

CARBONSÄUREN UND ALKANOLE DES CUTINS UND SUBERINS VON *SOLANUM TUBEROSUM*

CARL HEINZ BRIESKORN und PETER H. BINNEMANN [1]

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität D-8700 Würzburg

(Eingegangen 30 Juli 1974)

Key Word Index—*Solanum tuberosum*; Solanaceae; potato; cutin; suberin; alkan-1-ols; fatty acids; dicarboxylic acids; hydroxy acids.

Abstract—The cutin of the leaves of *Solanum tuberosum* consists of isomeric dihydroxyhexadecanoic acids (51%), C_{17} , C_{18} , C_{26} , C_{28} -alkan-1-ols, C_{14-18} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28} monobasic acids, C_9 - and C_{16} -dibasic acids, C_9 , C_{16} and C_{18} ω -hydroxymonobasic acids, C_{15} - and C_{16} -monohydroxydibasic acids, 9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acid, *threo*- and *erythro*-9,10,18-trihydroxyoctadecanoic acids. The cutin and the suberin of potatoes differs markedly in composition, especially in the content of dihydroxyhexadecanoic acid, octadecenoic dibasic acid and 18-hydroxyoctadecenoic acid.

Zusammenfassung—Das Cutin des Blattes von *Solanum tuberosum* L. besteht neben isomeren Dihydroxyhexadecansäuren (51%) noch aus Alkanolen (C_{17} , C_{18} , C_{26} , C_{28}), Monocarbonsäuren (C_{14-18} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28}), Dicarbonsäuren (C_9 , C_{16}), ω -Hydroxycarbonsäuren (C_9 , C_{16} , C_{18}), Mono-hydroxydisäuren (C_{15} und C_{16}), 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure, *threo*- und *erythro*-9,10,18-Trihydroxyoctadecensäuren. Die Zusammensetzung unterscheidet sich deutlich von der des Suberins der Kartoffelschale, insbesondere im Gehalt an Dihydroxyhexadecansäure, Octadecenoicäure und 18-Hydroxyoctadecensäure.

EINLEITUNG

Als Bestandteile des Cutins von *Solanum tuberosum* identifizierten Baker und Martin [2] 10,16-Dihydroxyhexadecansäure und 18-Hydroxyoctadecansäure. Auf Grund der Ergebnisse an anderen Cutinarten [3-6] schien uns dieses Ergebnis unvollständig. Die von uns durchgeföhrte Analyse des Suberins der Sproßknolle [7, 8] veranlaßte uns, auch das Cutin von *S. tuberosum* erneut zu analysieren und einen Vergleich mit den Bestandteilen des Suberins anzustellen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Cutin

Die Blattcuticula von *S. tuberosum*, Kartoffelsorte, wurde nach dem Oxalatverfahren [9-12] abgetrennt und von allen extrahierbaren Stoffen, einschließlich Cellulose (41%) befreit [4, 9, 10, 13].

Das verbliebene Cutin hydrolysierten wir mittels methanol. Kalilauge. Die über einen Ionenaustauscher erhaltenen freien Säuren wurden methyliert. Im methylierten Gesamthydrolysat ergaben sich DC-Hinweise auf Alkanole und Hydroxycarbonsäuremethylester. Das methylierte Gesamthydrolysat wurde daher zusätzlich noch silyliert und dann über eine GC-MS-Kopplung identifiziert. Die aus dem MS gewonnenen Aussagen erhärteten wir mittels authentischer Substanzen gaschromatographisch.

Das Cutin des Blattes von *S. tuberosum* ist danach aus den in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungsklassen bzw. Einzelkomponenten aufgebaut.

Von den aufgeführten Verbindungen ist Nonanidisäure als Bestandteil des Cutins bisher noch nicht beschrieben. Ihre Identifizierung erfolgte MS [10, 14-16] sowie GLC über Homologe [17].

Tabelle 1. Qualitative und quantitative Zusammensetzung des Cutins von *Solanum tuberosum*

Verbindungsklasse	Anteil am Cutin (%)	Verbindungen	Anteil am Cutin (%)
<i>n</i> -Alkanole	2,8	C ₁₇ C ₁₈ C ₂₆ C ₂₈	0,3 0,2 2,1 0,2
Monocarbonsäuren	16,6	C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇ C _{18:2*} C _{18:1} C ₁₈ C ₂₀ C ₂₂ C ₂₄ C ₂₆ C ₂₈	0,5 0,6 6,2 Spur 0,3 0,3 3,2 0,5 0,6 2,6 0,8 1,0
Dicarbonsäuren	2,1	C ₉ C ₁₆	1,7 0,4
ω -Hydroxycarbonsäuren	4,7	C ₉ C ₁₆ C ₁₈	0,5 3,5 0,7
Monohydroxydicarbonsäuren	5,4	C ₁₅ C ₁₆	3,1 2,3
Dihydroxymonocarbonsäure	51,0	C ₁₆	51,0
Trihydroxycarbonsäuren	12,1	C _{18:1} C ₁₈	1,2 11,0
Nicht identifizierbar	5,3		5,3

* C₁₈-Säure mit zwei Doppelbindungen usw.

Auch 9-Hydroxycarbonsäure wurde in der Literatur bisher noch nicht erwähnt. Möglicherweise war sie bei früheren GLC Analysen durch die Wahl zu hoher Ofentemperatur Bestandteil der Lösungsmittelfront und wurde dadurch als Bestandteil des Cutins nicht gefunden. Die ω -Hydroxycarbonsäuren identifizierten wir als TMSi-Äthermethylester GLC mittels homologer Verbindungen [17] und MS über die GC-MS-Kopplung [5, 18, 19].

Für zwei weitere Peaks im Totalionenstromchromatogramm des Gesamthydrolysats ergab die MS-Auswertung, daß jeweils Gemische isomerer Monohydroxypentadecan- bzw. Monohydroxyhexadecanisäuren vorliegen. Wie beschrieben [20], sind die TMSi-Äthermethylester dieser Isomeren gaschromatographisch auf SE 30, OV 1 und OV 17 nicht auftrennbar und treten deshalb gemeinsam in einem Peak auf. Sie lassen sich aber massenspektrometrisch an Hand stark ausgeprägter Schlüsselbruchstücke sehr leicht und sicher nebeneinander identifizieren. Der nicht aufgelöste Peak von 6- und 7-Hydroxypentadecandi-

säuremethylestern ergibt z.B. neben den gemeinsamen, für TMSi-Äther typischen M⁺-15, M⁺-31 und M⁺-47 Fragmenten [18, 21-24] unterschiedliche Schlüsselbruchstücke bei *m/e* 217 und 273 bzw. 231 und 259. Sie entstehen durch Bruch des Moleküls neben dem Kohlenstoffatom, das die TMSi-Gruppe trägt. Die Summe der jeweiligen Hauptfragmente minus 102 [gleich der gemeinsamen CHOSi (CH₃)₃-Gruppe] ergibt jeweils das MW von 388 [21, 25].

Auf gleiche Weise ließen sich auch die beiden isomeren 7- bzw. 8-Hydroxyhexadecanisäuren nebeneinander identifizieren. Das MS-Ergebnis erhärteten wir zusätzlich durch Bestimmen der GLC-Retentionsindizes nach van den Dool und Kratz [26]. Authentisches Vergleichsmaterial stand nicht zur Verfügung. Als Retentionsindizes wurden auf SE 30 für die Monohydroxypentadecanisäuredimethylester 2354 und für die Monohydroxyhexadecanisäuredimethylester 2440 gefunden. Sie stimmten mit den Angaben von Hunnemann [27] überein. Die Möglichkeit, daß statt der Monohydroxydisäuredimethylester

Methoxyartefakte vorlägen [28], schlossen wir aus, da weder bei Alkanolen noch bei Hydroxycarbon-säuren mit primärer Alkoholgruppe unter den verwendeten Methylierungsbedingungen (Methanolzusatz!) [8, 29] Methoxyartefakte beobachtet werden konnten.

Hauptbestandteil des Kartoffelblattcutins sind die strukturisomeren 7,16-, 8,16-, 9,16- und 10,16-Dihydroxyhexadecansäuren. Sie treten im GLC als ein Peak auf, lassen sich aber MS über ihre TMSi-Äthermethylester mittels charakteristischer Schlüsselbruchstücke nebeneinander identifizieren. Zum gleichen Ergebnis kommen Holloway und Deas [30] bei isomeren Dihydroxycarbon-säuren in verschiedenen Cutinen und Suberinen. Die TMSi-Äther-TMSi-Ester bestätigen dieses Ergebnis [8, 30].

Bemerkenswert ist die Anwesenheit der 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure. Sie erschien im GLC bei Verwendung von SE 30 kurz vor der gesättigten Säure. Ihre Identität ließ sich MS über den TMSi-Äthermethylester beweisen. Die Fragmentierung verläuft dabei analog zur gesättigten 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure. Die TMSi-Äther von 9,10,18-Trihydroxysäurederivaten spalten ebenfalls bevorzugt zwischen den vicinalen Kohlenstoffatomen, welche die TMSi-Gruppe tragen [5, 10, 11, 18]. Sie lassen sich an Hand der dabei entstehenden Schlüsselionen—*m/e* 259 und 301 bei der 9,10,18-Trihydroxyoctadecen- und *m/e* 259 und 303 bei der 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure—identifizieren. Die Summe der beiden Fragmente ergibt wieder jeweils das Molekulargewicht.

Im isotherm oder mit geringer Heizrate gefahrenen GLC spaltet der TMSi-Äther des 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäuremethylesters schwach in zwei Peaks auf, deren MS qualitativ identisch sind. Lediglich Unterschiede in den Peakhöhen der meisten Hauptfragmente sind erkennbar. Sie stammen von den nebeneinander vorliegenden *threo*- und *erythro*-Formen der 9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure. Hunneman [31, 32] stellte gleiches beim Apfelson fest und belegte dies mit authentischen Substanzen.

Die Alkanole wurden als TMSi-Äther nicht nur MS [33, 34] sowie GLC durch Zumischen authentischer Substanzen, sondern auch nach der Beziehung von James und Martin [17] identifiziert.

Schließlich sind noch Monocarbonsäuren Be-

standteile des Cutins. Wir identifizierten sie über die Methylester durch Vergleich mit bereits publizierten Spektren [14, 35–37]. Linol- und Linolensäure lassen sich auf der verwendeten SE 30-Säule

Tabelle 2. Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung zwischen Cutin und Suberin von *Solanum tuberosum**

	Suberin (%)	Cutin (%)
Nonandisäure	—	1,70
9-Hydroxynonansäure	—	0,50
Tetradecansäure	—	0,50
Pentadecansäure	—	0,60
Hexadecansäure	—	6,40
Hexadecanol	0,40	—
Heptadecansäure	—	0,05
Heptadecanol	0,05	0,30
Octadecadiensäure	—	0,30
Octadecensäure	—	0,20
Octadecansäure	0,10	3,20
Octadecanol	0,80	0,20
Hexadecanidisäure	0,04	0,40
Nonadecanol	0,20	—
16-Hydroxyhexadecansäure	0,05	3,50
Eicosansäure	—	0,50
Heptadecanidisäure	0,03	—
Eicosanol	0,20	—
Monohydroxypentadecanidisäuren	—	3,10
Octadecenidisäure	30,50	—
18-Hydroxyoctadecensäure	32,50	—
18-Hydroxyoctadecansäure	0,70	0,70
Monohydroxyhexadecanidisäuren	—	2,30
Dihydroxyhexadecansäuren	—	51,00
Docosansäure	0,60	0,60
Docosanol	2,50	—
Tetracosansäure	1,30	2,70
Tetracosanol	1,50	—
9,10,18-Trihydroxyoctadecensäure	—	1,20
9,10-Dihydroxyoctadecanidisäure	0,80	—
9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure	0,60	11,00
Docosanidisäure	0,30	—
22-Hydroxydocosansäure	0,80	—
Hexacosansäure	2,30	0,80
Hexacosanol	2,50	2,20
Tetracosanidisäure	0,30	—
24-Hydroxytetracosansäure	0,20	—
Octacosansäure	3,90	1,00
Octacosanol	4,00	0,20
Nonacosansäure	0,35	—
26-Hydroxyhexacosansäure	0,20	—
Triacontansäure	2,50	—
Triacontanol	0,30	—
28-Hydroxyoctacosansäure	0,80	—
Nicht identifizierbar	7,20	5,30

* Der Vergleich der Cutin- und Suberinbestandteile erfolgte an Hand der unter identischen Bedingungen gewonnenen Übersichtschromatogramme der Gesamthydrolysate. Nach sc- oder DC-Vortrennung lassen sich—wie z.B. beim Suberin [8]—noch geringe Mengen weiterer Bestandteile nachweisen.

nur schlecht von Ölsäure trennen und treten deshalb als Schultern im Ölsäurepeak auf. Ihr Nachweis gelang jedoch einwandfrei durch MS Abtasten des Ölsäuremethylesterpeaks.

Vergleich der Bestandteile von Cutin und Suberin bei *S. tuberosum*

Verglichen wurden jeweils die methylierten und silylierten Gesamthydrolysate von Cutin und Suberin [1, 7, 8] mittels einer GC-MS-Kopplung. Qualitativ und quantitativ unterscheiden sich Cutin und Suberin im wesentlichen entsprechend den Angaben in Tabelle 2.

Dihydroxyhexadecansäure, 9,10,18-Trihydroxyoctadecansäure und Palmitinsäure, häufig Hauptbestandteile des Cutins [3, 5, 38-40], liegen beim Suberin von *S. tuberosum* (s. Tab. 2) kaum oder nur in sehr geringen Mengen vor. Kartoffelsuberin enthält als Hauptbestandteile die ungesättigten Verbindungen Octadecendisäure und 18-Hydroxyoctadecensäure. Kennzeichnend sind auch ein wesentlich höherer Gehalt an Dicarbonsäuren und ein deutlich geringerer an mehrfach hydroxylierten Säuren als im Cutin. Langketige Alkanole, Mono-, Di- und ω -Hydroxykarbonsäuren sind als Bestandteile in weit stärkerem Umfang im Suberin als im Cutin vertreten. Cutin wiederum enthält Verbindungen geringerer Kettenlänge, z.B. Nonanidsäure oder 9-Hydroxy-nonansäure, die im Suberin fehlen.

Holloway, Baker und Martin [41] verglichen bereits bei anderen Pflanzen Cutin mit Suberin. Auch sie fanden beträchtliche Unterschiede in der Zusammensetzung.

Für eine generelle Aussage über einen unterschiedlichen Aufbau von Cutin und Suberin bedarf es aber noch umfassenderer Arbeiten über Suberin.

EXPERIMENTELLES

Isolieren des Cutins und Gewinnen der Cutinbestandteile. 36 kg frisch geerntete Blätter von *S. tuberosum*, Sorte "Mittelfrühre Irmgard", mit zehnfacher Menge Oxalatpufferlösung (0,4% Oxalsäure + 1,6% Ammoniumoxalat) 10 Tage unter Röhren erhitzen. Nach Absieben, Waschen, Gefrieretrocknen: 18 g Cuticula (0,05% des Blattfrischgewichtes). Extrahieren der löslichen Bestandteile (15%) und Entfernen der Cellulose (26%) wie bereits beschrieben [1, 8]. Zum Gewinnen der Cutinbestandteile Verseifen mit MeOH-KOH und Überführen der Kaliumsalze in die freien Cutinsäuren mittels Ionenaustauscher wie bereits beschrieben [1, 8].

Chromatographie. Herstellung von Methylestern und Silyl-äthern der Einzelkomponenten wurde bereits früher be-

schrieben [1, 8]. GLC: Acograph 1400 invarian mit FID; Stahlsäule: 1,5 m \times 3 mm, SE 30 (3% auf Chromosorb W); Einspritz- und Detektorblocktemperatur: 300°. Identifizierung mit authentischen Substanzen: Temperaturprogramm: 130-300°, 2°/min. Nachweis über Homologe: je nach Retentionszeit der Verbindung isotherm bei Temperaturen zwischen 130 und 180°. Bestimmung der Retentionsindizes mit authentischem Nonadecan, Heneicosan und Hexacosan. Quantitative Bestimmungen durch Wägung der photokopierten Peakflächen des temperaturprogrammierten GLC. Werte sind nicht mittels Eichfaktoren korrigiert.

GC-MS-Kopplung. LKB 9000 Spektren bei 70 eV, TIC bei 20 eV, GLC-Temperaturprogramm: Suberinhydrolysat: 150-200°, 2°/min., Cutinhydrolysat: 120-250°, 2°/min., Glassäule: 3 m \times 3 mm, SE 30 (1% auf Gas-Chrom Q 100-120 mesh) Trägergas: He 30 ml/min., Temperaturen: Einspritzblock: 290°, Separator: 270°, Ionenquelle: 270°.

Anerkennungen. Danksagung: Der Fonds der Chemischen Industrie unterstützte unsere Arbeit durch Gewährung eines Stipendiums an P.H.B.

LITERATUR

1. Teil der Dissertation P. H. Binnemann, Univ. Würzburg (1973) "Über die chemische Zusammensetzung des Suberins bei der Kartoffelschale und des Cutins beim Kartoffelblatt".
2. Baker, E. A. und Martin, J. T. (1963) *Nature* **199**, 1268.
3. Baker, E. A. und Holloway, P. J. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1557.
4. Croteau, R. und Fagerson, I. S. (1972) *Phytochemistry* **11**, 353.
5. Hunneman, D. H. (1970) Dissertation University of Bristol.
6. Holloway, P. J., Deas, A. H. B. und Kabaaru, A. M. (1972) *Phytochemistry* **11**, 1443.
7. Brieskorn, C. H. und Binnemann, P. H. (1972) *Tetrahedron Letters* 1127.
8. Brieskorn, C. H. und Binnemann, P. H. (1974) *Z. Lebensm. Unters. u. Forsch.* **154**, 213.
9. Baker, E. A., Batt, R. F. und Martin, J. T. (1964) *Ann. Appl. Biol.* **53**, 59.
10. Eglinton, G. und Hunneman, D. H. (1968) *Phytochemistry* **7**, 313.
11. Brieskorn, C. H. und Kabelitz, L. (1971) *Phytochemistry* **10**, 3195.
12. Martin, J. T. (1960) *J. Sci. Food Agr.* **11**, 635.
13. Holloway, P. J. und Baker, E. A. (1968) *Plant Physiol.* **43**, 1878.
14. McCloskey, J. A. (1970) *Topics Lipid Chem.* **1**, 369.
15. Holmes, J. L. und Jean, T. St. (1970) *Org. Mass Spectrom.* **3**, 1505.
16. Ryhage, R. und Stenhammar, E. (1959) *Arkiv Kemi* **14**, 497.
17. James, A. T. und Martin, A. J. P. (1952) *Biochem. J.* **50**, 679.
18. Eglinton, G., Hunneman, D. H. und McCormick, A. (1968) *Org. Mass Spectrom.* **1**, 593.
19. Eglinton, G., Hunneman, D. H. und Douraghi-Zadeh, K. (1968) *Tetrahedron* **24**, 5929.
20. Hunneman, D. H. (1970) Dissertation University of Bristol S. 130-134.
21. Capella, P., Galli, C. und Fumagalli, R. (1968) *Lipids* **3**, 431.
22. Capella, P. und Zorlut, C. M. (1968) *Analyt. Chem.* **40**, 1458.
23. Draffan, G. H. und Stillwell, R. N. (1968) *Org. Mass Spectrom.* **1**, 669.

24. Wolff, G., Wolff, R. E. und McCloskey, J. A. (1966) *Tetrahedron Letters*, 4335.
25. Hunnemann, D. H. (1970) Dissertation University of Bristol S. 92.
26. Van den Dool, H. und Kratz P. Dec. (1963) *J. Chromatograph.* **11**, 463.
27. Hunnemann, D. H. (1970) Dissertation University of Bristol, S. 131.
28. Holloway, P. J. und Deas, A. H. B. (1971) *Chem. Ind. (London)* 1140.
29. Schlenk, H. und Gellermann, J. L. (1960) *Analyt. Chem.* **32**, 1412.
30. Holloway, P. J. und Deas, A. H. B. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2781.
31. Hunnemann, D. H. (1970) Dissertation University of Bristol, S. 57.
32. Hunnemann, D. H. (1970) Dissertation University of Bristol, S. 65.
33. Sharkey, A. G., Friedel, R. A. und Langer, S. H. (1957) *Analyt. Chem.* **29**, 770.
34. Walton, T. J. und Kolattukudy, P. E. (1972) *Biochemistry* **11**, 1885.
35. Hallgreen, B., Ryhage, R. und Stenhamn, E. (1959) *Acta Chem. Scand.* **13**, 845.
36. Ryhage, R. und Stenhamn, E. (1959) *Arkiv Kemi* **13**, 523.
37. Ryhage, R. und Stenhamn, E. (1963) *Mass Spectrometry of Long-Chain Esters* (McLafferty, F. W., Ed.), S. 399, Academic Press, New York.
38. Baker, E. H. und Martin, J. T. (1967) *Ann. Appl. Biol.* **60**, 313.
39. Holloway, P. J. und Baker, E. A. (1970) *Ann. Appl. Biol.* **66**, 145.
40. Martin, J. T. und Juniper, B. E. (1970) *The Cuticles of Plants*, E. Arnold, Edinburgh.
41. Holloway, P. J., Baker, E. A. und Martin, J. T. (1972) *Anales Real Soc. Espan. Fis. y Quim.* **68**, 905.