

HYDROXYFETTSÄUREN AUS DEM CUTIN DES BLATTES VON *ROSMARINUS OFFICINALIS*

C. H. BRIESKORN und L. KABELITZ

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität, Würzburg, Germany

(Eingegangen 14 Juli 1970, in Abgeänderter Form 22 Dezember 1970)

Zusammenfassung—Erstmals wird über die Zusammensetzung der Cuticularmembran eines Labiatenblattes berichtet. Am Aufbau sind 15 Hydroxycarbonsäuren beteiligt. Ihre Abtrennung erfolgte teils durch präparative Methoden, hauptsächlich aber durch eine GC/MS Koppelung. 5 Hydroxycarbonsäuren, entsprechend 7,3% des Gesamtcutins, konnten nicht identifiziert werden, da sie nicht dem üblichen Fragmentierungsschema folgten. Hauptbestandteile sind die 10,16-Dihydroxyhexadecansäure, die 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure und die 6,7,16-Trihydroxyhexadecansäure. Letztere Verbindung sowie 5 weitere Hydroxyfettsäuren, deren Anteile allerdings geringer sind, konnten erstmals im Cutin nachgewiesen werden.

Abstract—The cuticular membrane of *Rosmarinus officinalis* L. contains 15 hydroxy fatty acids. Ten have been identified mainly by GLC/MS. The other five, corresponding to 7.3% of the whole cutin, could not be identified because their fragmentation pattern was not as expected. The main constituents are 10,16-dihydroxyhexadecanoic acid, 9,10-18-trihydroxyoctadecanoic acid and 6,7,16-trihydroxyhexadecanoic acid. The last named compound and five other hydroxy fatty acids, present in lower quantities, have been isolated for the first time from cutin.

NACH Untersuchungen an dem Cutin der Apfel- und Tomatenschale soll nun über die Zusammensetzung des Cutins des Blattes von *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) berichtet werden. Die Abtrennung der Cuticularmembran des nadelförmigen Blattes erfolgte in einem über 10 Tage sich erstreckenden "Oxalatverfahren". Die cuticulare Membran beträgt 18,6% der luftgetrockneten Ausgangsdroge. Mittels Äther und Äthanol werden aus ihr Wachse, Kohlenwasserstoffe, Triterpensäuren, Pigmente usw. extrahiert (41% der isolierten Cuticula).

Auf eine Extraktion mit Wasser kann wegen des vorausgegangenen Oxalatverfahrens verzichtet werden. Eine Extraktion mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure, durch die braungefärbte Begleitstoffe abgetrennt werden sollen,¹⁻⁴ bringt keinen Vorteil. 1%ige Carbonatlösung oder 0,2%ige wässrige Kalilauge, die Tannin entfernen sollen^{1,4-7} führen nach unserer Beobachtung zu merklichen Verlusten an Cutinsäuren. Schon Fremy⁸ weist auf die Verseifbarkeit des Cutins mit Alkalicarbonaten hin.

Aus den extrahierten Cuticularmembranen wird mittels einer Mischung aus Zinkchlorid-Salzsäure Cellulose abgetrennt. Dieses Lösungsmittel bewirkt im Vergleich zu Kupfertetraminhydroxyd keine Hydrolyse des Cutins, wohl aber eine umfassendere Extraktion der Cellulose (Tabelle 1).

¹ E. A. BAKER und J. T. MARTIN, *Nature, Lond.* **199**, 1268 (1963).

² G. EGLINGTON und D. H. HUNNEMAN, *Phytochem.* **7**, 313 (1968).

³ V. H. LEGG und R. V. WHEELER, *J. Chem. Soc.* **127**, 1412 (1925).

⁴ J. T. MARTIN, *J. Sci. Food Agric.* **11**, 635 (1960).

⁵ E. A. BAKER, R. F. BATT und J. T. MARTIN, *Ann. Appl. Biol.* **53**, 59 (1964).

⁶ E. A. BAKER und J. T. MARTIN, *Ann. Appl. Biol.* **60**, 313 (1967).

⁷ R. F. BATT und J. T. MARTIN, *J. Hort. Sci.* **41**, 271 (1966).

⁸ E. FREMY, *Compt. Rend.* **100**, 19 (1885).

TABELLE 1. EXTRAKTION DER CUTICULARMEMBRANEN

Vorbehandlung der Cuticularmembranen	Gewichtsverlust durch die Vorbehandlung (%)	Rückstand nach anschließender Verseifung (%)
keine	—	25
mit Schweizers Reagenz 24 Stdn.	14	4
mit Zinkchlorid-Salzsäure 30 Min.	16	0,1

Das Depolymerisieren der Cuticularmembranen erfolgte durch Umesterung mit methanolischer Natriummethylatlösung. Im Vergleich zur Verseifung mittels methanolischer Kalilauge hat dieses Verfahren drei Vorteile:

- (1) Es genügen niedrigere Temperaturen und kürzere Reaktionsdauer. Die schonendere Behandlung gibt sich durch die helle Farbe des Verseifungsproduktes zu erkennen.
- (2) Es ist einfacher in der Handhabung als die Verseifung mit anschließender Cutinsäuregewinnung.
- (3) Es ist quantitativ reproduzierbar. Der Verlust einzelner Komponenten durch Polymerisation und Adsorption ist ausgeschlossen. Der Verteilungskoeffizient unterschiedlich stark hydroxylierter Cutinsäuren zwischen einer wäßrigen und einer ätherischen Phase hat keine Bedeutung.

Die Neutralisation des Umesterungsproduktes erfolgte mittels eines stark sauren Ionenaustauschers. Von dem Austauscher festgehaltene Hydroxyfettsäuremethylester werden mittels Äthanol und Äther heruntergelöst.

Mittels Flüssig/Flüssig/Vielfachverteilung an einer M-V-S-Kolonne Ro 700 war weder eine vollständige noch eine eindeutige Auftrennung aller Hydroxycarbonsäuren möglich. Das gleiche gilt für den Trenneffekt mittels Dünnschichtchromatographie. Durch Säulenchromatographie an Kieselgel lassen sich 2 der mengenmäßig am höchsten vorkommenden Säuren als Methylester abtrennen. Es sind dies die 10,16-Dihydroxyhexadecansäure (46,7%) und die threo-9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure (12,4%).

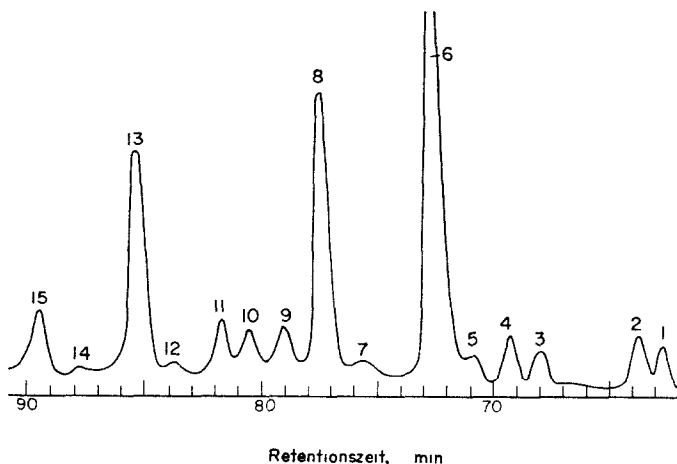


ABB. 1. GASCHROMATOGRAMM DER CUTINSÄUREMETHYLESTERTRIMETHYLSILYLATHER. BEDINGUNG I.

Für die Gaschromatographie der Hydroxyfettsäuren wählten wir ihre Trimethylsilyl-äthermethylester. Sie sind sehr thermostabil und besitzen scharfe Peaks mit einer geringen Halbwertsbreite. Das Gaschromatogramm des Cutinsäuregemisches als Methylester-trimethylsilyläther (Abb. 1) zeigt 15 Peaks, von denen durch Mischchromatogramme Nr. 3 sich 16-Hydroxyhexadecansäure, Nr. 6 wie 10,16-Dihydroxyhexadecansäure und Nr. 13 wie threo-9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure verhielten.

Ihr Anteil am Gesamtgemisch beträgt 60%. Von den den 12 weiteren Peaks entsprechen den Substanzen konnten keine ausreichenden Mengen für eine Strukturaufklärung abgetrennt werden. Auf Grund der Retentionszeiten ergaben sich auch keine sicheren Voraussagen zur Zahl sowie Stellung der Hydroxylgruppen und der Kettenlänge. Wir führten daher die aus dem Gaschromatographen anfallende Substanz einem Massenspektrometer zu. Zum Einsatz gelangte das gesamte Cutinsäuregemisch, weil die bereits identifizierten Hydroxyfettsäuren eine wertvolle Hilfe beim Vergleich des Totalionenstromdiagramms des Massenspektrometers mit dem Gaschromatogramm bieten. Außerdem kann an Hand der Massenspektren der bereits identifizierten Verbindungen das Ausmaß des Untergrundes erkannt werden, der sich durch Abdestillieren der flüssigen Phase der Trennsäule in den Massenspektren störend bemerkbar macht.

Für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse von Cutinsäuren setzten wir gepackte Säulen ein, die über einen Ryhage-Separator mit dem Massenspektrometer gekoppelt waren. Um die Massenspektren der einzelnen gaschromatographischen Peaks bestimmten Hydroxyfettsäuren zuordnen zu können, mußten wir uns zunächst Klarheit über die Fragmentierung der Hydroxyfettsäuremethylestertrimethylsilyläther in Abhängigkeit von der Zahl und Stellung der Trimethylsilyloxygruppen in der Kohlenstoffkette beschaffen. Hinweise lieferten Modellsubstanzen mit bereits bekannten Spektren.^{2,9-12}

In den Massenspektren der Trimethylsilyloxyfettsäuremethylester finden sich neben den Peaks der aliphatischen Kohlenwasserstoffe, die auch in den Spektren der unsubstituierten Fettsäuremethylester vorkommen, noch weitere Peaks, die allgemein für silylierte Hydroxyfettsäuren charakteristisch sind, und zwar die Ionen m/e 73, 75, 89, 103 und 129 (Abb. 2).

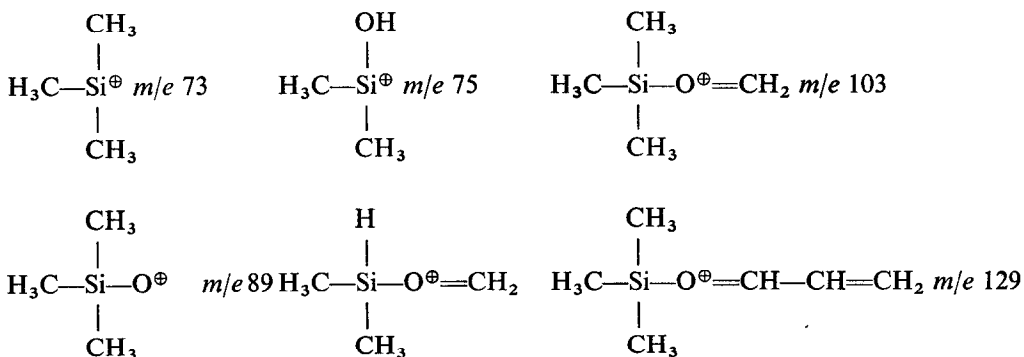


Abb. 2. Ionen der silylierten Verbindungen.

⁹ C. CAPELLA, C. GALLI und R. FUMAGALLI, *Lipids* 3, 436 (1968).

¹⁰ C. CAPELLA und C. M. ZORZUT, *Anal. Chem.* 40, 1458 (1968).

¹¹ G. EGLINGTON, D. H. HUNNEMAN und K. D. ZADEH, *Tetrahedron* 24, 5929 (1968).

¹² G. EGLINGTON und D. H. HUNNEMAN, *Org. Mass. Spectrometry* 1, 593 (1968).

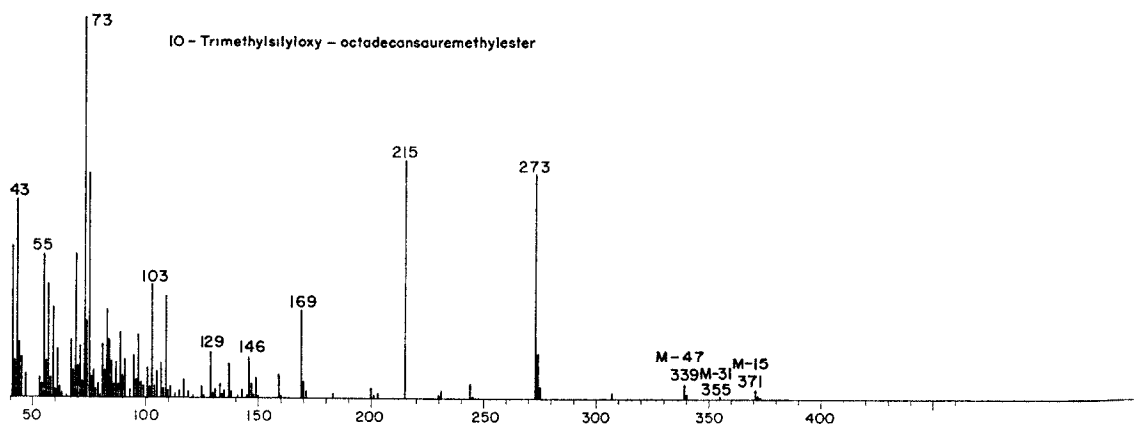


ABB. 3.

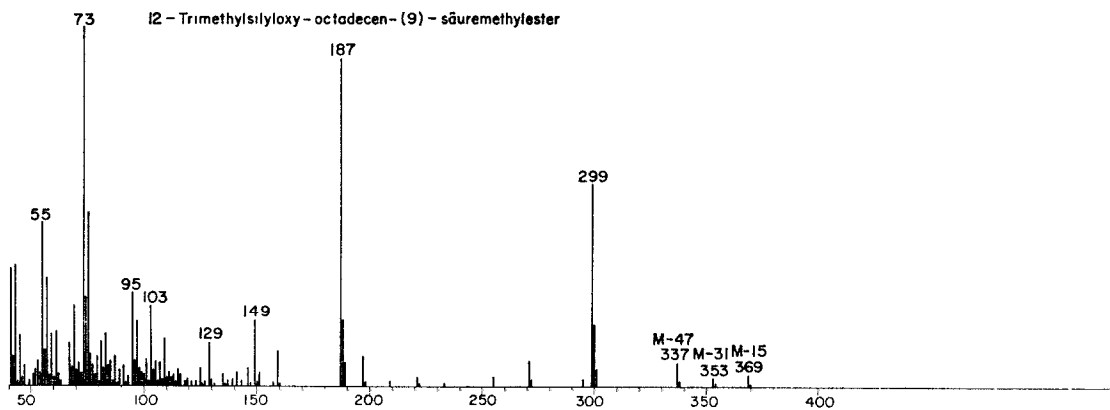


ABB. 4.

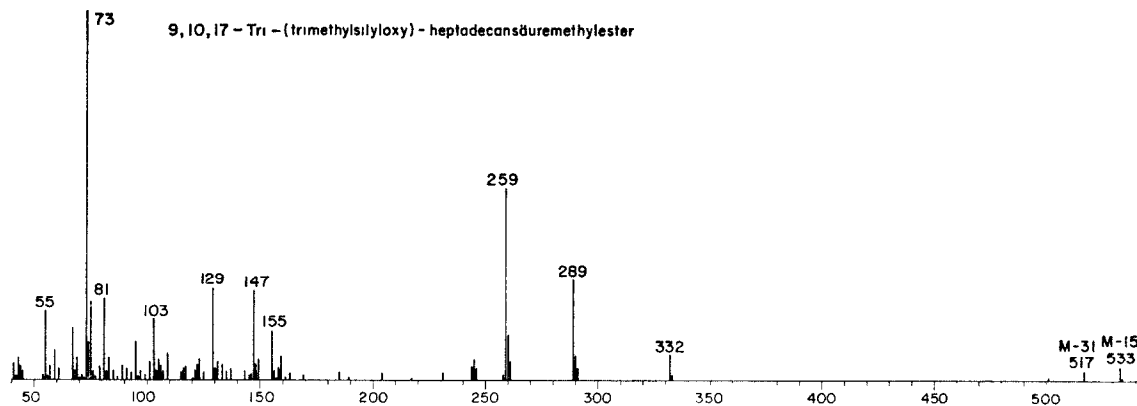


ABB 5

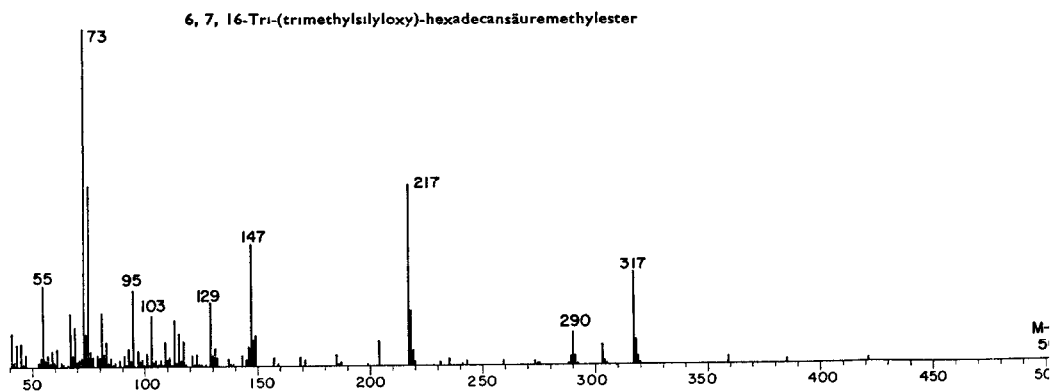


ABB. 6.

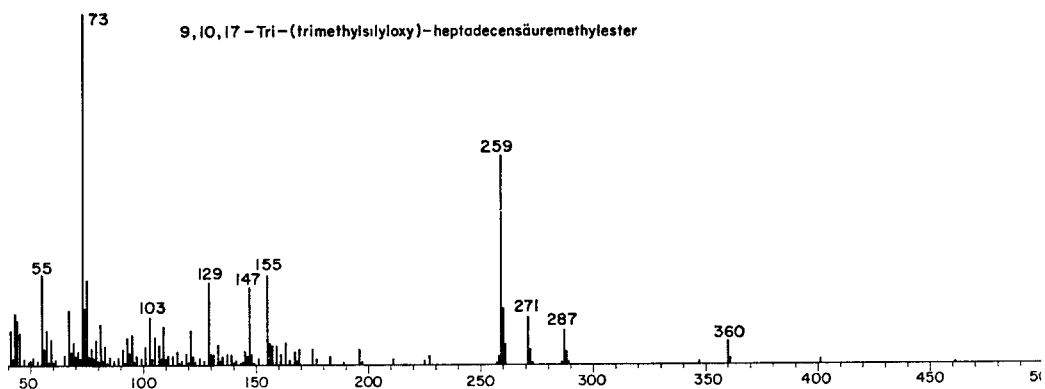


ABB. 7.

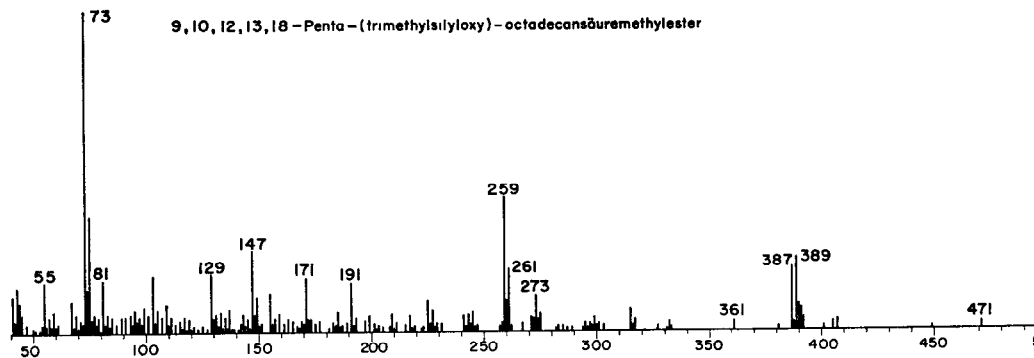
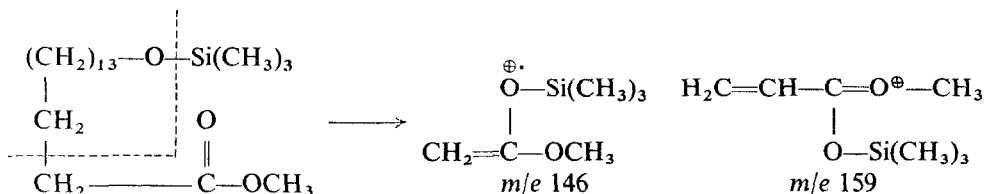


ABB. 8.

ABB. 3-8. MASS SPECTRA DER HYDROXYCARBONSÄUREN.

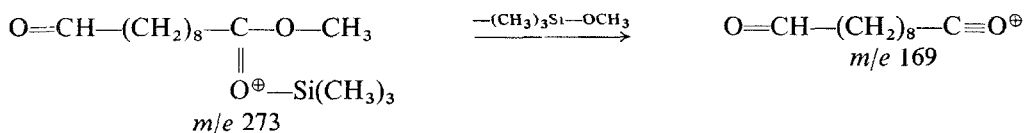
Das Molekularion ist häufig nur schwach oder garnicht ausgeprägt.^{2,9-12} Durch den Verlust einer Methylgruppe entsteht das Ion M-15, welches gewöhnlich sehr intensiv auftritt und die Berechnung des Molekulargewichtes der Substanz gestattet.

Bei Monotrimethylsilyloxyfettsäuremethylestern geht die methylveresterte Carboxylgruppe mit der Trimethylsilyloxygruppe eine Umlagerung ein.¹² Dabei entstehen regelmäßig die Ionen m/e 146 und m/e 159, welche zum Charakterisieren herangezogen werden können.



Peak 5 erwies sich als 10-Trimethylsilyloxyoctadecansäuremethylester Abb. 3. Die Ionen M-15, M-31 und M-47 zeigen im Vergleich zu denen des 16-Trimethylsilyloxyhexadecansäuremethylesters eine stark reduzierte Intensität. Der Basepeak ist nicht mehr m/e 75, sondern m/e 73. Das Molekül wird in beiden α -Stellungen zum Kohlenstoffatom, das die Trimethylsilyloxyfunktion trägt, aufgespalten. Fragmente ohne die funktionelle Gruppe haben offensichtlich keine Bedeutung, da sie in den Spektren nicht auftauchen. Die Summe der beiden Hauptfragmente 273 und 215 minus 102 (gleich $\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3$) ergibt das Molekulargewicht.

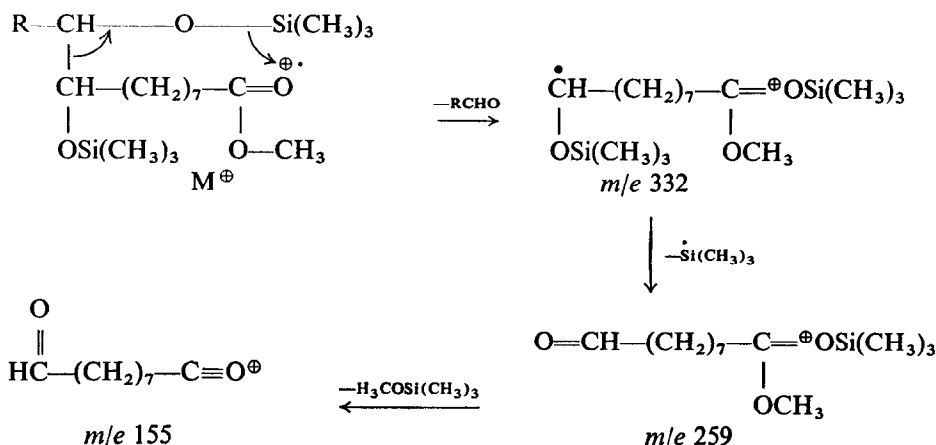
Bemerkenswert ist das Ion m/e 169. Vermutlich entsteht es aus einer Umlagerung unter Abspaltung von Trimethylmethoxysilan.



Peak 4 erwies sich als 12-Trimethylsilyloxyoctadecen-(9)-säuremethylester Abb. 4. Bei ungesättigten Fettsäuremethylestersilyläthern ist das Molekül durch die Doppelbindung etwas mehr stabilisiert. Dadurch treten die Ionen M-15, M-31 und M-47 mit etwas größerer Intensität als bei den entsprechenden gesättigten Verbindungen auf. Auch hier erfolgt die Aufspaltung hauptsächlich in α, α' -Stellung zum Kohlenstoffatom, das die Trimethylsilyloxyfunktion trägt. Durch ein Mischchromatogramm mit Rizinolsäuremethylestertrimethylsilyläther konnte die Lage der Doppelbindung festgelegt werden. Der direkte Weg, die Hydroxylierung mit OsO_4 durchzuführen und anschließend zu silylieren, war aus technischen Gründen nicht möglich. Bemerkenswert ist die große Intensität des Ions m/e 149. Es entsteht durch eine Reaktion des Sauerstoffs der Trimethylsilyloxygruppe mit dem Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe. Durch Abspaltung eines Olefins stabilisiert sich die Umlagerung.¹³

Bei allen Hydroxyfettsäuremethylestertrimethylsilyläthern, die zwei und mehr Trimethylsilyloxygruppen tragen, ist die Intensität des Ions m/e 146 kleiner als die des Ions

¹³ W. J. RICHTER, B. R. SIMONEIT, D. H. SMITH und A. L. BURLINGAME, *Analyt. Chem.* **41**, 1392 (1969).



m/e 147. Bei diesen Verbindungen können die Trimethylsilyloxygruppen auch untereinander eine Umlagerung eingehen, die zum Ion *m/e* 147 führt.



Bei benachbarter Stellung von zwei Trimethylsilyloxy-Gruppen ist das Ion besonders stark ausgeprägt.

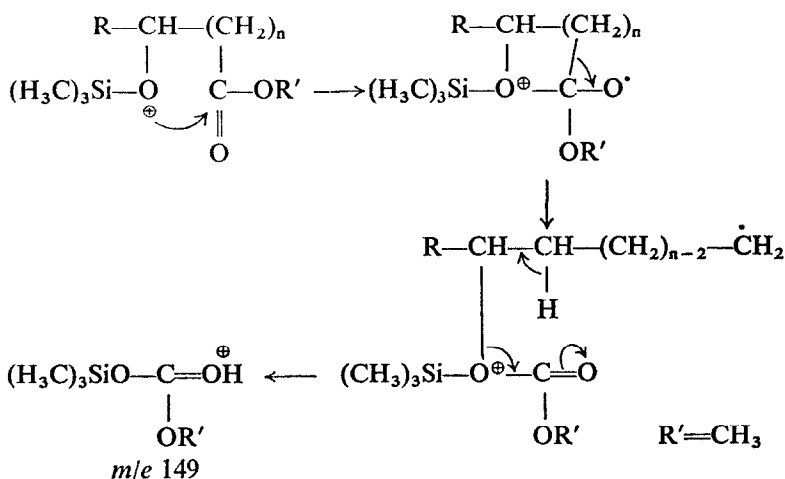
Peak 6 entspricht dem 10,16-Di-(trimethylsilyloxy)-hexadecansäuremethylester. Seine Aufspaltung erfolgt analog der des 10-Trimethylsilyloxyoctadecansäuremethylesters. M-15, M-31 und M-47 haben noch weniger Intensität als bei den Monohydroxyfettsäurederivaten. Die Intensität des Ions *m/e* 273, das die Methylestergruppierung trägt, ist größer als die des Ions *m/e* 275, das zwei Trimethylsilyloxygruppen enthält. Peak 11 ist 10,18-Di-(trimethylsilyloxy)-octadecansäure-methylester. Er weist ein ganz ähnliches Fragmentierungsverhalten wie der 10,16-Di-(trimethylsilyloxy)-hexadecansäuremethylester auf. Zusätzlich kann jedoch das Auftreten der Massendifferenz M-105 beobachtet werden. Vermutlich handelt es sich um abgespaltenes Trimethylsiliciumhydroxyd und eine Methylgruppe.

Trihydroxysäurederivate mit zwei vicinal zueinander stehenden Trimethylsilyloxygruppen spalten bevorzugt zwischen den beiden Kohlenstoffatomen, die diese tragen, auf.^{2,10,12} Die Summe der beiden Fragmente ergibt das Molekulargewicht. Durch die Ionen M-15 und M-31, die gegenüber den Dihydroxysäurederivaten noch mehr an Intensität verlieren, läßt sich die Richtigkeit überprüfen. Das Ion M-47 tritt nicht mehr auf. Auf Grund der vicinalen Stellung der Trimethylsilyloxygruppen ist das Ion *m/e* 147 stark ausgeprägt. Interessant ist eine Umlagerung, die zwischen der Carboxylgruppe und der zweiten der beiden vicinalen Trimethylsilyloxygruppen abläuft.

Bei Trihydroxysäuremethylestertrimethylsilyläthern mit vicinalen Trimethylsilyloxygruppen in 9,10-Stellung wie 9,10,18-Tri-(trimethylsilyloxy)-octadecansäuremethylester (Peak 13) und 9,10,17-Tri-(trimethylsilyloxy)-heptadecansäuremethylester (Peak 10 Abb. 5) entsteht das Ion *m/e* 332, das über *m/e* 259 nach *m/e* 155 zerfällt.^{10,14}

Peak 8 ist 6,7,16-Tri-(trimethylsilyloxy)-hexadecansäuremethylester Abb. 6. Hier tritt, ganz analog, das Ion *m/e* 290 auf, das über *m/e* 217 nach *m/e* 113 zerfällt.

¹⁴ C. CAPELLA, *Advances in Mass-Spectrometry*, Vol. IV, Elsevier, London (1968).



Eine relativ starke Erhöhung des Ions m/e 115 spricht für eine erleichterte Aufspaltung zwischen den Kohlenstoffatomen 5 und 6. Ryhage,¹⁵ konnte bei 5-, 6- und 7-Hydroxyfettsäureestern auch eine verstärkte Aufspaltung in der Kohlenstoffkette vor dem Kohlenstoffatom, das die Hydroxylgruppe trägt, feststellen.

Peak 9 ist 9,10,17-Tri-(trimethylsilyloxy)-heptadecensäuremethylester Abb. 7. Über die Lage der Doppelbindung läßt sich keine Aussage machen, weil diese bei den Bedingungen der Massenspektrometrie nicht fixiert ist. Die Verbindung ist erstmals im Cutin nachgewiesen worden. Peak 15 stammt von 9,10,12,13,18-Penta-(trimethylsilyloxy)-octadecensäuremethylester (Abb. 8). Die Fragmentierung und Verteilung der Schlüsselbruchstücke ähnelt denen des 9,10,18-Tri-(trimethylsilyloxy)-octadecensäuremethylesters. Zum Unterschied von den Trihydroxysäuren sind die Ionen M-15 und M-31 nicht mehr auffindbar, so daß sie keine Kontrolle des Molekulargewichtes gestatten. Dennoch läßt sich aus den einzelnen Bausteinen das ursprüngliche Molekül zusammenfügen. Die Fragmentierung erfolgt in der Hauptsache zwischen den vicinalen, die Trimethylsilyloxygruppen tragenden Kohlenstoffatomen. Bei den Bruchstücken, die in kurzem Abstand mehrere funktionelle Gruppen besitzen, wird leicht Trimethylsiliciumhydroxyd (M-90) abgespalten. Bemerkenswerterweise bricht das Molekül zwischen den Kohlenstoffatomen 10 und 11 auf, ähnlich wie zwischen den C-Atomen 9 und 10 bei 9,10,17-Tri-(trimethylsilyloxy)-heptadecensäuremethylester. Das dabei entstehende Ion m/e 361 kann nicht formuliert werden. Durch Abspaltung von Trimethylsiliciumhydroxyd geht das Ion m/e 361 in m/e 271 über.

Bei den Peaks 7, 12 und 14 (Abb. 1) war das Verhältnis von Substanz zu Untergrund so ungünstig, daß eine Interpretation der Spektren nicht möglich war. Die Verbindungen, die den Peaks 1 und 2 entsprechen, folgen nicht den Fragmentierungsschemen für Trimethylsilyloxyfettsäuremethylester. Es gelang nicht, die Spektren anderen Stoffgruppen zuzuordnen.

Hauptbestandteile des Cutinsäuregemisches mit 75,7% sind die 10,16-Dihydroxyhexadecensäure, die 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure und die 6,7,16-Trihydroxyhexadecensäure (Tabelle 2). Die restlichen sieben identifizierten Cutinsäuren enthalten gleichfalls 16 bis 18 Kohlenstoffatome. Bemerkenswert ist das Vorkommen von 9,10,17-Trihydroxyheptadecensäure und der ungesättigten 9,10,17-Trihydroxyheptadecensäure. Eg-

TABELLE 2. ZUSAMMENSETZUNG DES ROSMARINBLATT-CUTINS

Peak Nr. *	Hydroxycarbonsäure	Gesamtcutin (%)
(1)	nicht identifiziert	1,8
(2)	nicht identifiziert	2,9
(3)	16-Hydroxyhexadecansäure	1,5
(4)	12-Hydroxyoctadecan-(9)-säure	2,3
(5)	10-Hydroxyoctadecansäure	1,3
(6)	10,16-Dihydroxyhexadecansäure	46,7
(7)	nicht identifiziert	1,6
(8)	6,7 16-Trihydroxyhexadecansäure	16,6
(9)	9,10,17-Trihydroxyheptadecansäure	3,0
(10)	9,10,17-Trihydroxyheptadecansäure	2,9
(11)	10,18-Dihydroxyoctadecansäure	2,8
(12)	nicht identifiziert	0,7
(13)	9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	12,4
(14)	nicht identifiziert	0,3
(15)	9,10,12,13,18-Pentahydroxyoctadecansäure	3,2

* (vide Abb. 1).

lington (2) konnte drei andere C-17-Hydroxysäuren, gesättigte wie ungesättigte, im Cutin von Apfelschalen nachweisen.

Von den zehn identifizierten Cutinsäuren sind 16-Hydroxyhexadecan-, 10,16-Dihydroxyhexadecan, 10,18-Dihydroxyoctadecan und 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure auch Bestandteile des Cutins anderer Pflanzen. Die weiteren sechs, unter anderem die mit 16,6% am Aufbau beteiligte 6,7,16-Trihydroxyhexadecansäure, haben wir im Rosmarincutin erstmals nachgewiesen.

Wie eine Berechnung der Anzahl der Hydroxylgruppen zu der Anzahl der Carboxylgruppen ergibt, sind erstere in der Überzahl. Dies steht in Übereinstimmung mit der OH-Valenzschwingung im IR-Spektrum und den analytisch nachweisbaren freien Hydroxylgruppen. Die Carboxylgruppen müssen andererseits alle verestert sein, da das IR-Spektrum der Cuticularmembranen nur eine Esterbande zeigt, nicht dagegen eine für freie Carboxylgruppen. Aus der Säure- und Hydroxylzahl des verseiften Cutins läßt sich errechnen, daß 48% der Hydroxylgruppen mit Carboxylgruppen verestert sind. Auf analytischem Wege lassen sich im Cutin jedoch nur 25% acetylierbare Hydroxylgruppen erfassen. Für eine peroxidische Bindung der verbleibenden 27% der Hydroxylgruppen sind keine Hinweise zu finden, auch wenn berücksichtigt wird, daß die Peroxydbande im IR-Spektrum im allgemeinen nur schwach in Erscheinung tritt. So bleibt als Erklärung für das Nichtreagieren von 27% der Hydroxylgruppen eine sterische Behinderung, gegeben durch die hochpolymere Natur des Rosmarin-Cutins.

EXPERIMENTELLES

Gewinnung der Cuticularmembran. Unzerkleinerte Blätter von *Rosmarinus officinalis* L. werden mit der zehnfachen Menge Oxalatpufferlösung, bestehend aus 0,4% Oxalsäure und 1,6% Ammoniumoxalat, unter Ergänzung des verdampfenden H₂O und unter Rühren bis zu 10 Tagen gekocht. Anfangs wird nach je 12 Stdn., nach 2 Tagen jeweils nach 24 Stdn. der Kochvorgang unterbrochen und die Suspension auf ein Sieb (0,8 mm Maschenweite) gegossen. Dabei passieren die zerkochten Gewebsanteile das Sieb. Durch mehrfaches Suspendieren der Membranen in heißem H₂O und Abgießen über das Sieb werden die Gewebereste und das Oxalat entfernt. Restliche Stengelanteile sedimentieren aus der Suspension schneller als die Cuticularmembranen und können so beseitigt werden. Haare lassen sich von den gefriergetrockneten Membranen absieben (Maschenweite 0,8 mm).

Vor der weiteren Extraktion der Membranen mit organischen Lösungsmitteln werden sie gefriergetrocknet. Die getrockneten Membranen sind hell braun und durchscheinend. Sie werden locker geschichtet in einer Soxhlet-Apparatur zunächst mit Ät₂O, dann mit ÄtOH erschöpfend extrahiert. 10 g extraktfreie

Cuticularmembranen werden mit einer Lösung von 250 g ZnCl_2 in 165 ml konz. HCl versetzt und 30 Min gerührt. Die Zinkchlorid-Salzsäure-Lösung wird abgesaugt, darauf solange mit konz. HCl gewaschen, bis im Filtrat kein Zn mehr nachweisbar ist. Anschließend auf neutral waschen.

Umesterung. 1 g Cuticularmembran wird mit 5 ml 3% NaOMe in MeOH 30 Min. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden ca. 30 g des mit MeOH gewaschenen, stark sauren Ionenaustauschers I Merck zugesetzt, und 1 min geschüttelt. Eine Probe der überstehenden Flüssigkeit soll (mit einer gleichen Menge H_2O) gegen Phenolphthalein neutral reagieren, andernfalls muß noch länger geschüttelt werden. Anschließend wird das Gemisch in eine leere Chromatographiesäule von 2 cm Durchmesser gefüllt, die MeOH Lösung der Cutinsäuremethylester abgelassen und der auf der Säule verbleibende Austauscher mit MeOH und At_2O gewaschen. Die gesammelten Filtrate werden vereinigt. Die Lösungsmittel werden am Vakuumrotationsverdampfer abgezogen.

Silylierung. 50 mg Cutinsäuremethylester wurden in 0,1 ml N,O -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid gelöst und direkt in den Gaschromatographen eingespritzt.

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck). Zur Auftrennung der Cutinsäuren, erhalten durch Hydrolyse der Cuticularmembran mit 3%iger methanolischer KOH , wurden folgende Fließmittel verwendet: At_2O -Petroläther-Aceton-Essigsäure 21:7:3:1 (v/v);¹⁶ At_2O -Petroläther-Aceton-Essigsäure 10:10:2:1 (v/v);¹⁷ CHCl_3 - MeOH -Ameisensäure 20:1:3 (v/v); CHCl_3 -Essigsäure 9:1 (v/v).³

Die Fließmittel (1) und (3) geben gute Trennungen ohne Schwanzbildung. Threo- und erythro- Verbindungen werden erst durch mit 10% Borsäure imprägnierte Platten getrennt. Cutinsäuremethylester werden durch folgende Fließmittel getrennt: At_2O -Hexan- MeOH 40:10:1 (v/v);² CH_2Cl_2 . Beide Fließmittel geben eine gleich gute Trennscharfe und liefern gleiche R_F -Werte. Detektion mit halbkonz. H_2SO_4 und 0,5 stündiges Erhitzen bei 120°. (Verkohlen des organischen Materials)

Präparative Säulenchromatographie. 7 g Cutinsäuren, in absolutem AtOH gelöst, werden mit 20 g Kieselgel bis zur Trockne verrieben. Die Anreicherung wird auf eine Säule von 3 cm Durchmesser gegeben, die mit 300 g Kieselgel (Korngröße 0,2–0,5 mm) gefüllt ist.

Nummer der fraktion	Eluens (v/v)	ml	Anteil an den Gesamtcutinsäuren (%)
1	At_2O	2500	2,9
2	At_2O , Aceton, 20 + 1	600	9,1
3	At_2O , Aceton, 8 + 2	3800	41,2
4	At_2O , Aceton, 1 + 1	4000	10,8
5	Aceton	4000	30,3
			94,3

Die Fraktionen 2 und 5 werden durch mehrfach wiederholte Säulenchromatographie und durch Umkristallisation aus wäbrigem MeOH und Äthylacetat gereinigt und durch Infrarotspektroskopie, Gaschromatographie und Schmelzpunktbestimmung identifiziert.

Angaben zur Gaschromatographie. Bedingung I. Die Substanzen werden in N,O -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid gelöst, in den Gaschromatographen eingespritzt. Gaschromatograph: Varian Aerograph; Säule: SE 30 3% auf Aeropak 30, 100/120 mesh, 1,5 m. Injektor: 300°; Detektor: 300°; Temperaturprogramm: 90–270°, 2°/min Aufheizrate; Trärgas: N_2 30 ml/min.

Kopplung Gaschromatograph/Massenspektrometer. Gerät: LKB 9000 A (bestehend aus GC und MS). Als Bezugssubstanzen für mono-, di- und trihydroxylierte Fettsäuren dienen nach Silylierung 16-Hydroxyhexadecansäure, 10,16-Dihydroxyhexadecansäure und 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure.

Gaschromatograph. Bedingung II. Säule: 4% Silikongummi UCC-W 982 auf Chromosorb AW-DMCS, 2 m; Injektor: 320°; Temperaturprogramm: 24 min, isotherm 80°, dann Aufheizen mit 3°/min bis 240°; Separator: 290°; Trärgas: He 25 ml/min.

Massenspektrometer. Vakuum. Einlaßteil: 1. Stufe: 0,28 Torr, 2. Stufe: 2×10^{-3} Torr, Analysator: Vorvakuum: 0,018 Torr, Hockvakuum: 8×10^{-7} Torr.

Ionenquelle. Temperatur: 290°; Beschleunigungsspannung: 3,5 KV; Kriechstrom: 0,8 A; Filament: 3,8 A; Trap: 64 A; Box: 56 A; Spalt I: 0,08 mm; Spalt II: 0,10 mm.

Ionisationsspannung. 70 eV Multiplier-Empfindlichkeit: 1,7 und 1,9 KV; Massendurchlauf: 7. Filter: 240 c/s.

Anerkennungen.—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie für Sachspenden, den Herren Dr. Rickert und Dr. Monter, Farbenfabriken BAYER, Leverkusen, für die Durchführung der GC/MS und die kostenlose Überlassung des Materials.

¹⁶ C. H. BRIESKORN und J. Boß, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **66**, 925 (1964).

¹⁷ H. REINARTZ, *Über die Inhaltsstoffe der Tomatenschale*, Dissertation Universität Würzburg (1967).