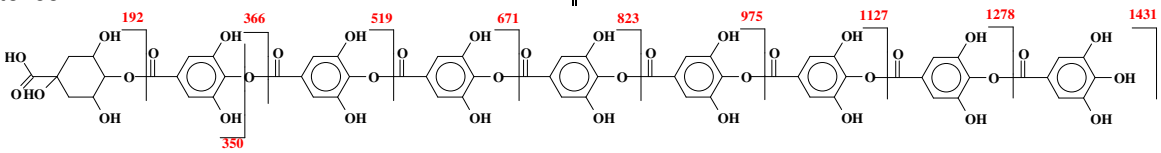


Fig. 5.
Serie de oligomeri reprezentând cele mai înalte vârfuri şi masele moleculare corespunzătoare în taninul comercial de tara extras cu solvent. Secvența moleculelor de acid galic, unde n poate varia de la 0 la 8, poate fi legată de alte molecule de monomer în loc de acid quinic, similar structurii din figură corespunzătoare principalei serii de oligomeri / Series of oligomers representing the highest peaks and their respective molecular weights in solvent extracted commercial Tara tannin extract. The sequence of gallic acid units, where n can vary from 0 to 8. can be linked to other monomer units instead than to quinic acid as shown in the figure for the main series of oligomers.

Spectrul în mod ion negative arată cum o serie de carbohidrați pot fi prezenți şi legați la fracțiunea polifenolică a extractului. De aceea, din spectrul în mod (Fig. 6) se poate observa o serie de vârfuri minore care corespund aducților carbohidrați - polifenoli. Seria de vârfuri indicând legături cu carbohidrații, este reprezentată prin vârfuri foarte mici. Acest lucru este exemplificat prin vârfurile de 839Da şi 855Da. Primul dintre acestea, prezentat mai jos în Fig. 7, spre exemplu, reprezintă aductul sodiului la structura diglucozei la care se leagă un lanț rezidual din trei unități de acid galic, iar al doilea un compus similar, minus o grupare –OH. Cel mai mic dintre vârfuri arată că proporția de carbohidrați în extractul de tara cu solvent este într-adevăr foarte scăzută, cum era de aşteptat. Aceleiaşi serii îi aparține şi vîrful mai pronunțat 687Da reprezentând o diglucoză legată de două reziduuri de acid galic şi 535Da (diglucoza legată la un singur acid galic). Vârfurile de 368Da şi 350Da corespund dimerilor acidului quinic şi galic (Tabelul 2, Fig. 5) fără carbohidrați ataşați. De remarcat este vârful de 700Da care este o unitate Q-G-G-glucoză.

The negative ion spectra defines how some carbohydrates may be present and linked to the polyphenolic fraction of the extract. Thus from the negative spectra (Fig. 6) one can notice a series of minor peaks that correspond to carbohydrates polyphenolic adducts. The series of peaks indicating linking with the carbohydrates is represented by very small peaks. This is exemplified by the peaks at 839Da and 855Da. The first one of this, shown hereunder in Fig. 7 for example, represents the sodium adduct of a diglucose structure to which is linked a three gallic acid residues chain and the second the same minus a -OH group. The smallness of such peaks indicates that the proportion of carbohydrates in tara solvent extract is indeed very low, as would be expected. To the same series belong the more pronounced 687Da peak representing a diglucose linked to two gallic acid residues, the 535Da peaks (a diglucose linked to a single gallic acid). The peaks ar 368Da and 350Da correspond to dimers of quinic and gallic acid (Table 2, Fig. 5) without carbohydrates attached. Noticeable are also a peak at 700Da that is a Q-G-G-glucose.

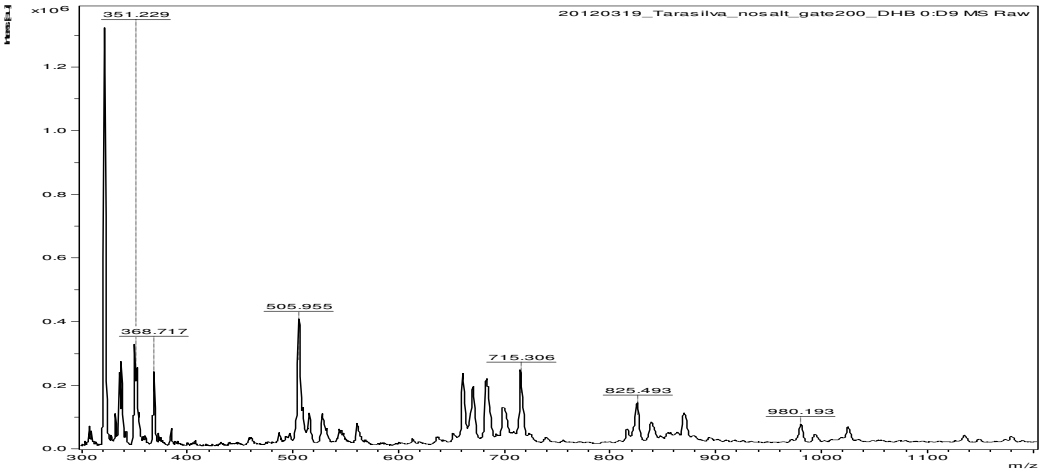


Fig. 6.
Spectrul MALDI-TOF al taninului comercial de tara extras cu solvent (mod negativ, cu NaCl); domeniul de masă: 300-2000Da / MALDI-TOF of solvent extracted commercial Tara tannin extract (negative mode, with NaCl); mass range: 300-2000Da.

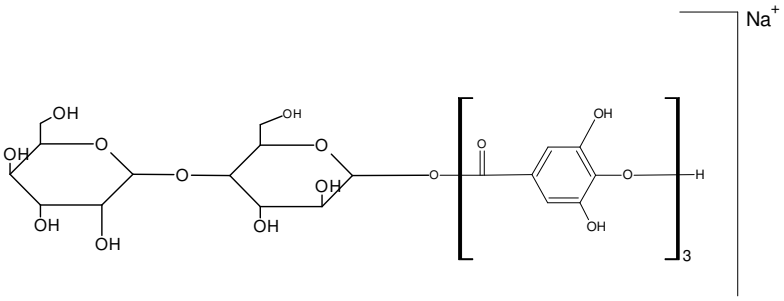


Fig. 7.
Structura propusă pentru trimerul corespunzător vârfului minor 839Da, rezultată prin analiza MALDI-TOF în mod ion negativ a taninului comercial de tara extras cu solvent / Proposed structure for the trimer at 839Da, minor peak, as postulated from the bulk sample of negative ion MALDI-TOF analysis of solvent extracted commercial Tara tannin extract.

Interesantă este şi cromatograma HPLC a taninului de tara extras cu solvent prezentată în Fig. 8. Vârfurile ce aparţin acidului galic cu un timp de retenţie de 2,2 minute şi acidului clorogenic cu un timp de retenţie de 1,5 minute sunt clar vizibile. Suprafaţa picului indică o proporţie de 1,6% de acid galic liber şi de 0,48% de acid clorogenic liber în compoziţia taninului de tara estras cu solvenţi. Este interesant de notat că numărul de vârfuri prezente în Fig. 8, aproximativ 20, corespunde unui număr similar de oligomeri identificaţi prin metoda MALDI-TOF. Cum picurile de absorbţie cu arie maximă din cromatograma din Fig. 8 sunt la 10, 13.5 şi 15.25 minute ca timp de eluţie, se poate presupune că acestea corespund oligomerilor prezenţi în proporţie mare, identificaţi prin metoda MALDI-TOF, prin urmare corespunzând valorilor 823Da, 975Da şi 1127Da, deşi nu s-a putut face o atribuire clară.

Of interest is also the HPLC chromatogram of solvent extracted Tara tannin shown in Fig. 8 The peaks belonging to gallic acid of retention time 2.2 minutes and of chlorogenic acid of retention time 10,6 minutes are clearly visible. The peak areas indicate a proportion of 1.6% of free gallic acid and of 0.48% of free chlorogenic acid as present in solvent extracted Tara tannin. It is of interest to note that the number of peaks present in Fig. 8, approximately 20, correspond to a similar number of oligomers identified by MALDI-TOF. As the peaks of major area in the chromatogram in Fig. 8 are those at 10, 13.5 and 15.25 minutes elution it can be postulated that such peaks correspond to the oligomers present in greater proportion as obtained by MALDI-TOF, thus corresponding to the 823Da, 975Da and 1127Da, although a clear assignment cannot be done.

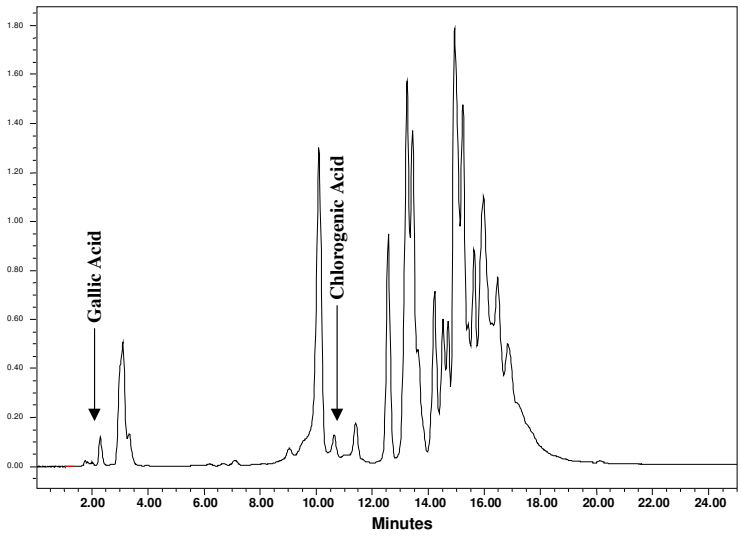


Fig. 8.
Diagrama de eluție HPLC a taninului comercial de tara extras cu solvent. Săgețile indică picurile corespunzătoare monomerilor acidului galic şi acidului clorogenic / HPLC elution diagram of solvent extracted commercial Tara tannin extract. Arrows indicate the peaks of the monomers of gallic acid and chlorogenic acid.

CONCLUZII

S-a determinat că taninul comercial de tara extras cu solvent este compus dintr-o serie de oligomeri ai acidului galic ataşați prin legătura esterică de acidul quinic. Ei constituie oligomerii cu cea mai mare proporție în extract. Alte lanțuri poligalice legate la una sau două molecule repetate precum acidul cafeic şi acidul metil-quinic, metil-galic metil-cafeic sunt de asemenea prezente. Unele reziduuri de carbohidrați apar ca fiind încă prezente, legate de structura polifenolică de bază a extractului, dar proporția lor este foarte scăzută, aşa de cum era de aştepat la taninul extras cu solvent.

CONCLUSION

Solvent extracted commercial Tara tannin extract has been found to be composed of a series of oligomers of polygallic acid attached by an ester link to one quinic acid. They constitute the oligomers in higher proportion in the extract. Other polygallic chains linked to one only or two repeating units such as caffeic acid and methylated quinic, methylated gallic and methylated caffeic acids are also present. Some carbohydrate residues appear to still be present, linked to the polyphenolic material of the extract but their proportion is very low as would be expected of a solvent extracted tannin.

BIBLIOGRAFIE / REFERENCES

Armitage R, Bayliss GS, Gramshaw JW, Haslam E, Haworth RD, Jones K, Rogers HJ, Searle T (1961) Gallotannins, Part III. The constitution of Chinese, Turkish, Sumach and Tara tannin. J.Chem.Soc. 1842-1853.

Bahr U, Deppe A, Karas M, Hillenkamp F, Giessmann U (1992) Mass Spectrometry of Synthetic Polymers by UV-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Anal. Chem. 64:2866-2869.

Danis PO, Karr DE, Mayer F, Holle A, Watson CH (1992) The analysis of water-soluble polymers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. Org. Mass Spectrom. 27:843-846.

Danis PO, Karr DE (1993) A facile sample preparation for the analysis of synthetic organic polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization. Org. Mass Spectrom. 28:923-925.

Ehring H, Karas M, Hillenkamp F (1992) Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption/ionization Org. Mass Spectrom. 27:472-480.

Garro Galves JM, Riedl B, Conner AH (1997) Analytical studies on Tara tannin. Holzforschung, 51:235-240.

Haslam E (1966) The Chemistry of Vegetable Tannins. Academic Press, London.

Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 78:53-68.

Navarrete P, Pizzi A, Pasch H, Rode K, Delmotte L (2010) MALDI-TOF and ^{13}C NMR characterisation of maritime pine industrial tannin extract, Ind. Crops Prod. 32:105-110.

Oo CW, Kassim MJ, Pizzi A (2009) Characterization and performance of *Rhizophora apiculata* mangrove polyflavonoid tannins in the adsorption of copper (II) and lead (II), Ind. Crops & Prod, 30:152-161.

Pasch H, Resch M (1996) Polymer Analysis with MALDI-MS. GIT Fachz. Lab. 40:90-94.

Pasch H, Gores F (1995) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. 2. Analysis of Polymethyl Methacrylate. Polymer 36:1999.

Pasch H, Pizzi A, Rode K (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins, Polymer. 42:7531-7539.

Pasch H, Pizzi A (2002) On the macromolecular structure of chestnut ellagitannins by MALDI-TOF mass spectrometry, J.Appl.Polymer Sci. 85:429-437.

Pizzi A, Pasch H, Rode K, Giovando S (2009) Polymer structure of commercial hydrolisable tannins by MALDI-TOF mass spectrometry, J.Appl.Polymer Sci. 113(6):3847-3859.

Yeoh Beng Hoong, Pizzi A, Tahir PMd, Pasch (H 2010) Characterisation of *Acacia mangium* polyflavonoid tannins by MALDI-TOF mass spectrometry and CP-MAS ^{13}C NMR, Eur.Polymer J. 46:1268-1277.