

**Rutschige Oberflächen von karnivoren Kannenpflanzen (Nepenthaceae):  
Physikalisch-chemische Eigenschaften und mikroskopische Struktur  
epikutikulärer Wachskristalle von  
*Nepenthes alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia*.**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Michael Riedel  
aus Freiburg i. Br.

Würzburg 2004

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau und Funktion der pflanzlichen Kutikula	1
1.2	Funktionen epikutikulärer Wachskristalle	2
1.3	Morphologie und chemische Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle	4
1.4	Kannenpflanzengewächse (Nepenthaceae)	6
1.5	Ziele der Arbeit	9
<b>2</b>	<b>Identifikation und Quantifizierung von Nebenprodukten während der Derivatisierung kutikulärer Wachse mit BSTFA</b>	<b>10</b>
2.1	Einleitung	10
2.2	Material und Methoden	13
2.2.1	Pflanzenmaterial	13
2.2.2	Synthese von Triacontanal	13
2.2.3	Charakterisierung von Reaktionsprodukten während der Probenvorbereitung	14
2.2.3.1	Reaktionen von Triacontanal mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien	14
2.2.3.2	Reaktionen von Aldehyden mit primären Alkoholen	14
2.2.4	Extraktion und Analyse kutikulärer Wachse	15
2.2.5	Gaschromatographie und Massenspektrometrie	15
2.2.6	Interne Standardisierung	16
2.3	Ergebnisse	17
2.3.1	Qualitative Zusammensetzung von Triacontanal-Lösungen nach einer Behandlung mit BSTFA	17
2.3.2	Überprüfung der Reaktionsprodukte	21
2.3.2.1	Behandlung von Triacontanal-Lösungen mit MTBSTFA	21
2.3.2.2	Behandlung von Triacontanal-Lösungen mit BSA	22
2.3.3	Behandlung kutikulärer Wachse von <i>N. alata</i> mit BSTFA	23
2.3.4	Wiederfindung von Triacontanal nach einer Behandlung mit BSTFA	24
2.3.5	Reaktionsprodukte von Aldehyden mit Komponenten der kutikulären Wachse von <i>N. alata</i> nach einer Behandlung mit BSTFA	27
2.3.6	Reaktionsprodukte synthetischer Aldehyde und primärer Alkohole nach einer Behandlung mit BSTFA	29
2.3.7	Quantifizierung von gebundenen Aldehyd- und Alkohol-Homologen in kutikulären Wachsen von <i>N. alata</i> nach einer Behandlung mit BSTFA	33
2.4	Diskussion	36
2.4.1	Qualitative Zusammensetzung von Triacontanal-Lösungen nach einer Behandlung mit BSTFA	37
2.4.1.1	Massenspektrum von <i>n</i> -Triacontanal	37
2.4.1.2	Derivatspektren	39
2.4.2	Derivatisierung kutikulärer Wachse von <i>Nepenthes</i> mit BSTFA	45
2.4.3	Wiederfindung von Triacontanal nach einer Behandlung mit BSTFA	46
2.4.4	Reaktionen von Aldehyden mit Komponenten der kutikulären Wachse von <i>N. alata</i> während der Behandlung mit BSTFA	48

---

---

2.4.5	Reaktionsprodukte von synthetischen Aldehyden mit primären Alkoholen nach einer Behandlung mit BSTFA	48
2.4.6	Reaktionsprodukte von Aldehyden mit primären Alkoholen in kutikulären Wachsen von <i>N. alata</i> nach einer Behandlung mit BSTFA	51
2.4.7	Quantifizierung der in Alkenyl-Alkyl-Ethern gebundenen Alkohol- und Aldehyd-Mengen	52
<b>3</b>	<b>Zusammensetzung und Struktur kutikulärer Wachse von <i>N. alata</i>, <i>N. albomarginata</i> und <i>N. intermedia</i></b>	<b>56</b>
3.1	Einleitung	56
3.2	Material und Methoden	58
3.2.1	Pflanzenmaterial	58
3.2.2	Herstellung der Gummi arabicum Lösung	58
3.2.3	Mechanische Wachspräparationen	58
3.2.3.1	Gefrorenes Wasser als Klebstoff: Kryo-Methode	58
3.2.3.2	Gummi arabicum als Klebstoff	59
3.2.4	Extraktion kutikulärer Wachse	60
3.2.4.1	Nachextraktion	60
3.2.4.2	Gesamtwachsextraktion	60
3.2.5	Probenvorbereitung und chemische Analyse	60
3.2.6	Rasterelektronenmikroskopie	62
3.2.7	Statistische Verfahren	62
3.3	Ergebnisse	63
3.3.1	Rasterelektronenmikroskopie nativer Oberflächen der Gleitzone von <i>N. alata</i> Kannen	63
3.3.2	Effizienz und rasterelektronenmikroskopische Kontrolle der mechanisch-chemischen Methoden zur Präparation kutikulärer Wachse	64
3.3.3	Chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse von <i>N. alata</i>	68
3.3.3.1	Mechanische Präparationen mit gefrorenem Wasser und Gummi arabicum als Klebstoffe	68
3.3.3.2	Chemische Extraktionen nach mechanischer Präparation	70
3.3.3.3	Gesamtwachsextraktionen	72
3.3.4	Rasterelektronenmikroskopie nativer Oberflächen der Gleitzone von <i>N. albomarginata</i> und <i>N. intermedia</i> Kannen	75
3.3.5	Präparation kutikulärer Wachse der Gleitzone von <i>N. albomarginata</i> und <i>N. intermedia</i> Kannen	76
3.3.5.1	Mechanische Präparation mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und Nachextraktion	76
3.3.5.2	Rasterelektronenmikroskopische Kontrolle der mechanisch-chemischen Präparationsmethoden	78
3.3.6	Chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse von <i>N. albomarginata</i> und <i>N. intermedia</i>	78
3.3.6.1	Mechanische Präparationen	78
3.3.6.2	Chemische Extraktion nach mechanischen Präparationen	83
3.3.6.3	Gesamtwachsextraktionen	85
3.4	Diskussion	91
3.4.1	Selektivität von Methoden zur mechanischen Wachspräparation	92

---

---

3.4.2	Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle und intrakutikulärer Wachse der Gleitzonen verschiedener <i>Nepenthes</i> -Arten	94
3.4.3	Gesamtwachsextraktionen	96
<b>4</b>	<b>IR-Spektroskopische Analyse epikutikulärer Wachse von <i>N. alata</i>, <i>N. albomarginata</i> und <i>N. intermedia</i></b>	<b>99</b>
4.1	Einleitung	99
4.2	Material und Methoden	104
4.2.1	FT-IR-Spektroskopie	104
4.2.2	Pflanzenmaterial	104
4.2.3	Präparation epikutikulärer Wachskristalle	104
4.2.4	Extraktion des ZnSe-Kristalls	106
4.2.5	Triacontanal-Standard	106
4.3	Ergebnisse	107
4.3.1	Phasenverhalten von <i>n</i> -Triacontanal	107
4.3.2	Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle von <i>N. alata</i>	111
4.3.3	Einfluss der Präparationsmethode auf die Form der Aldehyde in epikutikulären Wachskristallen von <i>N. alata</i>	113
4.3.4	Reversibilität der Monomeren-Bildung	114
4.3.5	Einfluss des Lösungsmittels	115
4.3.6	Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle von <i>N. albomarginata</i> und <i>N. intermedia</i>	118
4.4	Diskussion	122
4.4.1	IR-spektroskopische Eigenschaften von synthetischem <i>n</i> -Triacontanal	123
4.4.1.1	nach Rekristallisation	123
4.4.1.2	Phasenverhalten	124
4.4.2	IR-spektroskopische Eigenschaften der epikutikulären Wachskristalle verschiedener <i>Nepenthes</i> -Arten	125
4.4.3	Allgemeines Modell der molekularen Anordnung kutikulärer Wachskomponenten	127
4.4.4	Auswirkungen polymerer Aldehyde auf das Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle verschiedener <i>Nepenthes</i> -Arten	129
4.4.5	Polymerisation von Aldehyden in den epikutikulären Wachskristallen von <i>N. alata</i>	132
4.4.6	Ökologische Funktion und Biosynthese epikutikulärer Wachskomponenten der Gleitzone von <i>Nepenthes</i>	135
4.4.7	Mechanismus rutschiger epikutikulärer Wachskristalle in <i>Nepenthes</i> -Kannen	139
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>144</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>148</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>159</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>160</b>
	<b>Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden</b>	<b>161</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>162</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>163</b>

---

---

## 1 Einführung

### 1.1 Aufbau und Funktion der pflanzlichen Kutikula

Die Kutikula bildet bei höheren Landpflanzen die äußere Abgrenzung der oberirdischen Organe mit primärem Abschlussgewebe und schließt diese gegen die Atmosphäre ab. Beispiele für solche Organe sind Blattspreiten, Früchte, Blüten und unverholzte Sprossachsen. Die Kutikula ist dabei den äußeren Zellwänden der Epidermiszellen als lückenlose und 1-15 µm dicke Membran aufgelagert. Der fein-strukturelle Aufbau der Kutikula kann zwischen verschiedenen Pflanzenarten, -organen und deren Entwicklungsstadien stark variieren. Es lassen sich jedoch immer mehrere Schichten unterscheiden, die durch unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften gekennzeichnet sind. Der Hauptbestandteil der Kutikula ist Kutin, ein dreidimensionales Netzwerk aus veresterten Di- und Trihydroxyfettsäuren mit Kettenlängen von  $C_{16}$  und  $C_{18}$ . In diese chemisch relativ resistente und hydrophobe Polymermatrix sind lösliche Lipide (SCL, soluble cuticular lipids) eingelagert, die allgemein als kutikuläre Wachse bezeichnet werden. Dabei handelt es sich meist um komplexe Gemische aus homologen Reihen sehr langkettiger, aliphatischer Substanzen. Als Bestandteile kutikulärer Wachse sind *n*-Alkane, primäre Alkohole, *n*-Alkanale und Karbonsäuren mit Kettenlängen von  $C_{20}$  bis  $C_{36}$ , sowie Alkyl-Ester mit Kettenlängen zwischen  $C_{40}$  und  $C_{60}$  weit verbreitet. Weniger verbreitet sind Alkanone, sekundäre Alkohole und  $\beta$ -Diketone, sowie zyklische Verbindungen wie Phenole, Steroide oder Triterpenoide, die in Einzelfällen jedoch auch die dominierenden Substanzklassen darstellen können (Baker 1982; Walton 1990; Bianchi 1995).

Den Zellwänden der Epidermiszellen direkt aufgelagert befindet sich zunächst eine pektinreiche Schicht, die der Mittellamelle entspricht und mit dieser verbunden ist. Dieser Schicht aufgelagert ist die so genannte Kutikuläre Schicht (Mohl 1847). Sie besteht aus Kutin und den darin eingelagerten (intrakutikulären) Wachsen und kann zusätzlich Zellwandbestandteile wie Cellulose, Pektin und andere Kohlenwasserstoffe enthalten. Darüber befindet sich eine Schicht, die ausschließlich aus Kutin und den darin eingelagerten Wachsen besteht und als eigentliche Kutikula (Mohl 1847) bzw. als `cuticle proper` (Holloway 1982) bezeichnet wird. Zur Atmosphäre hin ist der eigentlichen Kutikula ein amorpher Film aus epikutikulärem Wachs aufgelagert, aus dem in bestimmten Fällen Wachskristalle in charakteristischer Form hervortreten können.

---

Die Kutikula bildet die Abgrenzung der Pflanze zu ihrer abiotischen und biotischen Umwelt. Auf Grund dieser exponierten Lage, werden ihr vielfältige ökologische Funktionen zugeschrieben. Ihre evolutive Entstehung wird in erster Linie als Anpassung an das in terrestrischen Lebensräumen herrschende Wasserpotentialgefälle zwischen dem Pflanzengewebe und der Atmosphäre gesehen. Sie stellt eine wirkungsvolle Barriere gegen einen Wasserverlust über die Oberfläche dar. Dieser Transpirationsschutz wird vor allem durch die Einlagerung der kutikulären Wachse in die Kutinpolymermatrix erreicht. Werden die Wachse durch chemische Extraktion aus der Kutikularmembran entfernt, steigt deren Permeabilität für Wasser um mehrere Größenordnungen an (Riederer 1991). Im Gegensatz dazu, können auf Grund der chemischen Eigenschaften der kutikulären Wachse zahlreiche lipophile Substanzen aus der Umgebung in Form gasförmiger, fester oder gelöster Stoffe absorbiert und in die Pflanze transportiert werden (Riederer und Schönherr 1986; Schönherr und Riederer 1989; Schreiber und Schönherr 1992). Neben den chemischen, werden auch die mechanischen Eigenschaften der Kutikula durch ihre Zusammensetzung beeinflusst (Petracek und Bukovac 1995; Wiedermann und Neinhuis 1998; Marga et al. 2001). Die Kutinmatrix verleiht der Kutikula mechanische Stabilität (Edwards et al. 1996; Heredia 2003) und wirkt sich so z.B. auch auf die Anfälligkeit der Pflanze gegen Pathogenbefall aus (Stoner 1990; Hammer und Evensen 1994).

## **1.2 Funktionen epikutikulärer Wachskristalle**

Epikutikuläre Wachskristalle sind im Pflanzenreich weit verbreitet und bilden bei vielen Pflanzenarten oder -organen die äußerste Grenzschicht des Gewebes gegen die Umwelt. Daher treten in erster Linie die Kristalle mit abiotischen oder biotischen Umweltfaktoren in Wechselwirkung. Auf Grund des spezifischen Vorkommens auf bestimmten Oberflächen wurden ihnen vielfältige Funktionen in unterschiedlichen ökologischen Zusammenhängen zugeschrieben. So können kaminartig um Stomata angeordnete Wachskristalle die Verdunstung aus der Atemhöhle durch Bildung bewegungsfreier Luftschichten verringern und somit neben den intrakutikulären Wachsen zum Transpirationsschutz der Pflanze beitragen (Jeffree et al. 1971). Epikutikuläre Wachskristalle reduzieren zudem die Strahlungsintensität, insbesondere ultravioletter Strahlung, durch Teilreflexion (Clark und Lister 1975) und schützen somit das darunter liegende Gewebe vor Strahlungsschäden (Caldwell et al. 1983; Markstädter 1994). Auch die Wechselwirkungen mit anderen Organismen sind in vielfältiger Weise durch epikutikuläre Wachse bestimmt. So beeinflussen sie z.B. die Infektion der

---

---

Pflanze durch phytopathogene Pilze in Phasen der Orientierung (Holthuis und Boyle 1989; Schwab et al. 1995; Wilkinson und Roberts 1996) sowie der Adhäsion des Pilzes auf der Oberfläche (Deising et al. 1992; Nicholson et al. 1993; Mercure et al. 1994) und liefern chemische Signale im Zuge der Wirtserkennung durch den Pilz (Carver et al. 1990; Podila et al. 1993; Hedge und Kolattukudy 1997; Inyang et al. 1999). Durch die lipophilen Eigenschaften des Wachses, in Kombination mit der Entstehung mikroskopischer Rauigkeit durch Kristallbildung, reduziert sich die Benetzbarkeit der Pflanzenoberflächen durch Wasser in erheblichem Maße (Holloway 1969, 1970). Dadurch perlen Wassertropfen von der Oberfläche ab und die Bildung eines geschlossenen Wasserfilms wird verhindert. Dies hat zum einen die Folge, dass die Verbreitungseinheiten phytopathogener Mikroorganismen, aber auch Schmutz- und Staubpartikel mit abperlenden Wassertropfen von der Oberfläche abgewaschen werden (Barthlott und Neinhuis 1997). Zum anderen fehlt dadurch die zum Auskeimen der Pilzsporen benötigte Feuchtigkeit (Martin 1964; Schwab et al. 1995).

Zudem war seit langem bekannt, dass mit Wachs bereifte Pflanzenoberflächen rutschig für laufende Insekten sein können. Dabei wurde vermutet, die Bereifung diene dem Schutz von Blüten oder Blütenständen vor nektarraubenden Ameisen (Kerner von Marilaun 1878; Harley 1991). In einigen Fällen konnte gezeigt werden, dass kristalltragende Oberflächen mechanische Hindernisse für herbivore Schadinsekten bilden (Stork 1980a, 1980b; Edwards 1982), wohingegen in anderen Fällen die Schäden durch Herbivorie über tritrophische Interaktionen zunahmen (Eigenbrode et al. 1995).

Jedoch konnte bisher nur für wenige Pflanzensysteme nachgewiesen werden, dass die epikutikulären Wachskristalle auf Grund ihrer Eigenschaften eine definierte ökologische Funktion erfüllen und dahingehend evolutionär optimiert sind. Dies konnte am Beispiel der Ameisenpflanzengattung *Macaranga* gezeigt werden. Diese Pflanzen bieten spezifischen Partnerameisen Nistraum und Nahrung und werden im Gegenzug vor herbivoren Insekten und dem Überwachsen durch andere Pflanzen geschützt (Fiala et al. 1989). Die Sprossachsen und Blattstiele vieler *Macaranga*-Arten sind von einer Schicht epikutikulärer Wachskristalle überzogen, auf denen die meisten Insekten keinen Halt finden oder sich nicht fortbewegen können. Ausschließlich die Ameisen der spezifischen Partnerart können sich frei auf diesen Oberflächen bewegen und so alle Pflanzenteile erreichen (Federle et al. 1997). Die Wachskristalle wirken in diesem System nicht als unspezifische Barriere, sondern als selektiver Filtermechanismus zu Gunsten der spezifischen Partnerameisen. Dabei stellen sowohl die chemischen und biomechanischen Eigenschaften der Wachskristalle, als auch die Fähigkeit

---



---

der symbiontischen Ameisen sich auf diesen fort zu bewegen, besondere Anpassungen an diese Interaktion dar (Federle et al 1997).

Eine definierte ökologische Funktion epikutikulärer Wachskristalle konnte auch für karnivore Pflanzen der Gattung *Nepenthes* gezeigt werden (Knoll 1914; Martin und Juniper 1970; Juniper et al. 1989). Hier spielen sie in der Nährstoffversorgung der Pflanzen eine zentrale Rolle als mechanische Barriere in speziell angepassten Organen zum Fang, zur Zurückhaltung und Verdauung von Beutetieren (Kap. 1.4).

### 1.3 Morphologie und chemische Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle

Schon früh wurde versucht, epikutikuläre Wachsüberzüge morphologisch zu charakterisieren (DeBary 1871). Während diese frühen lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Unterscheidung von nur vier mikromorphologischen Kategorien führten, kann mit modernen rasterelektronenmikroskopischen Methoden eine große Vielfalt ultrastruktureller Formen auf verschiedensten Pflanzenoberflächen gefunden werden (Übersichten in Baker 1982; Barthlott et al. 1998). Dabei kann generell zwischen einem dünnen Wachsfilm und den daraus hervortretenden dreidimensionalen Kristallen unterschieden werden. Der Wachsfilm ist auf Grund seiner geringen Dicke (wenige Nanometer bzw. wenige Moleküllagen) in der Regel rasterelektronenmikroskopisch nicht erkennbar, jedoch stets als Überzug auf allen Kutikulaoberflächen vorhanden (Barthlott et al. 1998). Die rasterelektronenmikroskopisch erkennbaren Strukturen können verschiedene Formen wie Schichten und Krusten sowie Körnchen, Stäbchen, Röhrchen, Fäden, Plättchen und Schuppen besitzen, die jeweils auf Grund ultrastruktureller Besonderheiten in weitere Gruppen unterteilt werden können (Barthlott et al. 1998). Die Maße der Kristalle variieren dabei je nach Typ von 0,1  $\mu\text{m}$  beim Durchmesser dünner Röhrchen bis zu 10  $\mu\text{m}$  im Falle von Plättchen. Untersuchungen an zahlreichen Pflanzenarten zeigten, dass Plättchen die häufigsten Kristalltypen darstellen und weit über die systematischen Einheiten verbreitet sind. (Barthlott et al. 1998).

Die beobachtete Vielfalt im morphologischen Erscheinungsbild epikutikulärer Strukturen warf die Frage auf, wie diese gebildet werden und aus welchen Komponenten sie bestehen. Die chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse war daher Gegenstand zahlreicher vergleichender Untersuchungen (Jeffree 1986; Walton 1990; Bianchi 1995). In der Regel werden kutikuläre Wachse durch Extraktion intakter Pflanzenorgane mit organischen Lösungsmitteln gewonnen (Baker 1982; Walton 1990). Die resultierenden Extrakte stellen meist komplexe Substanzgemische dar, die kapillar-gaschromatographisch aufgetrennt und

---

---

deren Einzelkomponenten massenspektrometrisch identifiziert werden können. Als Bestandteile epikutikulärer Wachse sind aliphatische Verbindungen wie Alkane, primäre Alkohole, Aldehyde, Fettsäuren und Alkyl-Ester weit verbreitet, während zyklische Verbindungen wie Triterpenoide seltener beschrieben werden (Baker 1982; Walton 1990; Bianchi 1995). Während der Analyse solcher Wachsmischungen können jedoch unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Verbindungen mit aktiven Wasserstoffatomen und der stationären Phase der Kapillarsäule auftreten. Dies kann zu einer Verschlechterung der Trennleistung und zu Substanzverlusten führen. Um derartige Artefakte zu vermeiden, werden z.B. hydroxylhaltige Komponenten wie primäre Alkohole und Fettsäuren vor der Analyse mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) in die entsprechenden Trimethylsilyl-Ether bzw. -Ester überführt. Diese Derivate sind in der Regel thermisch stabiler und leichter flüchtig als die ursprünglichen Verbindungen und lassen sich zuverlässig quantifizieren. Auf der anderen Seite konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine quantitative Analyse von Aldehyden nach einer Behandlung mit BSTFA problematisch sein kann (Naß et al. 1998). Innerhalb dieser Substanzklasse konnten erhebliche Substanzverluste beobachtet werden, deren Ursachen bisher nicht näher geklärt wurden.

Dennoch ergaben zahlreiche Untersuchungen, dass das Vorkommen bestimmter Hauptkomponenten mit charakteristischen Kristallformen auf verschiedensten Pflanzenoberflächen korrelierte und diese Komponenten folglich für die Bildung der Kristalle verantwortlich sind (Jeffree et al. 1976; Baker 1982; Jeffree 1986). Für die Rutschigkeit der Oberflächen von Ameisenpflanzen der Gattung *Macaranga* ist ein dichtes Netzwerk fadenförmiger Kristalle verantwortlich, das sich hauptsächlich aus pentazyklischen Triterpenoiden zusammensetzt (Markstädter et al. 2000). Während die Rekristallisation sekundärer Alkohole und der entsprechenden Diole zur Bildung röhrenförmiger Kristallstrukturen führte (Jetter und Riederer 1994; 1995), wurden in Extrakten von Pflanzenoberflächen mit plättchenförmigen Kristallen meist große Mengen primärer Alkohole gefunden (Hallam und Chambers 1970; Barthlott et al. 1998). Auf der anderen Seite traten bei der Extraktion von Reis- und Zuckerrohrblättern, deren Oberflächen ebenfalls durch plättchenförmige Wachsaggregate charakterisiert waren, große Mengen aliphatischer Aldehyde auf und es wurde angenommen, dass die Aldehyde dabei in polymerer Form vorliegen (Haas et al. 2001). Ebenfalls plättchenförmige Wachs-kristalle konnten in den Fangorganen einer karnivoren Kannenpflanze der Gattung *Nepenthes* gefunden werden (Juniper und Burras 1962). Für deren Zusammensetzung wurden jedoch annähernd gleiche Anteile aliphatischer Säuren, primärer Alkohole und Aldehyde beschrieben (Juniper et al. 1989).

---

---

#### 1.4 Kannenpflanzengewächse (Nepenthaceae)

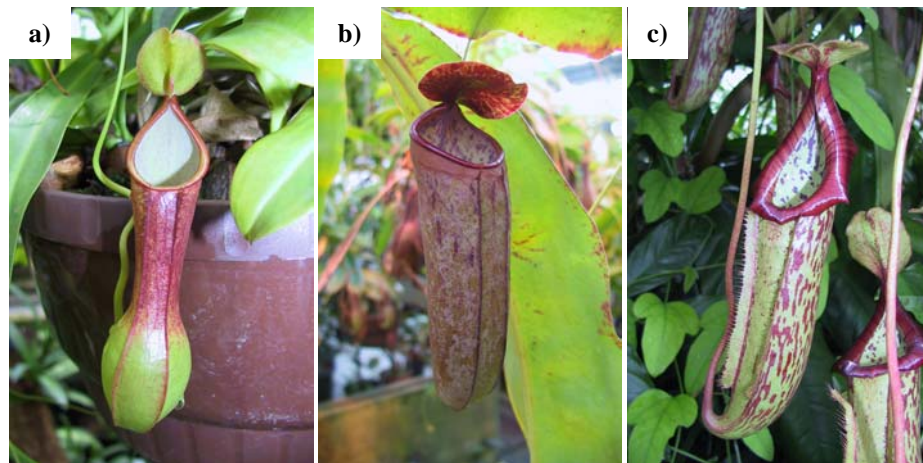
Die monophyletische Familie der Nepenthaceae umfasst 82 beschriebene Arten, die in einer einzelnen Gattung *Nepenthes* zusammengefasst sind (Jebb und Cheek 1997; Meimberg et al. 2001). Das Hauptverbreitungsgebiet mit der größten Artenvielfalt und zahlreichen endemischen Arten befindet sich in Südost-Asien. Verbreitungsschwerpunkt ist der malaiische Archipel mit den Inseln Borneo und Sumatra. Das Vorkommen einzelner Arten kann sich jedoch auch auf weite Bereiche um den indischen Ozean von Madagaskar über das Hochland von Assam und Südchina bis Neu Guinea, Neukaledonien und Nord Australien erstrecken (Kurata 1976; Meimberg et al. 2001). Die Standorte sind auf Bereiche tropischer Regenwälder und vor allem nebelreicher Bergwälder in bis zu 3500 m Höhe konzentriert. Die Böden dieser Standorte sind durch eine geringe Humusakkumulation und Auswaschung von Mineralstoffen gekennzeichnet.

Die Pflanzen wachsen als bodenständige Rosetten, aus denen 30 cm bis 20 m lange Sprosse hervor gehen können. Diese liegen entweder dem Boden auf oder reichen mit Hilfe zu Ranken verlängerter Blattstiele bis in die Kronen benachbarter Bäume (Kurata 1976). Im Laufe des Wachstums kann dabei der Kontakt zum Boden verloren gehen, wodurch sie eine epiphytische Lebensweise annehmen (Juniper et al. 1989). Die den Sprossen unmittelbar ansitzenden Blätter sind am Blattgrund blattspreitenartig verbreitert und gehen allmählich in den rankenartig verlängerten Blattstiel über. Dieser endet in dem für die Gattung *Nepenthes* charakteristischen Organ, einer kannenförmig umgewandelten Blattspreite (Juniper et al. 1989).

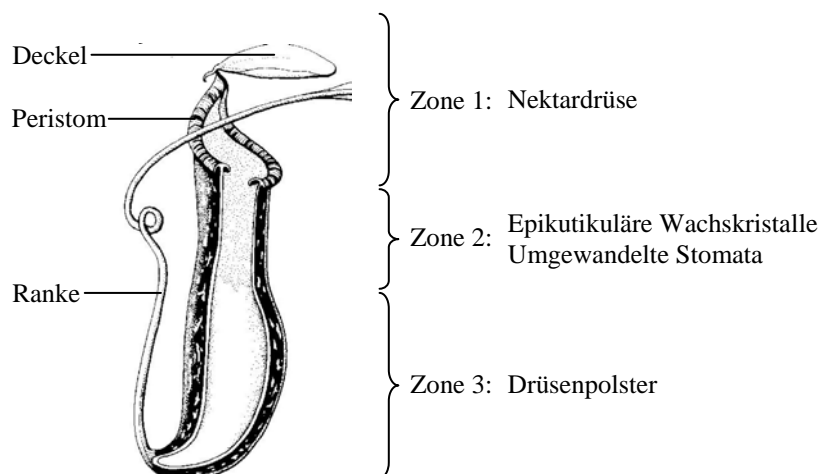
Auf nährstoffarmen Böden sichern Kannenpflanzen ihren Bedarf an Mineralstoffen, vor allem an Stickstoff, durch den Fang und die Verdauung tierischer Beute (Karnivorie). Bis auf eine bekannte Ausnahme ist das Beutespektrum dabei relativ unspezifisch (Merbach et al. 2002). Häufig besteht die Beute aus Insekten verschiedenster Taxa und anderen Arthropoden, jedoch können auch kleinere Wirbeltiere wie Reptilien und Kleinsäuger in den Kannen gefunden werden (Lösch 1990). Die Nutzung von Nährstoffen aus tierischen Quellen kann dabei als evolutionärer Vorteil angesehen und erwartet werden, dass die verwendeten Organe hochgradig an die karnivore Lebensweise angepasst sind. Fleischfressende Pflanzen zeigen im Allgemeinen eine große Vielfalt an spezialisierten morphologischen Merkmalen für den Fang, die Zurückhaltung und Verdauung von Beute (Darwin 1875; Lloyd 1942; Juniper et al. 1989). Auf Grund prinzipieller Mechanismen können die Fangorgane der verschiedenen Karnivoren als Kleb-, Schnapp-, Saug- oder Grubenfallen bezeichnet werden (Juniper et al. 1989).

---

Die Fangorgane der Kannenpflanzen gehören zu den Grubenfallen und zeigen innerhalb der Gattung *Nepenthes* einen einheitlichen Grundbauplan. Die äußere Form ausgereifter Kannen ist meist bauchig bis schlauchförmig (Abb. 1.1) und die Größe variiert von 5-35 cm bei Durchmessern von 1-20 cm (Kurata 1976). Die Fangapparate der meisten *Nepenthes*-Arten können generell in drei funktional unterschiedliche Zonen eingeteilt werden (Juniper et al. 1989). Die obere Zone (Zone 1, Abb. 1.2) ist durch das Vorkommen zahlreicher Nektardrüsen gekennzeichnet und dient vor allem der Anlockung von Beute. Die Öffnung der Kanne wird von einem Deckel überdacht, der verschiedene Fortsätze und auf seiner Unterseite zahlreiche Nektardrüsen tragen kann. Zur Öffnung hin, werden die Ränder der Kannenwände von einer waagrecht ansitzenden Ringwulst (Peristom) begrenzt. Die Ränder des Peristoms sind auf beiden Seiten überhangartig nach unten gebogen und können stark gezahnt sein. In den Ver-



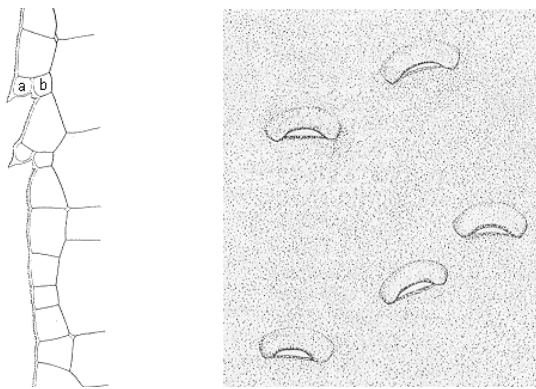
**Abb. 1.1** Fangapparate (Kannen) verschiedener *Nepenthes*-Arten.  
a) *N. alata*. b) *N. albomarginata*. c) *N. intermedia*



**Abb. 1.2** Schematischer Anschnitt und Zonierung einer *Nepenthes*-Kanne.  
Verändert aus Juniper et al. 1989.

tiefungen zwischen diesen Zähnen befinden sich auf der Innenseite mehrzellige Drüsen zur Sekretion von Nektar (Owen und Lennon 1999). Direkt unterhalb des Peristoms beginnt die so genannte Gleitzone (Zone 2, Abb. 1.2).

Die Oberflächeneigenschaften der Gleitzone sind dabei maßgeblich am Beutefangmechanismus beteiligt. Ein charakteristisches Merkmal dieser Oberfläche sind umgewandelte Spaltöffnungsapparate (Mcfarlane 1893; Knoll 1914), bei denen eine der beiden Schließzellen unter die Andere ins Gewebe eingerückt ist (Abb. 1.3). Die obenauf liegende Schließzelle erscheint halbmondförmig und ist mit ihrer konvexen Seite nach unten orientiert (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3** Schematischer Längsschnitt (links) und Aufsicht (rechts) der Epidermis einer *Nepenthes*-Gleitzone. a und b = Schließzellen eines umgewandelten Spaltöffnungsapparates. Verändert nach Knoll 1914.

Dieses besondere Mikrorelief verhindert, dass Insekten ihre Krallen zur Fortbewegung benutzen können, wodurch sie allein auf die meist vorhandenen Haftlappen angewiesen sind (Gaume et al. 2002). Ein zweites charakteristisches Merkmal der Gleitzoneoberfläche ist die Belegung mit epikutikulären Wachskristallen, die bereits makroskopisch als bläulich-weißer Überzug erkennbar ist. Es wurde schon sehr früh erkannt, dass die Oberfläche der Kanneninnenseite durch diese Kristalle extrem rutschig für Insekten ist

(Mcfarlane 1893; Knoll 1914; Juniper et al. 1989). Um die Nektardrüsen des Peristoms zu erreichen, müssen futtersuchende Insekten jedoch die Oberfläche der Gleitzone betreten. Dort verlieren sie den Halt und stürzen in den unteren Teil der Kanne (Zone 3, Abb. 1.2), der sich durch das Fehlen der Wachsberiefung deutlich vom oberen Teil abgrenzt. Im Gegensatz zur Gleitzone sind die Innenwände des unteren Kannenabschnittes durch einen dichten Besatz mit mehrzelligen Drüsenpolstern (ca. 6000/cm<sup>2</sup>) gekennzeichnet (Kurata 1976). Diese Drüsen sezernieren einerseits eine Verdauungsflüssigkeit aus organischen Säuren, anorganischen Ionen und Verdauungsenzymen wie Lipasen und Proteasen (An et al. 2002a, 2002b). Andererseits sind sie gleichzeitig zur Aufnahme mineralisierter Bestandteile der verdauten Beute in der Lage (Schulze et al. 1997; Owen and Lennon 1999; Owen et al. 1999). Die Kannen stellen somit hoch angepasste Organe dar, deren Merkmale evolutionär an die Anlockung, den Fang und die Verdauung tierischer Beute optimiert sind.

---

## 1.5 Ziele der Arbeit

Obwohl sich zahlreiche Untersuchungen mit der Rolle rutschiger Pflanzenoberflächen in verschiedenen Pflanzen-Insekten-Interaktionen beschäftigt haben, blieben die dem Phänomen zugrunde liegenden Mechanismen weitgehend unverstanden. Für ein solches Verständnis müssen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der beteiligten Materialien bekannt sein. Die Gattung *Nepenthes* stellt ein besonders geeignetes System zur Analyse der pflanzlichen Seite dieser Interaktion dar, da die ökologische Bedeutung der epikutikulären Wachskristalle der Gleitzonen durch zahlreiche Untersuchungen klar belegt ist. Bisher standen jedoch keine Methoden zur Verfügung, die epikutikulären Wachskristalle mit ausreichender Selektivität zu präparieren und die chemische Zusammensetzung des gewonnenen Materials sowohl qualitativ als auch quantitativ genau zu analysieren. Ziele dieser Arbeit waren daher:

- (1) Das verwendete Verfahren zur Probenvorbereitung für die gaschromatographische Analyse zunächst auf Reproduzierbarkeit und quantitative Genauigkeit hin zu überprüfen. Dazu sollten die Produkte evtl. auftretender Nebenreaktionen massenspektrometrisch identifiziert und gaschromatographisch quantifiziert werden (Kap. 2).
  - (2) Methoden zu entwickeln, die eine Beprobung und chemische Analyse der unterschiedlichen Kompartimente kutikulärer Wachse erlauben und die Selektivität dafür zu bewerten. Diese Methoden sollten dann in vergleichenden Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der kutikulären Wachse von Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten zur Anwendung kommen (Kap. 3).
  - (3) Mit Hilfe einer infrarotspektroskopischen Methode (ATR-FT-IR-Spektroskopie) die molekulare Anordnung und chemische Form der in den epikutikulären Kristallen vorhandenen Bestandteile zu analysieren. Dabei sollte insbesondere geprüft werden, ob die Hauptkomponenten in monomerer Form vorliegen und welchen Einfluss die Temperatur und Lösungsmittel darauf haben (Kap. 4).
-

---

## 2 Identifikation und Quantifizierung von Nebenprodukten während der Derivatisierung kutikulärer Wachse mit BSTFA

### 2.1 Einleitung

Die kutikulären Wachse stellen die wichtigsten funktionellen Komponenten der primären Oberflächen höherer Landpflanzen dar (Riederer und Markstädter 1996). Sie sind sowohl in die Kutinpolymermatrix der Kutikularmembran eingelagert als auch in Form epikutikulärer Filme oder Aggregate dieser aufgelagert. In dieser exponierten Position erfüllen die kutikulären Wachse zahlreiche ökologische Funktionen (z.B. Holloway 1984; Eigenbrode und Espelie 1995; Riederer und Schreiber 1995; Juniper 1995). Um die Rolle die sie dabei spielen verstehen zu können, ist jedoch die Kenntnis ihrer chemischen Zusammensetzung von besonderer Bedeutung. Die chemische Zusammensetzung der Wachse und ihre physikalischen Eigenschaften stehen in engem Zusammenhang mit deren Funktionen (Riederer und Markstädter 1996).

Für die Analyse der meist komplexen Substanzgemische wurden zahlreiche Methoden zur Reinigung, Trennung und Identifizierung beschrieben (Holloway 1984; Walton 1990; Bianchi 1995). Eine seit langem angewandte Technik ist die kapillar-gaschromatographische Auftrennung der Gemische mit gekoppelter massenspektrometrischer Identifikation der resultierenden Einzelsubstanzen (James und Martin 1952; Gohlke 1959; Martin und Juniper 1970). Häufige Bestandteile der kutikulären Wachse sind Substanzen mit Hydroxyl- oder Carboxyl-Gruppen, wie z.B. primäre Alkohole oder Fettsäuren (Walton 1990; Bianchi 1995). Die aktiven Wasserstoffatome dieser Verbindungen können jedoch zu starken intermolekularen Wechselwirkungen und sorptiven Wechselwirkungen mit der stationären Phase der häufig verwendeten Quarz-Kapillarsäulen führen. Um daraus resultierende Substanzverluste und somit Fehler bei der Quantifizierung einzelner Substanzen zu vermeiden, werden diese in stabile und leichtflüchtige Derivate ohne aktive Wasserstoffatome überführt (Knapp 1979). In Abhängigkeit der zu derivatisierenden funktionellen Gruppe, stehen dafür zahlreiche Protokolle und Reagenzien zur Verfügung. So lassen sich z.B. die Hydroxyl-Gruppen von primären Alkoholen mit Essigsäureanhydrid zu Acetaten und die Carboxyl-Gruppen von Fettsäuren mit Diazomethan zu den entsprechenden Methylestern umwandeln. Um jedoch die Anzahl der Arbeitsschritte in der Probenvorbereitung zu minimieren, sind Derivatisierungsreagenzien von Vorteil, die ein breites Spektrum funktioneller Gruppen umzusetzen vermögen. In der Analyse kutikulärer Wachse ist *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid

---

(BSTFA) daher ein häufig verwendetes Derivatisierungsreagenz. Mit diesem können sowohl die Hydroxyl-Gruppen von Alkoholen als auch die Carboxyl-Gruppen von Fettsäuren in die entsprechenden Trimethylsilyl-Ether bzw. -Ester überführt werden (Pierce 1968; Knapp 1979; Blau und Halket 1993). Naß et al. (1998) zeigten, dass sich diese beiden, in kutikulären Wachsen weit verbreiteten, Substanzklassen zuverlässig und ohne Substanzverluste nach einer Behandlung mit BSTFA quantitativ analysieren lassen. Als ebenso weit verbreitete, jedoch anteilig meist untergeordnete Bestandteile kutikulärer Wachse wurden sehr langkettige Aldehyde beschrieben (Walton 1990). Die quantitative Analyse dieser Substanzklasse ist nach einer Behandlung mit BSTFA hingegen problematisch. Es wurde beobachtet, dass nach einer Behandlung beachtliche Substanzverluste auftraten, die zudem in ihrem Ausmaß nicht reproduzierbar waren (Markstädter 1994; Naß et al. 1998). Dabei blieb unklar, worin die Ursachen der Substanzverluste liegen und wo die fehlenden Aldehydmengen verblieben waren. Ende und Luftmann (1984) zeigten, dass relativ niedermolekulare Aldehyde mit einem zu BSTFA ähnlichen Derivatisierungsreagenz (MSTFA, *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamid) zu unterschiedlichen Produkten reagieren können. Dabei entstanden zum einen *cis-trans*-isomere Alkenyl-trimethylsilylether und zum anderen Aldehyd-MSTFA-Addukte, sodass eine quantitative Bestimmung der freien Aldehyde nicht mehr möglich war (Ende und Luftmann 1984). Little (1999) führte zudem eine Vielzahl weiterer Nebenprodukte von Aldehyden mit unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien auf.

Aus Extraktionsexperimenten war bekannt, dass die kutikulären Wachse der Gleitzonen von *N. alata* hauptsächlich aus sehr langkettigen Aldehyden bestehen, wobei Triacontanal (C<sub>30</sub>) die bedeutendste Einzelkomponente darstellt (Schmidt 2000). Weiterhin zeigte eine vergleichende quantitative Analyse auch hier, dass eine Behandlung der Aldehydfraktion mit BSTFA zu Substanzverlusten führte.

Auf Grund der beschriebenen Befunde aus verschiedenen Reaktionssystemen liegt daher die Vermutung nahe, dass auch die Aldehyde in den kutikulären Wachsen von *Nepenthes*-Gleitzonen unter den gegebenen Derivatisierungsbedingungen mit BSTFA reagieren und somit der quantitativen Analyse entzogen werden. Da jedoch die Kenntnis der chemischen Zusammensetzung die Grundvoraussetzung für das Verständnis der ökologischen Funktionen der kutikulären Wachse ist, stellen sich in einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit folgende zentrale Fragen:

- I. Welche Produkte entstehen bei der Behandlung von freien Aldehyden mit BSTFA?
  - II. Können die ursprünglich vorhandenen Mengen an freien Aldehyden mit Hilfe der Produktmengen rekonstruiert werden?
-



---

Kutikuläre Wachse, wie die der Gleitzonen von *Nepenthes*, stellen meist eine komplexe Mischung aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen dar. Es bestand daher die Möglichkeit, dass während der Behandlung mehrere Reaktionen mit verschiedenen Reaktionspartnern gleichzeitig ablaufen. Um jedoch eine spezifische Zuordnung der Reaktionsprodukte zu gewährleisten und sich den oben gestellten Fragen schrittweise anzunähern, wurden zunächst Modellsysteme aus einzelnen synthetischen Komponenten gewählt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten dann verwendet werden, um die Reaktionsprodukte in kutikulären Wachsmischungen zu identifizieren. Triacontanal ist die Hauptkomponente der kutikulären Wachse der Gleitzone von *N. alata* und bot sich daher für einige der folgenden Teilfragen als Modellsubstanz an.

- (1) Reagiert Triacontanal mit BSTFA und welche Produkte entstehen dabei?
  - (2) Reagiert Triacontanal mit strukturanalogen Derivatisierungsreagenzien zu strukturanalogen Produkten?
  - (3) Reagieren verschiedene Aldehyd-Homologe in Proben kutikulärer Wachse von *N. alata* mit BSTFA und entstehen dabei homologe Produkte?
  - (4) Stimmen die Produktmengen nach der Reaktion von Triacontanal mit BSTFA mit den auftretenden Substanzverlusten an Triacontanal überein?
  - (5) Sind mit BSTFA behandelte Triacontanal-Lösungen über die Zeit stabil?
  - (6) Können in Lösungen kutikulärer Wachse von *N. alata* während der Behandlung mit BSTFA auch weitere Reaktionen auftreten? Welche Reaktionspartner sind daran beteiligt und in welchen Mengen?
-

## 2.2 Material und Methoden

### 2.2.1 Pflanzenmaterial

Individuen von *Nepenthes alata* Blanco stammten aus einer kontinuierlichen Gewächshauskultur des Botanischen Gartens der Universität Würzburg. Die Kannen von fünf Individuen wurden direkt vor der Beprobung geerntet. Durch Zerschneiden des Übergangs der Ranke zur Kanne wurde das Organ von der Pflanze getrennt und dabei gleichzeitig die Flüssigkeit aus seinem Inneren abgelassen. Die Kannen wurden der Länge nach aufgeschnitten und mit der Kanneninnenseite nach oben mit Präpariernadeln flächig auf der Unterlage befestigt. Mit Hohlbohrern (1,46 cm oder 1,56 cm Innendurchmesser) wurden runde Blattscheiben aus der Kannenwand ausgestanzt und ohne weitere Behandlung weiterverwendet.

### 2.2.2 Synthese von Triacontanal

Da sehr langkettige Aldehyde kommerziell nicht erhältlich sind, wurde Triacontanal durch Oxidation aus dem entsprechenden primären Alkohol synthetisiert. Dafür wurden 25 mg 1-Triacontanol (99%; Sigma, Steinheim, Deutschland) in 40 ml Dichlormethan (99,5%; Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Parallel dazu wurden 25 mg Pyridiniumchlorochromat (PCC, 98%; Fluka, Steinheim, Deutschland) in 30 ml Dichlormethan gelöst, durch Zugabe von Natriumsulfat (99%, wasserfrei; Merck, Darmstadt, Deutschland) getrocknet und über einen Faltenfilter der Alkohol-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum (550 mbar, 40°C) abgezogen. Der Rückstand wurde in ca. 3 ml Dichlormethan aufgenommen und auf eine mit Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt, Deutschland) zu  $\frac{2}{3}$  befüllte Glassäule (6,5 cm x 1,2 cm) gegeben. Das Eluat mit 80 ml 2-Chlorpropan (99,5%; Fluka, Steinheim, Deutschland) wurde im Vakuum (500 mbar, 40°C) bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand in 20 ml Chloroform (99,9%; Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen.

---

### 2.2.3 Charakterisierung von Reaktionsprodukten während der Probenvorbereitung

#### 2.2.3.1 Reaktionen von Triacontanal mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien

Für die Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten des Aldehyds mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien wurden drei Lösungen aus je 9 µg des synthetischen Triacontanal und 5 µg *n*-Tetracosan (interner Standard; ≥ 99,5%; Fluka, Steinheim, Deutschland) hergestellt. Anschließend wurde das Chloroform unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom und Heizen der Proben auf 50°C verdampft. Je ein Ansatz wurde mit 10 µl *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA; Fluka, Steinheim, Deutschland) bzw. *N*-Methyl-*N*-*tert.*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamid (MTBSTFA; Fluka, Steinheim, Deutschland) für 30 min. bei 70°C in 10 µl Pyridin (99,5%; Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt und anschließend in je 100 µl Chloroform aufgenommen. Die quantitative Analyse erfolgte druck- und temperaturprogrammiert nach der GC-FID-Methode 1 (Tab. 2.1) und die qualitative Analyse nach der GC-MS-Methode 1 (Tab. 2.1).

Für die Bestimmung der Wiederfindung von Triacontanal nach einer Behandlung mit BSTFA wurden 10 Lösungen aus je ca. 9 µg synthetischem Aldehyd und 5 µg *n*-Tetracosan (interner Standard) hergestellt. Je fünf der Ansätze wurden

- (i) ohne weitere Behandlung gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht, anschließend mit BSTFA behandelt (s.o.) und nach 20 min. bzw. nach 11 Tagen erneut analysiert. Die Lagerungstemperatur zwischen den Analysen betrug 4°C.
- (ii) ohne weitere Behandlung am selben Tag und nach 10 Tagen analysiert. Die Lagerungstemperatur zwischen den Analysen betrug 4°C.

Die quantitative Analyse aller Versuchsansätze erfolgte druck- und temperaturprogrammiert nach der GC-FID-Methode 1 (Tab. 2.1) und die qualitative Analyse nach der GC-MS-Methode 1 (Tab. 2.1).

#### 2.2.3.2 Reaktionen von Aldehyden mit primären Alkoholen

Zur Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten von Aldehyden mit primären Alkoholen, wurden in Kombination von jeweils einem Aldehyd mit einem Alkohol Lösungen aus je ca. 10 µg *n*-Tetradecanal oder *n*-Docosanal (jeweils p.a.; Fluka) mit je ca. 10 µg 1-Eicosanol,

---

---

1-Heneicosanol, 1-Docosanol oder 1-Tricosanol (jeweils p.a.; Fluka) hergestellt. Diese wurden unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom und Heizen auf 50°C bis zur Trockenheit eingedampft und mit je 20 µl BSTFA in 20 µl Pyridin für 30 min. bei 70°C behandelt. Anschließend wurden die Derivatisierungsreagenzien unter einem N<sub>2</sub>-Strom ausgeblasen, die Rückstände in je 160 µl Chloroform aufgenommen und die Lösungen quantitativ mit der GC-FID-Methode 2 (Tab. 2.1) und qualitativ mit der GC-MS-Methode 2 (Tab. 2.1) analysiert.

#### 2.2.4 Extraktion und Analyse kutikulärer Wachse

Für die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte von Aldehyden in Pflanzenwachsen wurden Proben verwendet, die für die chemischen Analysen der kutikulären Wachse der Gleitzonen von *N. alata* hergestellt wurden. Nach einer mechanischen Entfernung kutikulärer Wachse (Kap. 3.2.3) wurden die verbliebenen Wachse mit warmem Chloroform (ca. 40°C) extrahiert. Dazu wurden Glaszylinder (1,0 cm bzw. 1,4 cm Innendurchmesser) mit leichtem Druck auf die Oberflächen von 4-5 Blattscheiben einer Kanne gepresst und die Zylinder zweimal mit je 1 ml Chloroform für 30 s befüllt. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt und *n*-Tetracosan als interner Standard zugegeben. Unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom und Heizen der Proben auf 50°C wurde das Chloroform verdampft, der Rückstand mit 10 µl *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoacetamid (BSTFA) für 30 min. bei 70°C in 10 µl Pyridin behandelt und anschließend in 100 µl Chloroform aufgenommen. Die quantitative und qualitative Analyse von Wachssubstanzen mit Kettenlängen von C<sub>20</sub>-C<sub>36</sub> erfolgte druck- und temperaturprogrammiert nach der GC-FID-Methode 2 und GC-MS-Methode 1 (Kap. 2.2.5; Tab. 2.1) und die Analyse von Substanzen mit Kettenlängen >C<sub>36</sub> nach der GC-FID-Methode 2 und GC-MS-Methode 2 (Kap. 2.2.5; Tab. 2.1).

#### 2.2.5 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die qualitative Zusammensetzung der Proben wurde mit einem druck- und temperaturprogrammierten (Tab. 2.1) Gaschromatographen (8000Top; Fisons Instruments, Rodano-Milan, Italien) mit Kapillarsäule (30 m DB-1, 0,32 mm i.d., d<sub>f</sub> = 1 µm, J & W Scientific, Folsom, CA, USA) und gekoppeltem massenspektrometrischem Detektor (70eV, m/z 50-850; MD1000; Fisons Instruments, Rodano-Milan, Italien) untersucht. Als Trägergas diente Helium (5.0; Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland).

---

Die quantitative Zusammensetzung der Proben wurde mit einem druck- und temperaturprogrammierten (Tab. 2.1) Gaschromatographen (5890 II, Hewlett Packard, Avondale, PA, USA) mit Kapillarsäule (s.o.) und Flammenionisationsdetektor untersucht. Als Trägergas wurde Stickstoff (5.0; Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland) benutzt und die Flamme mit Wasserstoff (Hydrogen Generator; Whatman, Haverhill, MA, USA) und synthetischer Luft (Zero Air Generator; Whatman, Haverhill, MA, USA) betrieben. Das Injektionsvolumen betrug in allen Fällen 1 µl.

**Tab. 2.1** Werte der Temperatur- und Druckprogrammierung der für die quantitative und qualitative Analyse verwendeten Gaschromatographen.

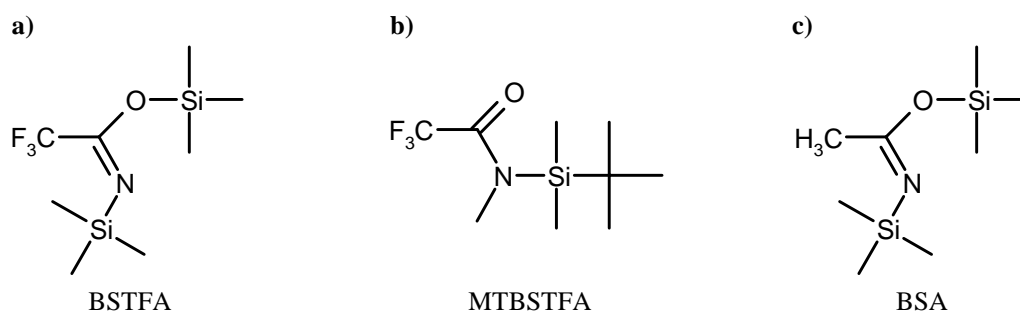
Analyse-Methode	Temperaturprogrammierung			Druckprogrammierung		
	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Rate [°C/min]	Druck [kPa]	Zeit [min]	Rate [kPa/min]
GC-FID						
1	50	2	40	50	5	3
	200	2	3	150	14	
	320	11				
2	50	2	40	50	5	3
	200	2	3	150	40	
	320	30				
GC-MS						
1	50	2	40	30	konstant	
	200	2	3			
	320	30				
2	100	2	30	100	konstant	
	320	65				

### 2.2.6 Interne Standardisierung

Die Quantifizierung einzelner Komponenten erfolgte durch interne Standardisierung mit *n*-Tetracosan. Dazu wurden ca. 10 mg des Alkans abgewogen und in einer entsprechenden Menge (ca. 10 ml) Chloroform aufgenommen, so dass die Endkonzentration der Lösung 1 mg/ml betrug. Die Peakflächen einzelner Komponenten wurden manuell integriert und deren Massen aus dem Verhältnis zum Standard-Peak nach der Formel  $m_x = (A_x \cdot m_{\text{ISTD}}) / A_{\text{ISTD}}$  berechnet. Dabei war  $m_x$  die zu bestimmende Masse einer Substanz und  $m_{\text{ISTD}}$  die eingesetzte Masse des internen Standards.  $A_x$  war die Peakfläche der zu bestimmenden Substanz und  $A_{\text{ISTD}}$  die Peakfläche des internen Standards.

## 2.3 Ergebnisse

Werden Extrakte kutikulärer Wachse durch Behandlung mit BSTFA (Abb. 2.1a) für die gaschromatographische Analyse vorbereitet, können bei der Quantifizierung freier Aldehyde beträchtliche Substanzverluste festgestellt werden. Es wurde vermutet, dass freie Aldehyde teilweise mit BSTFA zu unterschiedlichen Produkten reagieren können.



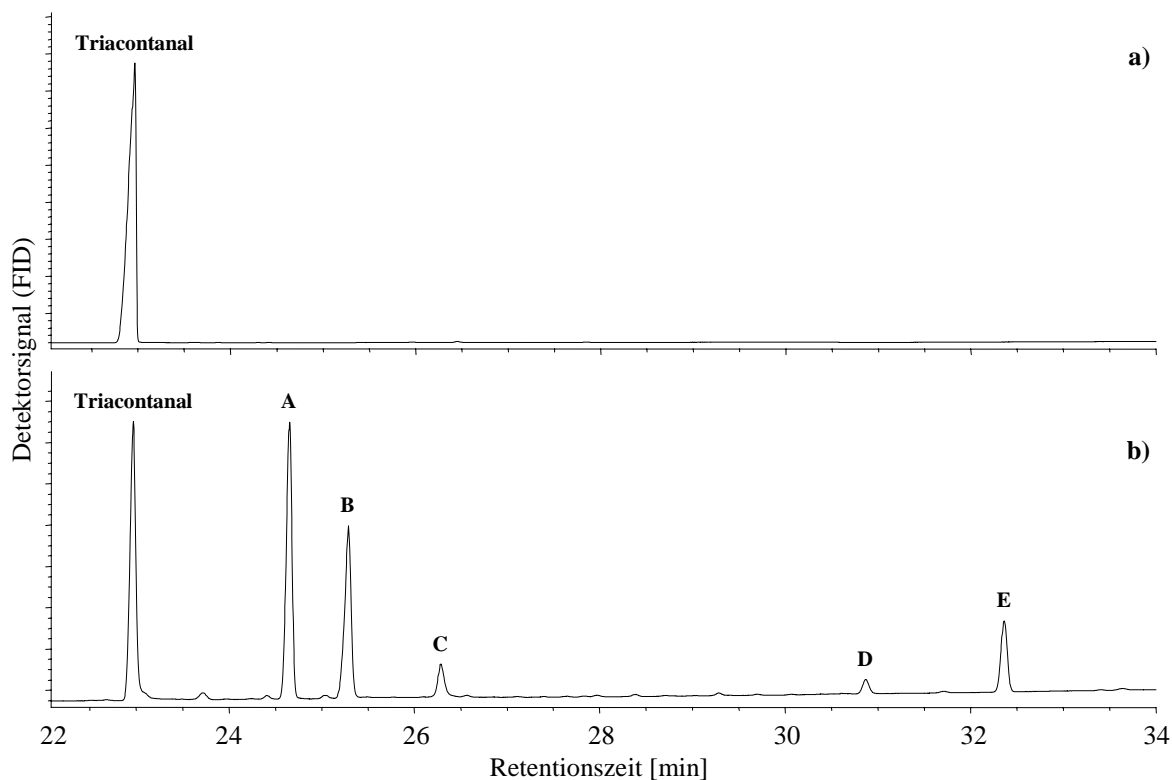
**Abb. 2.1** Strukturformeln verschiedener Derivatisierungsreagenzien.

a) *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) b) *N*-Methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA). c) *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA).

### 2.3.1 Qualitative Zusammensetzung von Triacontanal-Lösungen nach einer Behandlung mit BSTFA

Um zu überprüfen, ob Aldehyde mit BSTFA reagieren können, wurde in einem ersten Experiment synthetisches Triacontanal mit BSTFA behandelt. Triacontanal ist die Hauptkomponente der kutikulären Wachse von *N. alata* und wurde daher als Modellsubstanz gewählt. Zunächst wurde synthetisches Triacontanal in Chloroform gelöst und ohne Vorbehandlung gaschromatographisch analysiert. Es konnten nahezu keine Verunreinigungen ( $\leq 4\%$ ) und keine der vermutlichen Reaktionsprodukte gefunden werden (Abb. 2.2a). Anschließend wurde die Lösung mit BSTFA behandelt und erneut gaschromatographisch und massenspektrometrisch analysiert.

Nach der Behandlung einer Triacontanal-Lösung konnten zusätzlich zum eingesetzten Aldehyd fünf weitere Substanzpeaks detektiert werden (Substanzen A-E, Abb. 2.2b). Die Massenspektren der einzelnen Verbindungen zeigten dabei einerseits Fragmentierungsmuster die allen Verbindungen gemeinsam waren, unterschieden sich jedoch andererseits im Auftreten charakteristischer Ionen.



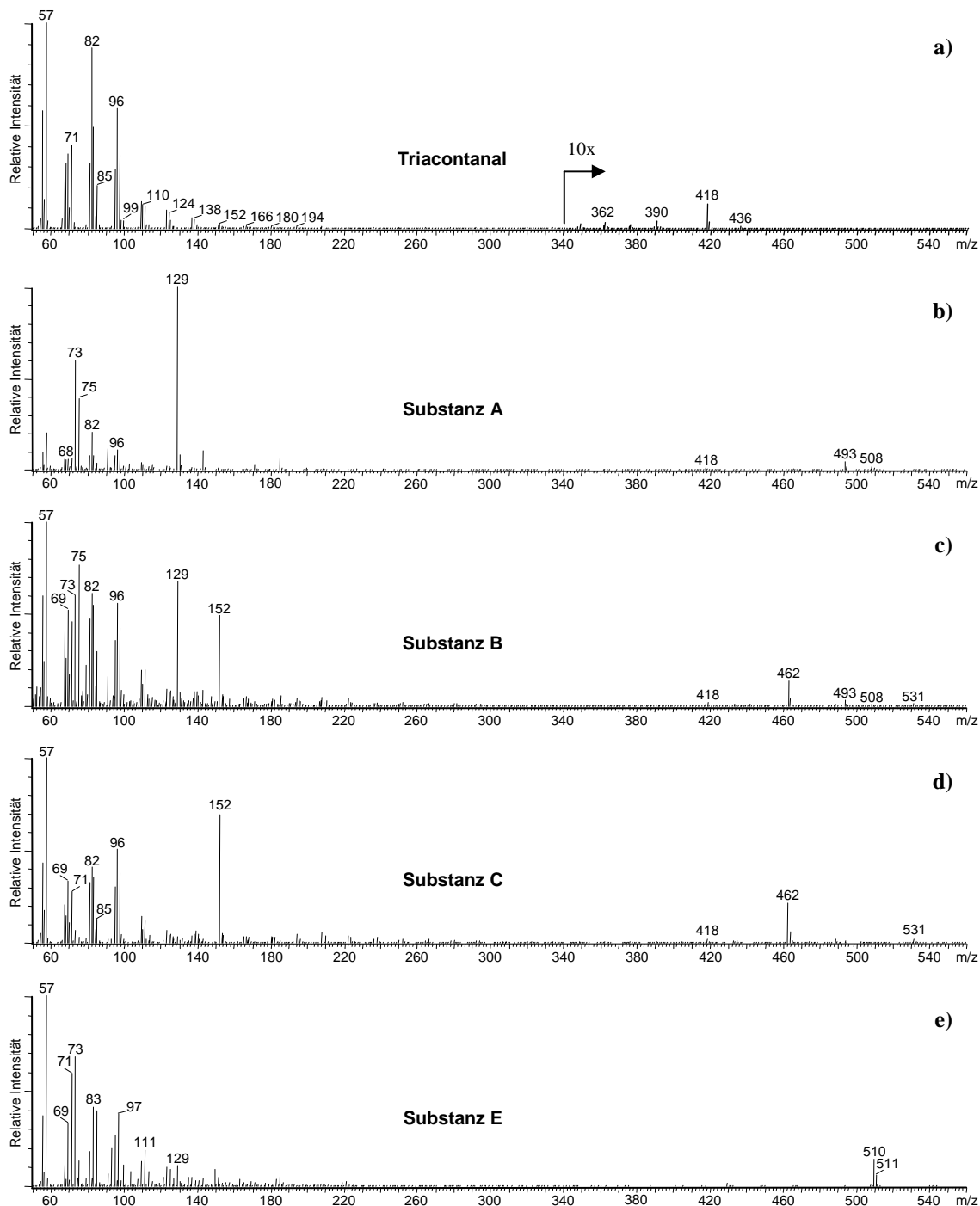
**Abb. 2.2** Gaschromatogramme (FID) einer Triacontanal-Lösung a) vor und b) nach einer Behandlung mit BSTFA. Nach der Behandlung lassen sich fünf zusätzliche Substanzpeaks (A-E) detektieren. Skalierung in b) um einen Faktor 3 erhöht.

### *n*-Triacontanal

Der niedrige Massenbereich des Spektrums von *n*-Triacontanal war von zwei intensiven Fragmentreihen dominiert, deren Intensitäten zu höheren Massen hin stark abnahmen (Abb. 2.3a). Die Ionen der Reihe  $m/z$  57, 71, 85, ... entsprachen dabei einer elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n+1}]^+$  oder  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  mit  $n \geq 4$  bzw.  $n \geq 3$ . Die zweite Reihe  $m/z$  54, 68, 82, ... entsprach einer Zusammensetzung  $[C_nH_{2n-2}]^+$  mit  $n \geq 4$  und zeigte maximale Intensitäten bei  $m/z$  82 und  $m/z$  96. Im hohen Massenbereich war ein Ion  $m/z$  436 mit sehr geringer Intensität erkennbar, das entsprechend der elementaren Zusammensetzung  $C_{30}H_{60}O$  dem Molekülion ( $M^+$ ) von Triacontanal entsprach. Das Molekülion war von einem Fragment  $m/z$  418 ( $M^+-18$ ) höherer Intensität und einem Fragment  $m/z$  390 ( $M^+-46$ ) geringer Intensität begleitet. Der mittlere Massenbereich hingegen wies keine diagnostischen Ionen auf.

## Substanz A

Das Massenspektrum der nach einer Behandlung des Triacontanal mit BSTFA neu entstandenen Substanz A (Abb. 2.2b) zeigte im niedrigen bis mittleren Massenbereich einen Basispeak bei  $m/z$  129 und intensive Fragmente  $m/z$  73 und  $m/z$  75 (Abb. 2.3b). Weiterhin waren Ionen der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n-2}]^+$  zu erkennen, wie sie auch im Spektrum von Triacontanal beobachtet wurden (vgl. Abb. 2.3a). Die Intensität dieser Reihe



**Abb. 2.3** Massenspektren ( $m/z$  50-650) von Triacontanal (a) und vier weiteren Substanzen, die während einer Behandlung von Triacontanal mit BSTFA entstehen (b-e). Für die Zuordnung der Spektren s. Abb. 2.2. Skalierung in a) ab  $m/z$  340 10-fach erhöht.



besaß ebenfalls bei  $m/z$  82 ein Maximum, war jedoch im Vergleich zum Spektrum von Triacontanal insgesamt schwächer ausgeprägt. Im hohen Massenbereich des Spektrums der Substanz A war ein Ion  $m/z$  508 erkennbar, das um 72 amu höher als das Molekülion von Triacontanal lag. Das Ion  $m/z$  508 war zum einen von einem Ion  $m/z$  493 (-15 amu) und zum anderen von einem Ion  $m/z$  418 (-90 amu) begleitet (Abb. 2.3b), das ebenfalls im Spektrum von Triacontanal auftrat.

#### Substanz B

Das Spektrum des Substanzpeaks B (Abb. 2.3c) zeigte eine Überlagerung der Fragmentierungsmuster der Substanzen A (vgl. Abb. 2.3b) und C (vgl. Abb. 2.3d). Die auftretenden Ionen werden daher in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

#### Substanz C

Das Fragmentierungsmuster (Abb. 2.3d) der Substanz C (Abb. 2.2b) war in zahlreichen Merkmalen dem des Triacontanal ähnlich (vgl. Abb. 2.3a). Im niedrigen Massenbereich dominierten Fragmente der Reihen  $[C_nH_{2n+1}]^+$  oder  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  sowie der Reihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$ . Zusätzlich war jedoch ein Fragment  $m/z$  69 mit mittlerer Intensität vorhanden. Ähnlich wie im Spektrum der Substanz A zeigte sich im mittleren Massenbereich ein intensives Fragment, das jedoch eine um 23 amu höhere Masse  $m/z$  152 aufwies. Der hohe Massenbereich wies ein schwaches Fragment  $m/z$  418 auf, das auch in den Spektren des Triacontanal und der Substanz A auftrat. Das Ion mit der höchsten Masse im Spektrum der Substanz C war  $m/z$  531 und differierte somit gegenüber dem entsprechenden Ion im Spektrum der Substanz A um 23 amu. Zudem war es von einem Ion  $m/z$  462 (-69 amu) mittlerer Intensität begleitet.

#### Substanzen D und E

Nach der Behandlung von synthetischem Triacontanal mit BSTFA traten zudem zwei weitere Substanzen auf (Peak D und E; Abb. 2.2b), deren Massenspektren identische Fragmentierungsmuster aufwiesen (Abb. 2.3e). In den niedrigen Massenbereichen waren Ionenreihen der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n+1}]^+$  bzw.  $[C_nH_{2n-1}O]^+$ ,  $[C_nH_{2n-1}]^+$  und  $[C_nH_{2n-2}]^+$  zu erkennen. Der hohe Massenbereich war von einem Ion  $m/z$  510 dominiert.

Dieses Experiment zeigt, dass während der Behandlung von Triacontanal mit BSTFA neue Verbindungen entstehen. Auffällig dabei ist, dass jeweils zwei Substanzen resultieren, die

identische Massenspektren aufweisen. In Substanzpeak B überlagern dabei offensichtlich die Fragmente je einer Substanz von zwei verschiedenen Paaren. Zudem zeigen die Spektren der Reaktionsprodukte A-C auf der einen Seite Fragmente, die charakteristisch für die Ausgangssubstanz Triacontanal sind, und auf der anderen Seite untereinander Fragmente mit identischen Massendifferenzen. Daher kann geschlossen werden, dass einerseits Triacontanal und andererseits je eine verschiedenartige Untereinheit an der Bildung der neuen Verbindung beteiligt ist.

### 2.3.2 Überprüfung der Reaktionsprodukte

Um zu überprüfen, ob es sich bei den Substanzen A-C um Reaktionsprodukte des Aldehyds mit verschiedenen Untereinheiten des Derivatisierungsreagenzes handelte, wurde synthetisches Triacontanal in zwei weiteren Experimenten mit je einem zu BSTFA strukturanalogen Reagenz behandelt. Im ersten dieser Experimente wurde *N*-Methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyltrifluoracetamid (MTBSTFA; Abb. 2.1b) verwendet. MTBSTFA überträgt eine *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe (*t*-BDMS-Gruppe) auf hydroxyl-haltige Verbindungen. Die Masse der *t*-BDMS-Gruppe unterscheidet sich von der Trimethylsilyl-Gruppe (TMS-Gruppe) um 42 amu. Im zweiten dieser Experimente wurde *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA; Abb. 2.1c) verwendet. BSA ist wie BSTFA der Donor einer TMS-Gruppe. Im Unterschied zu BSTFA, ist jedoch das  $\alpha$ -C-Atom der Essigsäureuntereinheit von BSA statt mit Fluor-Atomen mit Wasserstoff-Atomen substituiert, woraus eine Massendifferenz von 54 amu resultiert.

#### 2.3.2.1 Behandlung von Triacontanal-Lösungen mit MTBSTFA

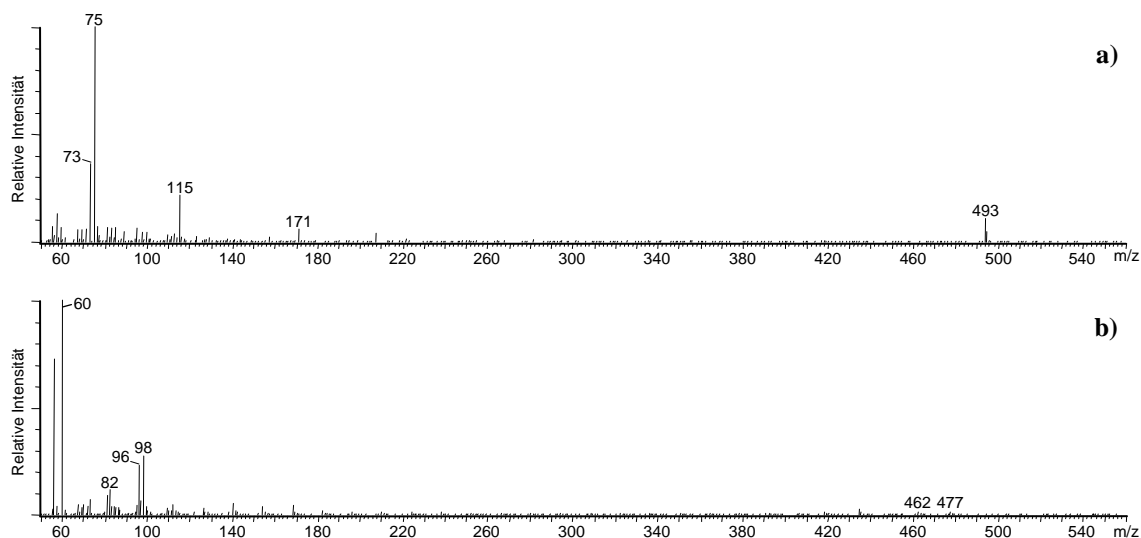
In der Triacontanal-Lösung wurden nach der Behandlung mit MTBSTFA zwei Substanzen gefunden, deren Massenspektren identische Fragmentierungsmuster aufwiesen (Abb. 2.4a). Die niedrigen Massenbereiche waren von intensiven Fragmenten  $m/z$  73 und  $m/z$  75 dominiert. Zusätzlich trat ein Fragment  $m/z$  115 mittlerer Intensität und ein Fragment  $m/z$  171 mit geringer Intensität auf. Diese beiden Fragmente zeigten eine Massendifferenz von 42 amu gegenüber den Fragmenten  $m/z$  73 bzw.  $m/z$  129 im Spektrum der Substanz A. In den hohen Massenbereichen war ein Fragment  $m/z$  493 mittlerer Intensität erkennbar, das ebenfalls im Spektrum der Substanz A gefunden wurde.

## 2.3.2.2 Behandlung von Triacontanal-Lösungen mit BSA

Nach einer Behandlung mit BSA konnten in der Triacontanal-Lösung vier Substanzpeaks gefunden werden, von denen jeweils zwei Substanzen paarweise identische Massenspektren aufwiesen.

Die Spektren eines der beiden Paare waren dabei identisch mit dem der Substanz A aus dem Experiment mit BSTFA (vgl. Kap. 2.3.1). In den niedrigen Massenbereichen zeigte sich ein Basispeak bei  $m/z$  129 und intensive Fragmente  $m/z$  73 sowie  $m/z$  75 (vgl. Abb. 2.3b). Weiterhin waren Ionenreihen der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n-2}]^+$  mit Intensitätsmaxima bei  $m/z$  82 zu erkennen. In den hohen Massenbereichen war ein Ion  $m/z$  508 erkennbar. Dieses war weiterhin von Ionen  $m/z$  493 (-15 amu) und  $m/z$  418 (-90 amu) begleitet.

Das zweite Spektrenpaar (Abb. 2.4b) zeigte in den niedrigen Massenbereichen einen Basispeak  $m/z$  60 sowie Fragmente  $m/z$  82 und  $m/z$  96 der Reihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$ . Daneben fand sich ein Fragment  $m/z$  98 mittlerer Intensität, das gegenüber dem Fragment  $m/z$  152 der Substanz C eine Massendifferenz von 54 amu aufwies. Die gleiche Differenz zeigte das höchste Ion  $m/z$  477, verglichen mit  $m/z$  531 im Spektrum der Substanz C, während das begleitende Ion  $m/z$  462 (-15 amu) in allen drei Spektren zu erkennen war.



**Abb. 2.4** Massenspektren je einer von zwei Substanzen mit identischen Spektren nach der Behandlung von Triacontanal mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien. a) mit *N*-Methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamid (MTBSTFA). b) mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA).

Die Ergebnisse dieser beiden Experimente zeigen, dass während der Behandlung von Triacontanal mit unterschiedlichen, strukturanalogen Derivatisierungsreagenzien jeweils

Paare neuer Verbindungen entstehen. Dabei traten einerseits gleiche Fragmente sowohl in den Spektren des Triacontanal als auch in denen der neuen Verbindungen auf, während andererseits wechselnde Massendifferenzen in Abhängigkeit vom verwendeten Reagenz beobachtet wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei den neu entstandenen Verbindungen um strukturanaloge Produkte unter Beteiligung sowohl des Triacontanal als auch von Untereinheiten der Derivatisierungsreagenzien handelt. Im Rückschluss kann daher angenommen werden, dass es sich bei den Substanzen A und C um Derivate des Triacontanal mit BSTFA handelt, wobei das jeweils zweite Derivat der entsprechenden Paare in Substanz B coeluieren.

Diese Befunde bedeuten jedoch auch, dass die messbare Menge an freiem Triacontanal nach einer Behandlung mit BSTFA verringert ist. Da es ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse verschiedener *Nepenthes*-Arten zu quantifizieren, mussten die entsprechenden Extrakte auf derartige Derivate hin überprüft werden. Dies wurde beispielhaft an Wachsextrakten der Gleitzzone von *N. alata* durchgeführt.

### 2.3.3 Behandlung kutikulärer Wachse von *N. alata* mit BSTFA

In Proben von *Nepenthes*-Wachsen konnten nach der Behandlung mit BSTFA drei homologe Reihen von Substanzen gefunden werden, deren Massenspektren im niedrigen Massenbereich identisch mit denen der Derivate A, B und C des synthetischen Triacontanal waren.

Die Spektren der ersten Substanzreihe zeigten einen Basispeak  $m/z$  129 sowie die Fragmente  $m/z$  73 und  $m/z$  75 (Abb. 2.5a). Zusätzlich waren Fragmente  $m/z$  82 und  $m/z$  96 der Ionenreihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$  vorhanden. Im hohen Massenbereich hingegen waren zwei Ionen erkennbar, deren Massen mit zunehmender Retentionszeit der entsprechenden Substanz um je 28 amu zunahmen (Abb. 2.5b-f). Das Spektrum einer dieser Substanzen (Abb. 2.5e) zeigte mit  $m/z$  493 und  $m/z$  508 die gleichen Massen, wie sie zuvor im Spektrum des vergleichbaren Triacontanal-Derivates (Substanz A, Abb. 2.3b) gefunden wurden.

Die Spektren der zweiten Substanzreihe zeigten jeweils Überlagerungen der Fragmentierungsmuster der ersten und dritten Substanzreihe. Die auftretenden Ionen werden daher in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

Die Massenspektren der dritten Substanzreihe waren im niedrigen Massenbereich identisch und durch intensive Fragmente  $m/z$  152 und  $m/z$  69 sowie Fragmente  $m/z$  82 und  $m/z$  96 der Reihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$  charakterisiert (Abb. 2.5g). Auf Grund identischer Ionen im hohen Massenbereich ( $m/z$  462 und  $m/z$  531), konnte auch hier eine der Substanzen (Abb. 2.5k) dem

---

vergleichbaren Triacontanal-Derivat (Substanz C, Abb. 2.3d) zugeordnet werden. Die Massen der beiden Ionen im hohen Massenbereich waren abhängig von der Retentionszeit der entsprechenden Substanz und wiesen Differenzen von je 28 amu auf (Abb. 2.5h-l).

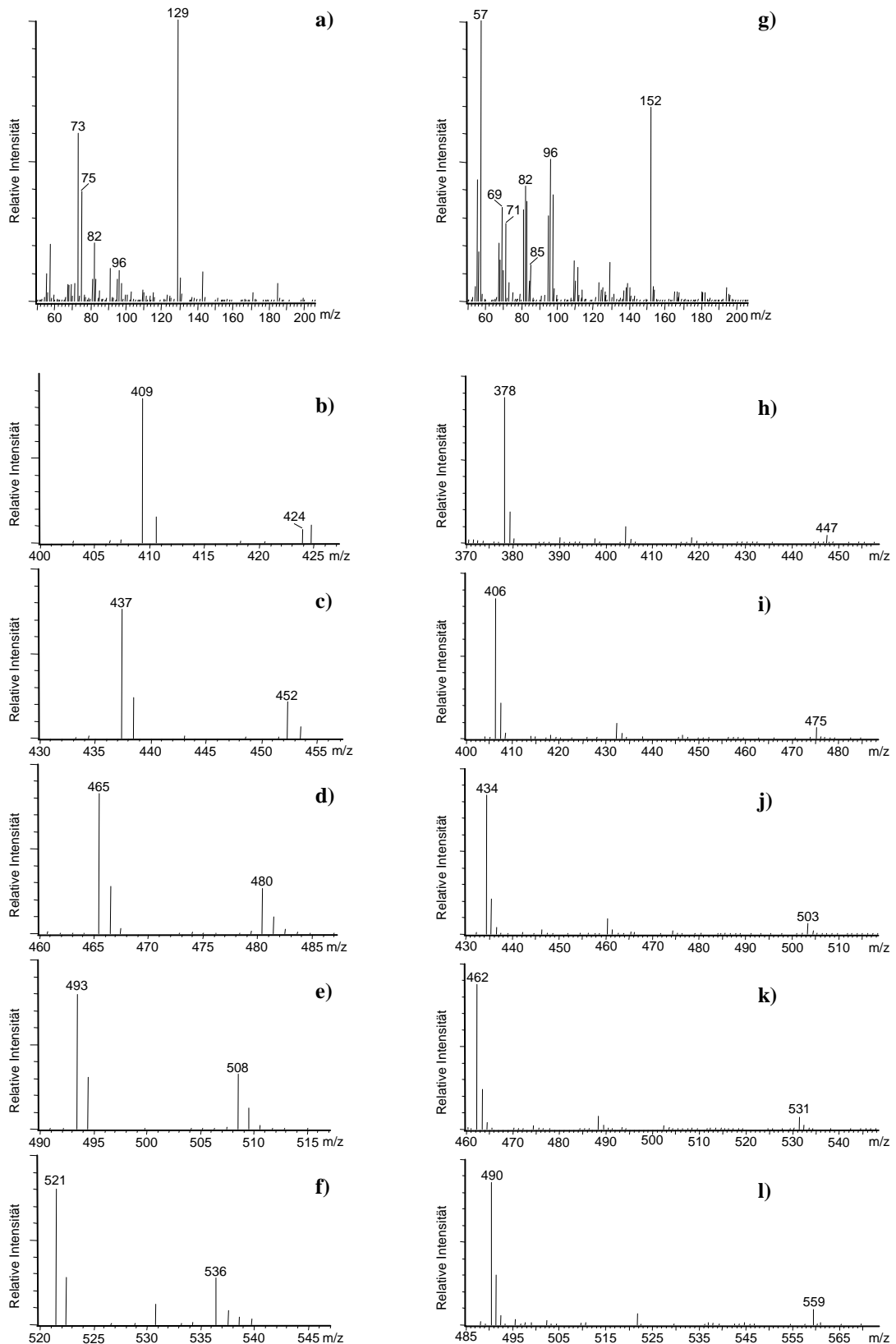
Die nach der Behandlung von Triacontanal mit BSTFA aufgetretenen Substanzen D und E (vgl. Abb. 2.2b, 2.3e) konnten in keiner der Wachsproben von *N. alata* gefunden werden. Es fanden sich zudem keine Substanzen, die anhand der Massenspektren den vergleichbaren Reaktionsprodukten des C<sub>30</sub>-, noch eines anderen Aldehyd-Homologen zuordnet werden konnten.

Somit konnte gezeigt werden, dass Aldehyd-Homologe in kutikulären Wachsen während der Probenvorbereitung mit BSTFA zu neuen Verbindungen reagieren. Diese Reaktionen führen zwangsläufig zu einer Verringerung der messbaren Menge an freien Aldehyden. Eine korrekte Quantifizierung der Aldehyde in Extrakten kutikulärer Wachse, ausschließlich anhand der freien Homologen, ist daher nicht möglich. Es musste daher geprüft werden, wie hoch die Substanzverluste sind, inwieweit diese durch die Mengen neu entstandener Derivate erklärt werden können, und ob die resultierende Mischung eine stabile Zusammensetzung aufweist.

#### 2.3.4 Wiederfindung von Triacontanal nach einer Behandlung mit BSTFA

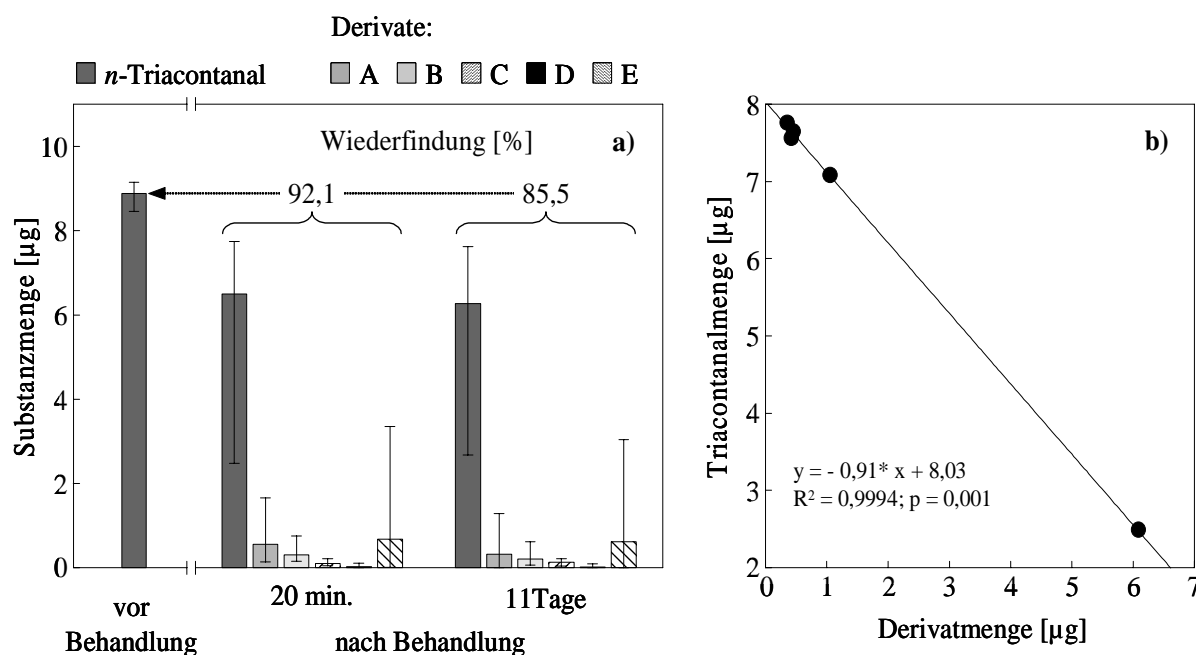
Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde in einem ersten Versuch synthetisches Triacontanal als Modellsubstanz zum einen vor und zum anderen 20 min. nach einer Behandlung mit BSTFA gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. Um zu testen, ob die Zusammensetzung der resultierenden Lösung während einer Lagerung über die Zeit stabil bleibt, wurden die Ansätze nach 11 Tagen bei 4°C erneut analysiert. In einem zweiten Versuch wurde zur Kontrolle synthetisches Triacontanal ohne Behandlung mit BSTFA unter den gleichen Bedingungen gelagert und analysiert.

---



**Abb. 2.5** Ausschnitte aus Massenspektren zweier homologer Substanzreihen in Extrakten kutikulärer Wache von *N. alata*, die während der Behandlung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) gebildet werden. a) Die Spektren einer ersten Substanzreihe sind im niedrigen Massenbereich (m/z 50-210) identisch und zeigen im hohen Massenbereich (m/z 400-547) zur Substanz A aus der Reaktion von Triacontanal mit BSTFA (vgl. Abb. 2.3b) analoge Fragmente (b-f). g) Die Spektren einer zweiten Substanzreihe sind im niedrigen Massenbereich (m/z 50-210) identisch und zeigen im hohen Massenbereich (m/z 370-570) zur Substanz C aus der Reaktion von Triacontanal mit BSTFA (vgl. Abb. 2.3d) analoge Fragmente (h-l).

Die im ersten Versuch eingesetzte Menge Triaccontanal betrug vor der Behandlung mit BSTFA  $8,9 \mu\text{g} \pm 0,3 \mu\text{g}$  (Abb. 2.6a). Die messbare Menge an freiem Aldehyd variierte direkt nach der Behandlung stark von  $2,5 \mu\text{g}$  bis  $7,7 \mu\text{g}$  und erreichte durchschnittlich  $6,5 \mu\text{g}$  bzw. 73,3% des Ausgangswertes vor der Behandlung (Tab. 2.2). Zusätzlich zum freien Triaccontanal fanden sich nach der Behandlung jeweils stark variierende Mengen der sechs Derivate A-D (Abb. 2.6a). Während in allen Proben 4-30% des Triaccontanal in den Derivaten A-C gebunden waren (Tab. 2.2), reagierten nur in einer Probe mehr als 0,6% zu den Derivaten D und E. Insgesamt waren so 18,8% der Ausgangsmenge an Triaccontanal in gebundener Form vorhanden (Tab. 2.2). Trotz der starken Schwankungen in den Mengen einzelner Komponenten, zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der gesamten Derivat- und der verbleibenden Triaccontanalmenge (Abb. 2.6b). Eine lineare Regressionsanalyse ( $y = -0,91 \cdot x + 8,03$ ) zeigte, dass die Verluste an freiem Triaccontanal nahezu vollständig durch die Derivatbildung erklärt werden können ( $R^2 = 0,9994$ ;  $p \leq 0,001$ ). Wurden die Mengen aller Derivate und die des freien Aldehyds summiert, betrug die Wiederfindung direkt nach der Behandlung 92,0% (Tab. 2.2). Die Gesamtmenge ( $8,2 \mu\text{g} \pm 0,3 \mu\text{g}$ ) an Triaccontanal und dessen Derivate lag damit nach der Behandlung signifikant unter der ursprünglich eingesetzten Menge an freiem Triaccontanal ( $p < 0,05$ , Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben). Dieser Wert wurde jedoch unabhängig von der absoluten Menge an Reaktionsprodukten reproduzierbar und mit geringer Streuung in allen Proben erreicht.



**Abb. 2.6** a) Mengen (Mittelwert; Minimum, Maximum; N=5) an *n*-Triacontanal und dessen Derivate A-E vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Behandlung mit BSTFA, sowie die Gesamtwiederfindung (%) an Triaccontanal zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung. b) Korrelation zwischen der Triaccontanal- und dessen Derivatmengen 20 min. nach einer Behandlung mit BSTFA (N=5).

**Tab. 2.2** Relative Substanzmengen [%] von Triacontanal und dessen Derivate zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Behandlung mit BSTFA (N=5). Die Werte beziehen sich auf die Menge an Triacontanal vor der Behandlung. Mittelwert; Minimum, Maximum.

Substanz	Relative Substanzmenge [%]			
	20 min.		11 Tage	
	MW	Min Max	MW	Min Max
<i>n</i> -Triacontanal	73,3	27,6 89,2	70,8	30,1 88,0
Derivat A	6,2	1,6 18,5	3,6	0,0 14,5
Derivat B	3,5	1,7 8,4	2,4	0,7 6,9
Derivat C	1,2	0,6 2,5	1,6	0,5 2,5
Derivat D	0,3	0,1 1,2	0,2	0,0 1,0
Derivat E	7,6	0,1 37,4	6,9	0,0 34,2
Σ Derivate	18,8	4,0 67,9	14,7	1,8 59,0
Σ Gesamt	92,1	88,8 95,5	85,5	75,0 93,2

Nach 11 Tagen Lagerung der Proben bei 4°C konnten leichte, jedoch nicht signifikante ( $p > 0,05$ ; Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben) Veränderungen in den Mengen sowohl des freien Triacontanal als auch der sechs Derivaten beobachtet werden (Abb. 2.6a). Die Aldehydmenge sank dabei auf durchschnittlich 6,3 µg und entsprach somit 70,8% der ursprünglich eingesetzten Menge (Tab. 2.2). Die gesamte Derivatmenge verringerte sich ebenfalls auf insgesamt 1,3 µg, so dass noch 14,7% des eingesetzten Triacontanal in gebundener Form vorlagen. Die Gesamtwiederfindung betrug daher 85,5% (Tab. 2.2).

Eine Verringerung der Menge an freiem Triacontanal konnte jedoch auch in einem zweiten Versuch beobachtet werden, wenn die Lösung nicht mit BSTFA behandelt, aber unter gleichen Bedingungen gelagert wurde. Innerhalb von 10 Tagen sank die Triacontanal-

menge signifikant ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Test gepaarte Stichproben) um 4% von  $9,2 \mu\text{g} \pm 0,9 \mu\text{g}$  auf  $8,9 \mu\text{g} \pm 1,0 \mu\text{g}$ .

Diese Versuche mit synthetischem Triacontanal zeigen, dass die höchste Wiederfindung nur unter Berücksichtigung der Derivate und innerhalb eines kurzen Zeitraumes nach einer Behandlung mit BSTFA erzielt werden kann. Unter diesen Voraussetzungen ist jedoch eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.

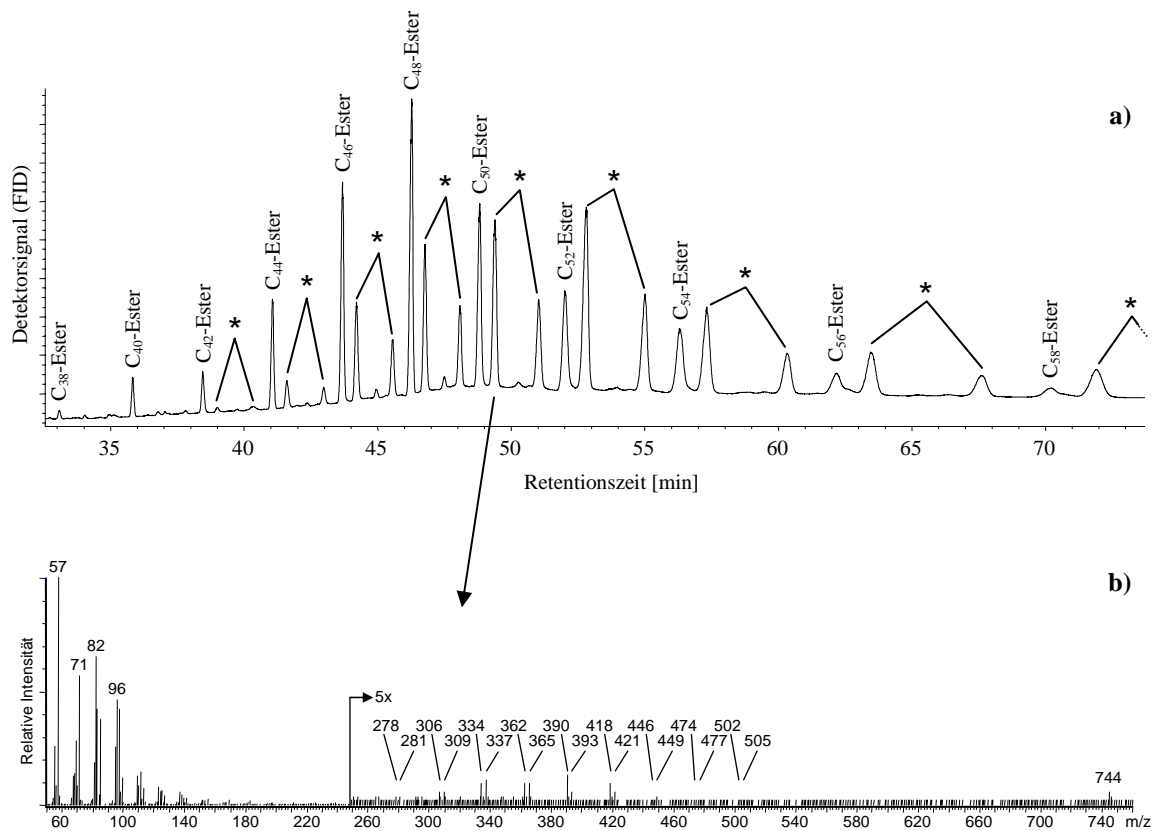
### 2.3.5 Reaktionsprodukte von Aldehyden mit Komponenten der kutikulären Wachse von *N. alata* nach einer Behandlung mit BSTFA

Nach einer Behandlung von Wachsextrakten der Gleitzzone von *N. alata* wurden neben den Derivaten der Aldehyd-Homologen mit BSTFA zwei homologe Reihen von Substanzpeaks gefunden, die zuvor keiner bekannten Verbindungsklasse zugeordnet werden konnten. Diese Substanzen traten dabei in stark variierenden Anteilen von 2% bis 16% der gesamten Wachs-



menge auf. Das Retentionsverhalten war dem langkettiger, gesättigter Alkyl-Ester ( $C_{42}$ - $C_{58}$ ) ähnlich und Substanzpaare zwischen beiden Reihen wiesen jeweils identische Massenspektren auf (\* in Abb. 2.7a).

Die Fragmentierungsmuster im unteren Massenbereich (Abb. 2.7b) waren dabei nahezu identisch mit denen freier Aldehyde (vgl. Abb. 2.3a). Zum einen zeigten sich Ionenserien der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n+1}]^+$  bzw.  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  und zum anderen dominierte eine Serie  $[C_nH_{2n-2}]^+$ , die ebenfalls in den Derivaten der Aldehyde mit BSTFA zu erkennen waren (vgl. Kap. 2.3.1.1). Im Gegensatz zu den Spektren freier Aldehyde, waren im mittleren bis hohen Massenbereich jedoch zwei schwache Ionenserien vorhanden, deren Mitglieder jeweils eine Massendifferenz von 28 amu aufwiesen. Eine dieser Serien zeigte dabei Ionen von  $m/z$  278 bis  $m/z$  502 der Zusammensetzung  $[C_nH_{2n-2}]^+$ , die bei freien Aldehyd-Homologen jeweils nur paarweise auftraten (vgl.  $m/z$  390, 418; Abb. 2.3a). Die zweite Serie bestand aus ungeradzahigen Ionen  $m/z$  281 bis  $m/z$  505 der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n+1}]^+$  bzw.  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  (Abb. 2.7b). Beide Ionenserien zeigten Intensitätsverteilungen, die sich in Abhängigkeit von der Retentionszeit des entsprechenden Substanzpaares in der Breite und



**Abb. 2.7** a) Gaschromatogramm (FID) eines Extraktes kutikulärer Wachse von *N. alata* im Bereich sehr langkettiger Alkyl-Ester ( $C_{38}$ - $C_{58}$ ). Die Sternchen (\*) markieren Substanzpaare mit annähernd identischen Fragmentierungsmustern. b) Massenspektrum ( $m/z$  50-750) der ersten Substanz eines Paares mit annähernd identischen Fragmentierungsmustern. Skalierung in b) ab  $m/z$  250 5-fach erhöht.

Höhe veränderten. Bei später eluierenden Paaren nahm dabei die Breite zu und die Intensitätsmaxima verschoben sich zu höheren Massen.

Die hohen Massenbereiche wiesen ebenfalls in Abhängigkeit von der Retentionszeit des Substanzpaares schwache Ionen mit einer Massendifferenz von 28 amu von  $m/z$  632 beim Ersten bis  $m/z$  856 beim letzten Paar auf. Diese Ionen entsprachen dabei der elementaren Zusammensetzung  $C_nH_{2n}O$  mit gerader Anzahl an Methylen-Einheiten oder  $C_nH_{2n}CO_2$  mit einer um zwei Methylen-Einheit kürzeren Kohlenwasserstoffkette.

Die Fragmentierungsmuster im niedrigen Massenbereich zeigen analog zu den Triacontanal-Derivaten das Vorhandensein einer Aldehyd-Untereinheit in diesen Verbindungen an. Auf der anderen Seite weisen das Retentionsverhalten und die Ionen im hohen Massenbereich darauf hin, dass es sich um sehr langkettige Verbindungen handelt. Es wurde daher vermutet, dass Aldehyde während der Behandlung mit BSTFA entweder direkt oder indirekt mit weiteren Komponenten der Wachsmischung reagieren.

### 2.3.6 Reaktionsprodukte synthetischer Aldehyde und primärer Alkohole nach einer Behandlung mit BSTFA

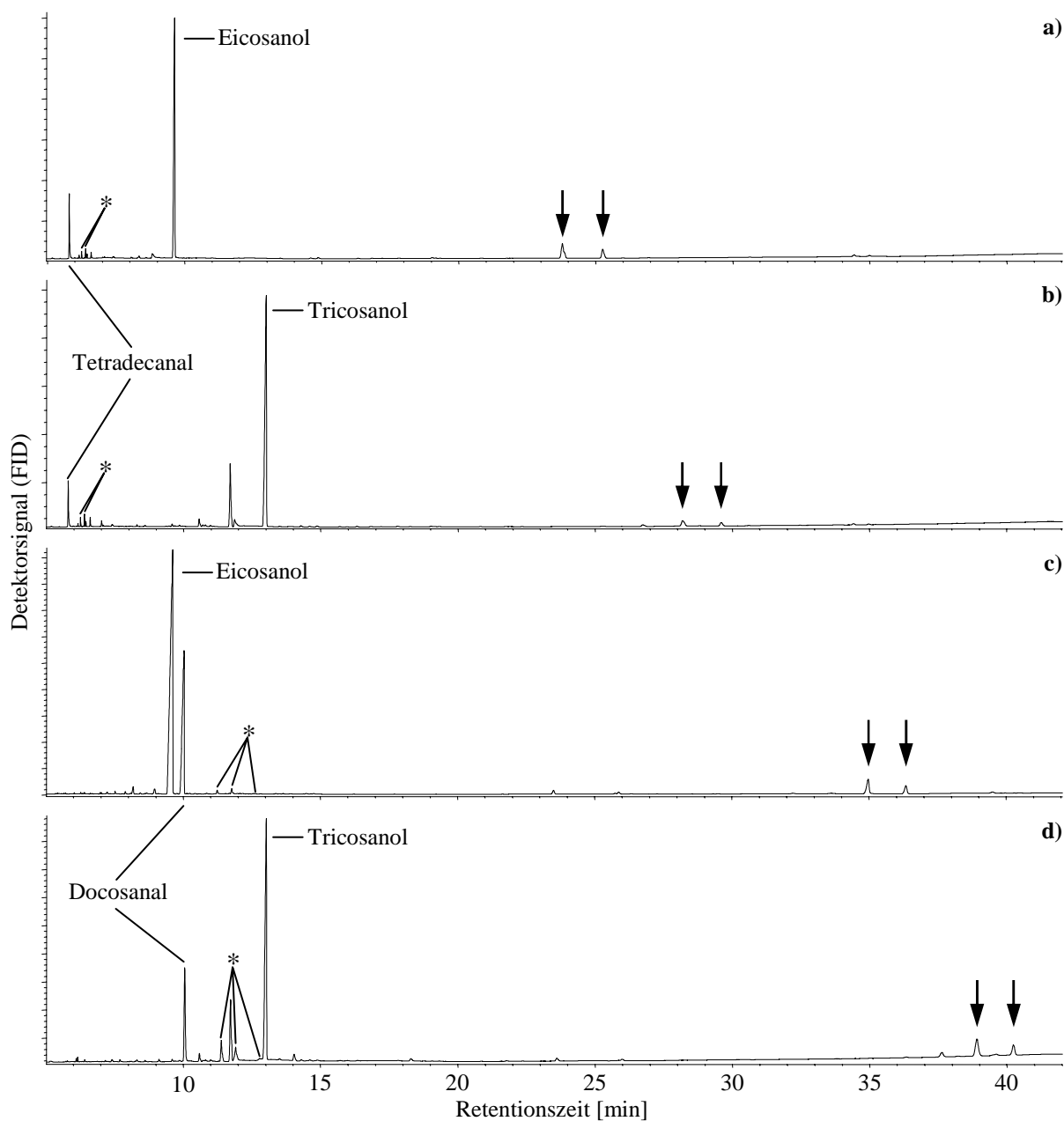
Um zu testen, ob Aldehyde während der Probenvorbereitung mit primären Alkoholen reagieren, wurden Mischungen aus je einem synthetischen Aldehyd ( $C_{14}$  bzw.  $C_{22}$ ) und einem primären Alkohol ( $C_{20}$ ,  $C_{21}$ ,  $C_{22}$  bzw.  $C_{23}$ ) einer Behandlung mit BSTFA unterzogen und die resultierenden Lösungen gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht.

Neben den bereits beschriebenen Derivaten der Aldehyde mit BSTFA, konnten je zwei weitere Substanzen gefunden werden (Abb. 2.8), deren Spektren paarweise annähernd identische Fragmentierungsmuster aufwiesen. Die Retentionszeiten der Substanzpaare waren abhängig von den Kettenlängen der eingesetzten Edukte. Die Substanzpaare eluieren dabei umso später, je höher die Kettenlänge des Alkohols bei konstanter Kettenlänge des Aldehyds (Abb. 2.8a, b und 2.8c, d), bzw. je höher die Kettenlänge des Aldehyds bei gleich bleibender Kettenlänge des Alkohols war (Abb. 2.5a, c und 2.8b, d).

Im niedrigen Massenbereich waren die Spektren aller resultierenden Substanzen annähernd identisch mit denen freier Aldehyde und wiesen die typischen Fragmente der Reihen  $[C_nH_{2n+1}]^+$  bzw.  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  sowie  $[C_nH_{2n-2}]^+$  auf (Abb. 2.9).

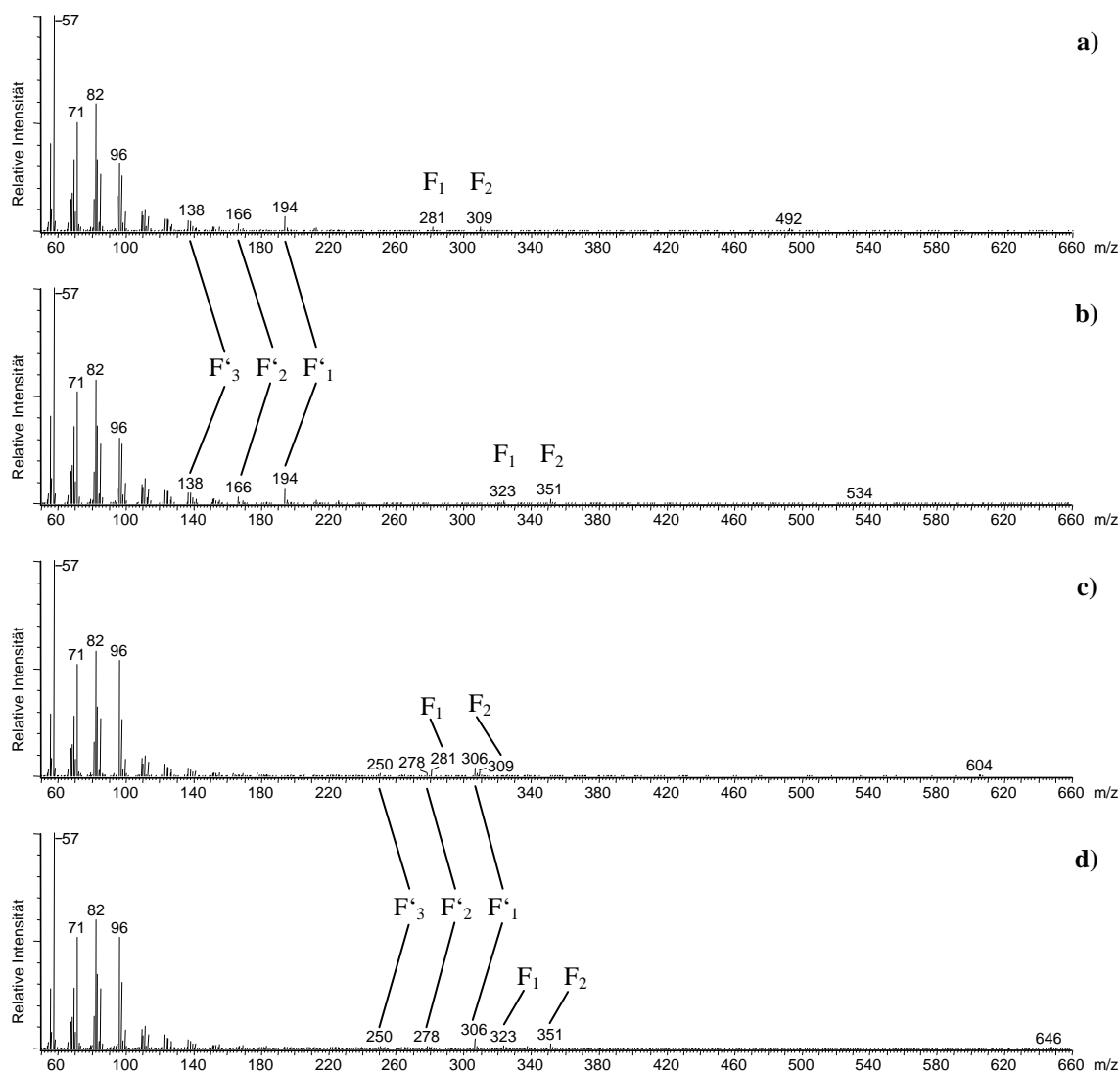
Die Spektren der Substanzpaare aus den Ansätzen mit Tetradecanal ( $C_{14}$ ) zeigten im hohen Massenbereich schwache Ionen der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n}O]^+$  (Abb. 2.9a, b).

Die Massen dieser Ionen nahmen in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Alkohols um je 14 amu von  $m/z$  492 mit Eicosanol (Abb. 2.9a) nach  $m/z$  534 mit Tricosanol (Abb. 2.9b) zu. Im mittleren Massenbereich war unabhängig vom eingesetzten Alkohol ein Fragment-Triplett ( $F'_1$ - $F'_3$ )  $m/z$  194,  $m/z$  166 und  $m/z$  138 der elementaren Zusammensetzung  $[C_nH_{2n-2}]^+$  erkennbar (Abb. 2.9a, b). Ein weiteres Fragmentpaar ( $F_1$  und  $F_2$ ) der Zusammensetzung  $[C_nH_{2n+1}]^+$  veränderte seine Lage in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Alkohols um je 14 amu (Abb. 2.9a, b) von  $m/z$  281 ( $F_1$ ) und  $m/z$  309 ( $F_2$ ) mit Eicosanol (Abb. 2.9a) nach  $m/z$  323 ( $F_1$ ) und  $m/z$  351 ( $F_2$ ) mit Tricosanol (Abb. 2.9b).



**Abb. 2.8** Gaschromatogramme (FID) von Mischungen synthetischer Aldehyde mit primären Alkoholen nach einer Behandlung mit BSTFA. a) *n*-Tetradecanal mit 1-Eicosanol. b) *n*-Tetradecanal mit 1-Tricosanol. c) *n*-Docosanal mit 1-Eicosanol. d) *n*-Docosanal mit 1-Tricosanol. Sternchen (\*) markieren Derivate des jeweiligen Aldehyd mit BSTFA. Pfeile markieren bisher unbekannte Substanzenpaare mit annähernd identischen Massenspektren.

In den Spektren der Substanzpaare aus den Ansätzen mit Docosanal ( $C_{22}$ ) konnten analoge Fragmentpaare gefunden werden, die ihre Masse in Abhängigkeit von der Kettenlänge des eingesetzten Alkohols um je 14 amu veränderten (Abb. 2.9c, d). Die entsprechenden Massen betragen mit Eicosanol (Abb. 2.9c)  $m/z$  281 ( $F_1$ ) und  $m/z$  309 ( $F_2$ ) und erhöhten sich auf  $m/z$  323 und  $m/z$  351 mit Tricosanol (Abb. 2.9d). Die Massen eines Fragment-Tripletts ( $m/z$  306,  $m/z$  278 und  $m/z$  250) hingegen lagen mit Docosanal als Aldehyd um 112 amu höher als im Ansatz mit Tetradecanal und entsprachen damit einer um 8 Methyleneinheiten höheren Kettenlänge (Abb. 2.9c, d). Im hohen Massenbereich verschob sich mit zunehmender Kettenlänge des Alkohols ein Ion von  $m/z$  604 nach  $m/z$  646.



**Abb. 2.9** Je eines von zwei annähernd identischen Massenspektren bisher unbekannter Substanzpaare, die während der Behandlung von Mischungen aus Aldehyden und primären Alkoholen verschiedener Kettenlänge mit BSTFA gebildet werden. a) *n*-Tetradecanal mit 1-Eicosanol. b) *n*-Tetradecanal mit 1-Tricosanol. c) *n*-Docosanal mit 1-Eicosanol. d) *n*-Docosanal mit 1-Tricosanol.  $F'_1$ - $F'_3$ : Fragmente der Aldehyd-Seite;  $F_1$ ,  $F_2$ : Fragmente der Alkohol-Seite.

Diese Ergebnisse zeigen, dass während einer Behandlung mit BSTFA aus Aldehyden und primären Alkoholen neue Verbindungen entstehen. Die Spektren der verschiedenen Reaktionsprodukte waren im unteren Massenbereich identisch mit denen der Substanzpaare aus Wachsextrakten von *N. alata*. Zudem waren in allen Spektren im mittleren und hohen Massenbereich Ionen der gleichen elementaren Zusammensetzung erkennbar. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei den Substanzpaaren in den Extrakten von *N. alata* um analoge Reaktionsprodukte aus Aldehyden mit primären Alkoholen handelt.

Die Fragment-Triplets ( $F'_1$ - $F'_3$ ) in den Spektren der Reaktionsprodukte aus synthetischen Komponenten konnten dabei der Aldehyd-Seite und die Fragmentpaare ( $F_1$  und  $F_2$ ) der Alkohol-Seite zugeordnet werden. Die Fragmente  $F_1$  und  $F_2$  traten jeweils in beiden Spektren der Produktpaare des Docosanal unabhängig von der Kettenlänge des Alkohols in einem Verhältnis von  $F_1/F_2 = 0,70$  auf (Tab. 2.3). Die Verhältnisse der Fragmente  $F'_1$ - $F'_3$  waren ebenfalls unabhängig von der Kettenlänge des Alkohols, unterschieden sich jedoch leicht zwischen den Substanzen eines Paares (Tab. 2.3). Im Gegensatz dazu, veränderten sich die Intensitätsverhältnisse der analogen Fragmente in den Spektren der Substanzpaare aus *Nepenthes*-Extrakten in Abhängigkeit von der Retentionszeit, d.h. von der Gesamtkettenlänge. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich um Überlagerungen der Fragmentierungsmuster von Reaktionsprodukten gleicher Gesamtkettenlänge handelt, in denen je-doch Aldehyd- bzw. Alkohol-Homologe unterschiedlicher Kettenlänge gebunden sind.

**Tab. 2.3** Intensitätsverhältnisse diagnostischer Fragmente in Spektren von Substanzpaaren, die während der Behandlung von Mischungen aus *n*-Docosanal und primären Alkoholen verschiedener Kettenlänge ( $C_{20}$ - $C_{23}$ ) mit BSTFA gebildet wurden. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

	Intensitätsverhältnisse diagnostischer Fragment-Ionen	
	Substanz 1	Substanz 2
$F'_3/F'_2$	$4,14 \pm 0,39$	$4,34 \pm 0,74$
$F'_3/F'_1$	$6,82 \pm 1,02$	$5,49 \pm 0,62$
$F_1/F_2$	$0,70 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,05$

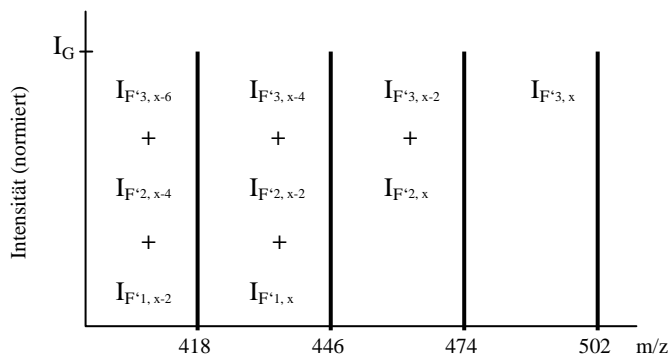
### 2.3.7 Quantifizierung von gebundenen Aldehyd- und Alkohol-Homologen in kutikulären Wachsen von *N. alata* nach einer Behandlung mit BSTFA

Die Bildung von Reaktionsprodukten aus Aldehyden und primären Alkoholen während der Behandlung mit BSTFA führt folglich zu Substanzverlusten bei den entsprechenden freien Homologen. Um jedoch die Zusammensetzung der ursprünglichen Wachsmischung quantifizieren zu können, müssen die in den Produkten gebundenen Mengen bestimmt werden. Daher wurden die Intensitätsverhältnisse der diagnostischen Fragmente der verschiedenen Produkte des synthetischen Docosanal verwendet, um die relativen molaren Anteile der Aldehyd- bzw. Alkohol-Homologen aus den überlagerten Spektren der Produkte in Extrakten von *N. alata* zu berechnen. Es wurden fünf Wachsproben von *N. alata* gewählt, die hohe Mengen der Reaktionsprodukte enthielten und somit gut auswertbare Massenspektren mit intensiven Fragmenten lieferten. Die Intensitäten der diagnostischen Fragmentreihen ( $F' = 502 - 28n$ , mit  $n = 0, 1, 2, \dots, 10$ ;  $F = 505 - 28n$ , mit  $n = 0, 1, 2, \dots, 9$ ) wurden aus über die gesamte Peakbreite gemittelten Massenspektren manuell ausgelesen. Die oberen und unteren Grenzen der beiden Reihen wurde dabei durch die Minima und Maxima der entsprechenden in *N. alata*-Proben gefundenen Homologenverteilungen (s. Kap. 3.3.3) bestimmt.

Es wurde angenommen, dass sich die Gesamtintensität eines bestimmten Fragments additiv aus den Intensitäten der entsprechenden Fragmente eines Reaktionsproduktes und der Fragmente von Reaktionsprodukten aus Homologen benachbarter Kettenlängen ergeben (Abb. 2.10a). Ausgehend von der Intensität der höchsten Masse innerhalb des charakteristischen Fragment-Triplets ( $F'_3$ ) des langkettigsten Aldehyd-Homologen ( $C_{34}$ ) wurden über die bekannten Verhältnisse (Tab. 2.3) die entsprechenden Intensitäten der Fragmente des benachbarten Homologen berechnet und davon subtrahiert (Abb. 2.10b). In entsprechender Weise wurden die Intensitätsanteile der Alkohol-Homologen aus den Verhältnissen der Fragmentpaare berechnet. Die Mediane (aus 5 Proben) der resultierenden relativen Intensitäten eines Fragments an der Gesamtintensität der Fragmentreihe dienten dann als Faktoren für die Berechnung der molaren Anteile der beteiligten Homologen an der molaren Substanzmenge des entsprechenden Reaktionsproduktes. Daraus wurden die Gesamtmengen der in den Reaktionsprodukten gebundenen Aldehyd- und Alkohol-Homologen berechnet. Die durch dieses Verfahren berechneten Gesamtmengen stimmten dabei mit der durch Integration der Peakflächen bestimmte Substanzmengen der Reaktionsprodukte überein (Abb. 2.11). Eine lineare Regressionsanalyse ( $y = 1,06 \cdot x - 0,01$ ) zeigte zudem, dass nahezu keine systematische Fehlgewichtung durch die Berechnung resultierte. Somit zeigte sich, dass im Vergleich zu den

Mengen an den freien Homologen, 3-21% der entsprechenden Aldehyd- und 10-108% der entsprechenden Alkohol-Homologen in diesen Reaktionsprodukten gebunden waren.

a)



b)

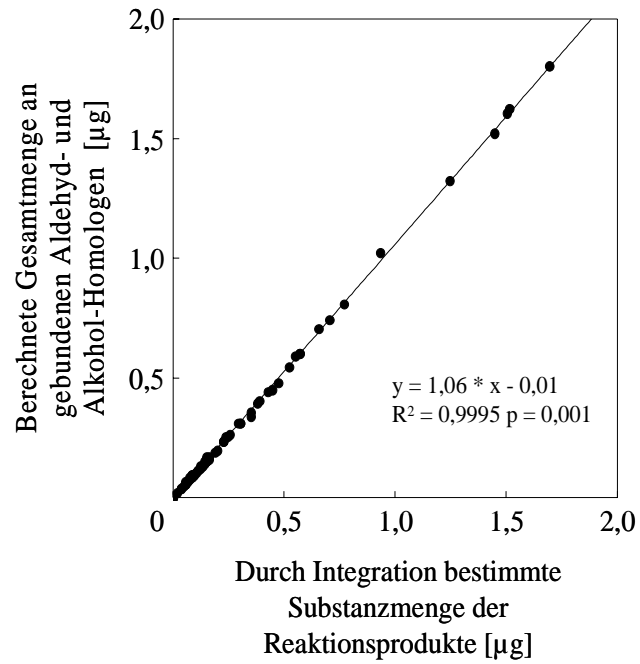
$$I_{F^3, x} = I_{G502} \quad \text{mit } x: C_{34}$$

$$I_{F^3, x-2} = I_{G474} - I_{F^2, x} \quad \text{mit } I_{F^2, x} = I_{F^3, x} / 4,14$$

$$I_{F^3, x-4} = I_{G446} - I_{F^2, x-2} - I_{F^1, x} \quad \text{mit } I_{F^1, x} = I_{F^3, x} / 6,82 \text{ und } I_{F^2, x-2} = I_{F^3, x-2} / 4,14$$

**Abb. 2.10** a) Schema zur Zusammensetzung der Gesamtintensität von diagnostischen Fragmenten der Aldehyd-Seite in Massenspektren der Reaktionsprodukte von Aldehyden mit primären Alkoholen in Wachsen von *N. alata* nach einer Behandlung mit BSTFA. b) Formeln zur Berechnung der Intensitätsanteile diagnostischer Fragmente der Aldehyd-Seite in Massenspektren verschiedener Reaktionsprodukte aus Aldehyden mit primären Alkoholen.  $F^1$ - $F^3$ : diagnostische Fragmente der Aldehyd-Seite; I: Intensität eines Fragments;  $I_{G502}$ ,  $I_{G474}$ ,  $I_{G446}$ : Gesamtintensität der Fragmente m/z 502, m/z 474 und m/z 446. x: Kettenlänge eines am Reaktionsprodukt beteiligten Aldehyd-Homologen.

Das vorliegende Kapitel zeigte, dass die quantitative Analyse von Aldehyden und Alkoholen in Mischungen kutikulärer Wachse stark mit Fehlern behaftet sein kann. Werden nur die freien Homologen betrachtet, lassen sich nach einer Behandlung mit BSTFA hohe Substanzverluste feststellen. Substantielle Mengen der Aldehyde reagieren sowohl mit dem Derivatisierungsreagenz als auch mit primären Alkoholen zu neuen Verbindungen, die gaschromatographisch getrennt analysiert werden müssen. Weiterhin sind die Zusammensetzungen der behandelten Lösungen über die Zeit nicht stabil. Eine hohe Wiederfindungsrate und somit eine quantitative Analyse der beteiligten Aldehyd- bzw. Alkohol-Homologen ist nur unter Einbeziehung dieser Derivate und innerhalb kurzer Zeit nach der Behandlung erreichbar.



**Abb. 2.11** Berechnete Gesamtmenge der in Reaktionsprodukten gebundenen Aldehyd- und Alkohol-Homologen gegen die durch Integration bestimmte Substanzmenge der entsprechenden Reaktionsprodukte.



## 2.4 Diskussion

Die chemische Analyse kutikulärer Wachse erfolgt häufig durch kapillar-gaschromatographische (GC) Auftrennung der Substanzgemische in Einzelkomponenten mit gekoppelter massenspektrometrischer Identifikation (GC-MS) und Quantifizierung mittels Flammenionisationsdetektion (GC-FID). Kutikuläre Wachse sind in der Regel komplexe Gemische aus aliphatischen und zyklischen Kohlenwasserstoffen, die eine Vielzahl funktioneller Gruppen tragen können (Holloway 1984; Walton 1990; Bianchi 1995). In vielen Fällen handelt es sich hierbei um Hydroxyl- oder Carboxyl-Gruppen von z.B. Alkoholen und Fettsäuren. Diese Gruppen sind jedoch sehr reaktiv und können sowohl starke intermolekulare Wechselwirkungen als auch sorbtive Wechselwirkungen mit der stationären Phase der Kapillarsäule eingehen (Seibl 1970). Dies kann während der gaschromatographischen Analyse zu Substanzverlusten führen und zusätzlich das Trennvermögen der Kapillarsäule herabsetzen.

Um jedoch die vielfältigen ökologischen Funktionen kutikulärer Wachse verstehen zu können, ist eine genaue Kenntnis ihrer chemischen Zusammensetzung Grundvoraussetzung. Daher müssen verlässliche Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse zur Verfügung stehen. Der gaschromatographischen Analyse der Wachse werden daher geeignete Derivatisierungsschritte vorangestellt, die hydroxyl-haltige Verbindungen in thermisch stabilere und inerte Derivate überführen, die zudem häufig strukturanalytisch wesentlich ergiebigere Massenspektren liefern (Seibl 1970). Eine häufig verwendete Methode ist die vollständige Überführung dieser Verbindungen in die entsprechenden Trimethylsilyl-Ether und -Ester durch *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA). Naß et al. (1998) konnten jedoch zeigen, dass die quantitative Analyse von Wachsmischungen, die langkettige Aldehyde enthalten, nach der Behandlung mit BSTFA problematisch ist. Wurden solche Wachsmischungen einer Derivatisierung mit BSTFA unterzogen, konnten beträchtliche Substanzverluste innerhalb der Aldehyde festgestellt werden (Naß et al. 1998). Zudem war in wiederholten Analysen derselben Proben keine reproduzierbare Quantifizierung dieser Substanzklasse möglich (Riederer und Markstädter 1996). Die schlechte Analysierbarkeit der Aldehyde konnte auch durch die Verwendung verschiedenster Derivatisierungsmethoden nicht verbessert werden (Riederer und Markstädter 1996; Naß et al. 1998). Jedoch blieb unklar, worin die Ursachen der Substanzverluste liegen und wo die fehlenden Aldehydmengen verblieben waren.

In Extraktionsexperimenten an *Nepenthes alata* konnte gezeigt werden, dass die kutikulären Wachse der Gleitzzone hohe Anteile sehr langkettiger Aldehyde, insbesondere

Triacontanal ( $C_{30}$ ) enthalten (Schmidt 2000). Dabei wurden die Wachse durch eine Festphasenextraktion in eine polare und unpolare Fraktion getrennt. Die unpolare Fraktion enthielt dabei ausschließlich Substanzen, die keine aktiven Wasserstoffatome in Hydroxyl-Gruppen tragen und daher prinzipiell auch ohne vorangehende Derivatisierung gaschromatographisch analysiert werden können. In einer vergleichenden quantitativen Analyse dieser Fraktion vor und nach einer Derivatisierung wurden geringfügige Substanzverluste innerhalb der Aldehyde gefunden. Es wurde vermutet, dass die Aldehyde teilweise mit BSTFA zu neuen Verbindungen reagierten (Schmidt 2000). Ein kausaler Zusammenhang zwischen bestimmten Verbindungen und der Behandlung der Aldehyde mit BSTFA konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und sowohl die Anzahl als auch die Identität potentieller Reaktionsprodukte war bisher unklar.

#### 2.4.1 Qualitative Zusammensetzung von Triacontanal-Lösungen nach einer Behandlung mit BSTFA

##### 2.4.1.1 Massenspektrum von *n*-Triacontanal

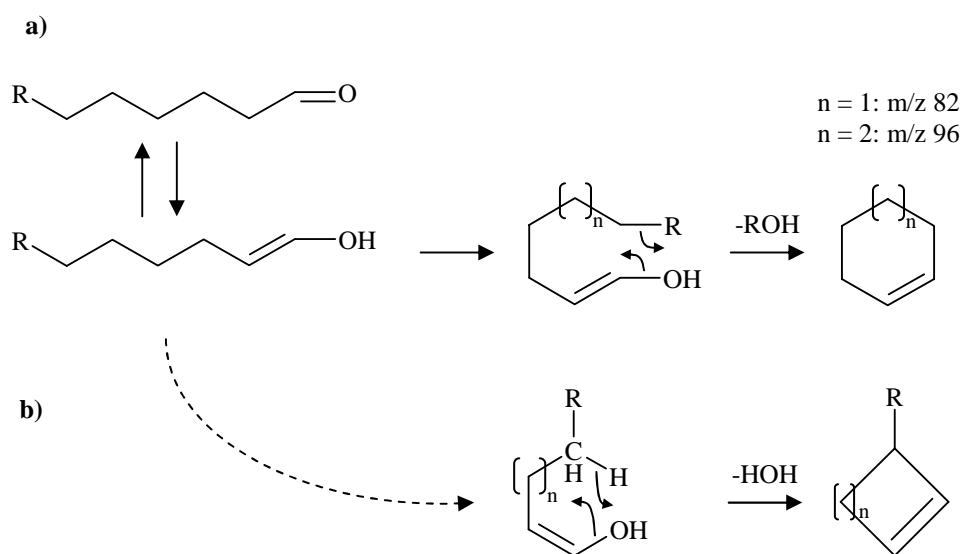
Die Massenspektren aliphatischer Aldehyde wurden bereits in zahlreichen Arbeiten systematisch analysiert (Gilpin und McLafferty 1957; Christiansen et al. 1969; Meyerson et al. 1970; Harrison 1970; Maccoll und Mruzek 1986). Das in der vorliegenden Arbeit gewonnene Massenspektrum von Triacontanal zeigte ein für langkettige aliphatische Aldehyde typisches Fragmentierungsmuster (vgl. Abb. 2.3a). Die Fragmente der Reihen  $[C_nH_{2n+1}]^+$  und  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  waren komplementäre Spaltprodukte die sich bei gleicher Fragmentlänge auf Grund der nominellen Masse überlagerten (Meyerson et al. 1970). Die Reihe  $[C_nH_{2n+1}]^+$  wies dabei unspezifisch auf den aliphatischen Charakter des Moleküls hin (McLafferty und Tureček 1993).

Charakteristisch für langkettige Aldehyde waren jedoch die Fragmente der Reihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$ , die erst in Spektren höherer Aldehyd-Homologer ( $\geq C_7$ ) auftreten. Für die Bildung dieser Fragmente wurden in der Literatur unterschiedliche Möglichkeiten vorgeschlagen. Nach Christiansen et al. (1969) bildet sich zuerst die Enol-Form des Aldehyds, die dann unter Ringbildung R-OH absplaltet (Abb. 2.12a). Das Maximum dieser Fragmentreihe bei  $m/z$  82 entspräche demnach einer wahrscheinlicheren Ringstruktur mit 6 C-Atomen. Im Unterschied dazu, setzen Maccoll und Mruzek (1986) einen Übergangszustand voraus, in dem einerseits Wasser und andererseits Olefine der Form  $C_nH_{2n}$  aus dem Molekülion ( $[M - H_2O - C_nH_{2n}]^+$ )

eliminiert werden. Die der Fragmentierung zugrunde liegenden Mechanismen lassen die Autoren jedoch offen.

Im hohen Massenbereich des vorliegenden Spektrums von Triacontanal konnte das Ion  $m/z$  436 entsprechend der Summenformel  $C_{30}H_{60}O$  eindeutig dem Molekülion zugeordnet werden. Demnach entsprach das Fragment  $m/z$  418  $[M-18]^+$  nominell einem Verlust von Wasser. Die Eliminierung von Wasser gewinnt insbesondere bei höheren Aldehyd-Homologen an Bedeutung, während die Intensitäten von  $M^+$  mit zunehmender Kettenlänge abnehmen (Gilpin und McLafferty 1957). Der Mechanismus für die Elimination von Wasser wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf Grund von Deuterierungsexperimenten gehen Christiansen et al. (1969) von der Bildung der Enol-Form unter Beteiligung eines H-Atoms von  $C_2$  und einer anschließenden Ringbildung und Wasserabspaltung unter Beteiligung eines H-Atoms von  $C_4$  oder  $C_5$  aus (Abb. 2.12b). Im Gegensatz dazu, schließen Maccoll und Mruzek (1986), basierend auf weiteren Deuterierungsexperimenten (Harrison 1970; Meyerson et al. 1970), die Beteiligung der H-Atome von  $C_2$  und somit die Bildung der Enol-Form aus.

Weiterhin fand sich im hohen Massenbereich des vorliegenden Spektrums von Triacontanal ein Fragment  $[M-46]^+$  ( $m/z$  390), das nominell einem Verlust von Wasser (18 amu) und Ethen (28 amu) entsprach. Dieses Fragment könnte einerseits der von Maccoll und Mruzek (1986) postulierten Fragmentreihe ( $[M - H_2O - C_nH_{2n}]^+$ ) mit  $n = 2$  zugeordnet werden, andererseits jedoch auch durch den von Christiansen et al. (1969) vorgeschlagenen Mechanismus entstanden sein (vgl. Abb. 2.12a).



**Abb. 2.12** Hypothetische Mechanismen zur Entstehung charakteristischer Fragmentreihen und Fragmente in Massenspektren sehr langkettiger Aldehyde. a) Bildung der Fragmentreihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$ . b) Eliminierung von Wasser. Verändert nach Christiansen et al. 1969.

---

#### 2.4.1.2 Derivatspektren

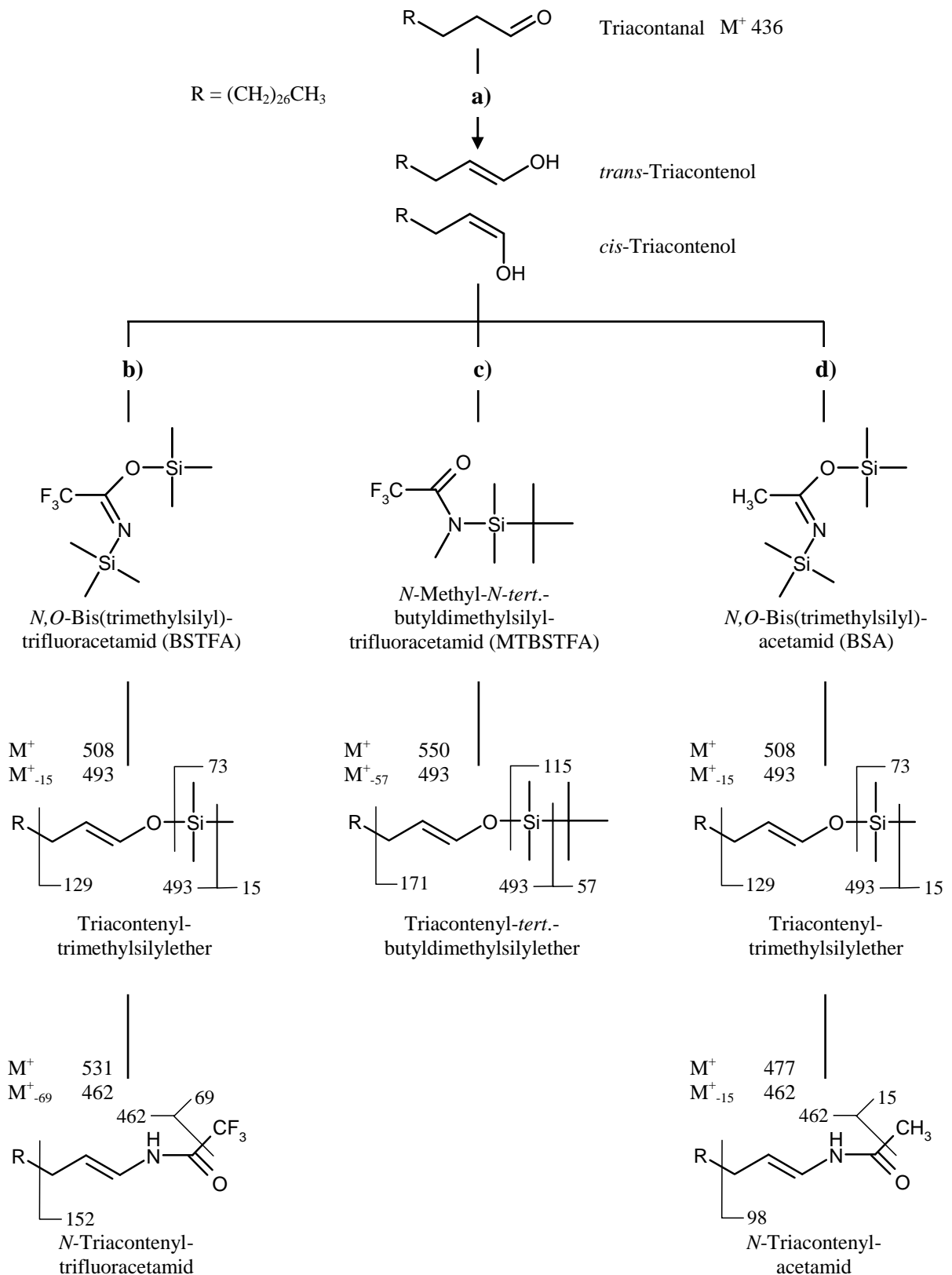
Wurde der synthetische Triacontanal-Standard mit BSTFA behandelt, konnten nach der Derivatisierungsreaktion fünf neu entstandene Substanzpeaks beobachtet werden.

##### Substanz A

Das Massenspektrum der Substanz A (Abb. 2.3b) zeigte im niedrigen Massenbereich für TMS- bzw. Alkyldimethylsilyl-Ether und -Ester charakteristische Fragmente  $m/z$  73 bzw.  $m/z$  75 (Poole und Zlatkis 1979). Das Fragment  $m/z$  73 ist dabei charakteristisch für Trimethylsilyl-Ether bzw. -Ester und entspricht der ionisierten TMS-Gruppe ( $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ ). Das Fragment  $m/z$  75 findet sich allgemein in Spektren von Alkyldimethylsilyl-Ethern bzw. -Estern und entspricht einem Dimethylsilanol ( $[\text{HO}=\text{Si}(\text{CH}_3)_2]^+$ ). Diese Fragmente finden sich z.B. auch in Spektren silylierter Alkohole und Säuren und zeigen das Vorhandensein einer freien Hydroxyl-Gruppe in der Ausgangsverbindung an. Bei dem hier verwendeten Triacontanal könnte während der Derivatisierungsreaktion eine freie Hydroxyl-Gruppe durch Tautomerisierung in die entsprechende Enol-Form entstanden sein (Abb. 2.13a). Die Hydroxyl-Gruppe wäre dann einer Silylierung durch BSTFA zugänglich gewesen und das resultierende Derivat entspräche einem Triacontenyl-TMS-Ether (Abb. 2.13b). Ein Austausch des Wasserstoffs der Hydroxyl-Gruppe durch eine TMS-Gruppe sollte demnach das Molekülion des Derivates gegenüber dem ursprünglichen Triacontanal (436 amu) um 72 amu erhöhen. In Übereinstimmung damit fand sich im Spektrum der Substanz A ein Ion  $m/z$  508, das folglich als Molekülion interpretiert werden konnte. Dabei kann im Allgemeinen beobachtet werden, dass Trialkylsilyl-Ether zur Abspaltung einer der Alkyl-Gruppen neigen (Poole und Zlatkis 1979). Dementsprechend war das Molekülion im Spektrum der Substanz A von geringer Intensität und von einem intensiveren Fragment  $m/z$  493 ( $[\text{M}-15]^+$ ) durch Verlust einer der Methyl-Gruppen begleitet.

Die silylierte Enol-Form des Triacontanal besäße weiterhin eine ungesättigte C=C-Bindung, die einer allylischen Spaltung unterliegen könnte (Abb. 2.13b). Das Spektrum der Substanz A zeigte ein Ion  $m/z$  129 (Basispeak), das sich mit einem daraus resultierenden Fragment  $[\text{CH}_2=\text{CHCH-O-TMS}]^+$  in Einklang bringen lässt.

---



**Abb. 2.13** Strukturformeln und charakteristische Fragmente der Reaktionsprodukte von Triacontanal mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien. a) Bildung *cis-trans*-isomerer Alkenole. b) Reaktionsprodukte mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) c) Reaktionsprodukte mit *N*-Methyl-*N*-*tert.*-butyldimethylsilyltrifluoroacetamid (MTBSTFA). d) Reaktionsprodukte mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA). Dargestellt ist je das *trans*-isomere Reaktionsprodukt.

Um die Hypothese der Enol-Bildung mit anschließender Trimethylsilylierung durch BSTFA zu überprüfen, wurde Triacontanal mit einem strukturanalogen Silylierungsreagenz derivatisiert (Abb. 2.13c). Das verwendete *N*-Methyl-*N*-*tert*-butyldimethylsilyltrifluoracetamid (MTBSTFA) ist dabei Donor einer *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe (*t*-BDMS-Gruppe) und überführt hydroxyl-haltige Verbindungen in die entsprechenden *t*-BDMS-Ether.

Eine *t*-BDMS-Gruppe besitzt gegenüber einer TMS-Gruppe eine um 42 amu höhere Masse. Unter der Voraussetzung analoger Reaktionen, sollten die Derivate des Triacontanal mit MTBSTFA, und somit deren zum TMS-Ether analogen Fragmente, eine Massendifferenz von 42 amu aufweisen. Unter der Annahme eines resultierenden Triacontenyl-*t*-BDMS-Ethers (Abb. 2.13c), wäre demnach ein Moleküllion  $m/z$  550 zu erwarten gewesen. Auf der einen Seite konnte ein Ion dieser Masse im Spektrum der MTBSTFA-Derivate nicht gefunden werden (vgl. Abb. 2.4a). Auf der anderen Seite jedoch, zeigten zahlreiche Untersuchungen, dass die Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppe sehr wahrscheinlich ist und meist ein  $[M-57]^+$  entsteht (Poole und Zlatkis 1979). Dem entsprechend konnte in den Spektren der MTBSTFA-Derivate ein Fragment  $m/z$  493 gefunden werden, das dann dem Fragment  $[M-15]^+$  des TMS-Ethers analog ist.

Weiterhin sollten in den Spektren der MTBSTFA-Derivate ebenfalls für silylierte Verbindungen typische Fragmente auftreten. Dem entsprechend fand sich ein für Alkyldimethylsilane gemeinsames Fragment  $m/z$  75, das analog zum TMS-Ether einem Dimethylsilanol ( $[\text{HO}=\text{Si}(\text{CH}_3)_2]^+$ ) durch Abspaltung der *t*-BDMS-Gruppe entsprach. Zudem fand sich in den Spektren der MTBSTFA-Derivate ein Fragment  $m/z$  115, das zu  $m/z$  73 des TMS-Ethers eine dem Austausch einer Methyl- durch eine *tert*-Butyl-Gruppe entsprechende Massendifferenz (42 amu) aufwies. Dieses Fragment kann daher als analog zur TMS-Gruppe angesehen werden und entspricht der *t*-BDMS-Gruppe ( $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3]^+$ ). Das Auftreten von  $m/z$  73 auch im Spektrum des *t*-BDMS-Ether kann auf sekundäre Reaktionen während der Fragmentierung unter Bildung eines TMS-Ions zurück geführt werden (Phillipou 1977).

In Analogie zur allylischen Spaltung der Doppelbindung des TMS-Ethers ( $m/z$  129) kann im Spektrum des MTBSTFA-Derivates das Fragment  $m/z$  171 angesehen werden (Abb. 2.13c). Die Massendifferenz von 42 amu deutete wiederum auf den Austausch der TMS- durch eine *t*-BDMS-Gruppe hin, wodurch ein Fragment  $[\text{CH}_2=\text{CHCH-O-}t\text{-BDMS}]^+$  entstand.

Weiterhin fanden sich im Spektrum der Substanz A Fragmente, die zuvor als charakteristisch für Triacontanal beschrieben wurden und zusätzlich bekräftigten, dass eine Aldehyd-Untereinheit vorhanden war. Im unteren Massenbereich konnte die Ionenreihe  $[\text{C}_n\text{H}_{2n-2}]^+$  mit einem Maximum bei  $m/z$  82 beobachtet werden (vgl. Abb. 2.3b). Analog zu

den Fragmentierungen bei Triacontanal, könnte diese Reihe entweder durch Ringbildung und Verlust eines  $\text{R-O-Si(CH}_3)_3$  (vgl. Christiansen et al. 1969; Abb. 2.12a) entstanden sein oder einer zu  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_n\text{H}_{2n}]^+$  analogen Reihe  $[\text{M} - \text{HOSi(CH}_3)_3 - \text{C}_n\text{H}_{2n}]^+$  entsprochen haben (vgl. Maccoll und Mruzek 1986). In gleicher Weise würde das Fragment  $m/z$  418 einer Elimination von Trimethylsilanol ( $\text{HO-Si(CH}_3)_3$ ) statt von Wasser ( $\text{HO-H}$ ) entsprochen haben (vgl. Abb. 2.12b).

Die Interpretation des Spektrums der Substanz A (Abb. 2.3b), zusammen mit den Fragmentierungsanalogien in den Spektren sowohl des MTBSTFA-Derivates (Abb. 2.4a) als auch des freien Triacontanal (Abb. 2.3a) lassen den Schluss zu, dass Triacontanal während der Derivatisierung mit BSTFA z. T. in der Enol-Form vorliegt und damit einer Silylierung zugänglich ist. Es ist daher plausibel, für Substanz A die vermutete Struktur eines Triacontenyl-TMS-Ethers anzunehmen (Abb. 2.13b). Ende und Luftmann (1984) beschrieben analoge Reaktionsprodukte nach der Derivatisierung kurzkettiger Aldehyde ( $\leq \text{C}_8$ ) mit MSTFA (*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid) und wiesen darauf hin, dass Gemische aus *cis-trans*-isomeren Alkenyl-TMS-Ethern resultierten. Dabei wurden jedoch keine Angaben über die gaschromatographischen Eigenschaften dieser Produkte angeführt. In den Extrakten der Reaktionsansätze des Triacontanal mit MTBSTFA konnte hingegen zwei klar getrennte Substanzpeaks mit identischen Massenspektren detektiert werden. Diese Beobachtung wies zusätzlich auf das Vorhandensein einer Doppelbindung in den resultierenden Derivaten hin. Es erscheint plausibel, dass die Konformationsisomere unter den gegebenen gaschromatographischen Bedingungen auf Grund der verschiedenen Molekülgeometrie ein unterschiedliches Retentionsverhalten zeigen. Die gleiche Beobachtung wäre folglich für die Extrakte nach der Derivatisierung von Triacontanal mit BSTFA zu erwarten gewesen. Damit übereinstimmend, weisen die Spektren der Substanzen A und B (Abb. 2.3c) einerseits identische Fragmente auf, während das Spektrum der Substanz B jedoch zusätzliche Ionen zeigt. Aus einem Vergleich des Spektrums der Substanz B mit dem Spektrum der Substanz C (Abb. 2.3d) kann jedoch andererseits geschlossen werden, dass der Peak der Substanz B aus dem gleichzeitigen Eluieren zweier verschiedener Verbindungen resultiert. Demzufolge treten nach der Derivatisierung mit BSTFA insgesamt sechs neu entstandene Verbindungen auf, die paarweise identische Massenspektren zeigen. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den drei Substanzpaaren um Konformationsisomere und somit um Verbindungen mit einer C=C-Doppelbindung handelt.

## Substanz C

Das Massenspektrum der Substanz C (Abb. 2.3d) zeigte starke Ähnlichkeiten zum Spektrum des freien Triacontanal (vgl. Abb. 2.3a). Zum einen konnten im niedrigen Massenbereich die komplementären Fragmente der Ionenreihen  $[C_nH_{2n+1}]^+$  bzw.  $[C_nH_{2n-1}O]^+$  und die aldehyd-spezifischen Fragmente der Reihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$  gefunden werden. Zum anderen war im hohen Massenbereich ein Fragment  $m/z$  418 sichtbar, das im Spektrum des Triacontanal einer Elimination von Wasser entsprach. Diese Charakteristika wiesen daher auf das Vorhandensein einer Aldehyd-Untereinheit in der Verbindung hin. Zudem konnte das Vorhandensein einer C=C-Doppelbindung vermutet werden (s.o.) und die Aldehyd-Untereinheit wäre somit auf die Enol-Form des Triacontanal zurückzuführen. Die Spektren der Triacontenyl-TMS- bzw. *t*-BDMS-Ether zeigten analoge Ionen, denen auf der Aldehyd-Seite jeweils die gleiche Grundstruktur zugewiesen werden konnte (vgl. Abb. 2.13b, c). Diese Ionen waren zum einen das aus der Allylsplaltung resultierende Fragment und das Molekülion. Für die aus der Allylsplaltung resultierenden Fragmente konnte für die Aldehyd-Seite eine Grundstruktur  $CH_2=CHCH-$  der Masse 40 postuliert werden. Die entsprechende Grundstruktur der Molekülionen hätte die Form  $CH_3(CH_2)_{27}CH=CH-$  der Masse 419. Im Spektrum der Substanz C fanden sich zwei Ionen ( $m/z$  152 und  $m/z$  531), die gegenüber diesen Grundstrukturen eine um 112 amu erhöhte Masse aufwiesen (Abb. 2.3d). Diese Massendifferenzen stimmten dabei auffällig mit der Molekülmasse eines deprotonierten Trifluoracetamid (TFA) und somit dem Basismolekül von BSTFA überein (vgl. Abb. 2.13b). Es wurde daher vermutet, dass sich während der Derivatisierung ein Triacontenyl-trifluoracetamid-Addukt gebildet hatte. Durch allylische Spaltung wäre dann ein Fragment  $[CH_2=CHCH-(OCNHCF_3)]^+$  entstanden ( $m/z$  152) und  $m/z$  531 hätte demnach dem Molekülion entsprochen. Das Spektrum der Substanz C zeigte weiterhin ein Fragment  $m/z$  462  $[M-69]^+$ , während im niedrigen Massenbereich ein Ion  $m/z$  69 beobachtet werden konnte. Diese Fragmente könnten als komplementäre Spaltprodukte angesehen werden und auf die Abspaltung der  $CF_3$ -Gruppe hindeuten. Diese Fragmentierung ließe sich mit der Annahme vereinbaren, dass die TFA-Untereinheit über den Stickstoff an die Triacontenyl-Untereinheit gebunden war und so ein sekundäres Amid (*N*-Triacontenyl-trifluoracetamid) resultierte (Abb. 2.13b). Die Spaltung beiderseits der Carbonyl-Gruppe wird dabei als wichtigste Einzelfragmentierung von Amiden beschrieben (Seibl 1970). Im Falle des hier vermuteten *N*-Triacontenyl-trifluoracetamid würde eine dieser Fragmentierungen zu  $m/z$  462  $[CH_3(CH_2)_{27}CH=CHNHCO]^+$  und mit der Ladung auf der abgespaltenen  $CF_3$ -Gruppe zu  $m/z$  69 führen.



Um die Vermutung eines Triacontenyl-TFA-Adduktes zu überprüfen, wurde Triacontanal in einem weiteren Ansatz mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) derivatisiert (Abb. 2.13d). Der resultierende Extrakt wies zwei Paare von Substanzpeaks mit identischen Massenspektren auf, wodurch jeweils auf das Vorhandensein von C=C-Doppelbindungen geschlossen werden kann.

Da BSA auf der einen Seite in gleicher Weise wie BSTFA TMS-Gruppen auf hydroxylhaltige Verbindungen überträgt, war die Bildung homologer Produkte in beiden Ansätzen zu erwarten. Die Spektren eines Substanzpaares des BSA-Ansatzes waren identisch mit dem Spektrum der Substanz A aus den Reaktionsansätzen mit BSTFA (vgl. Abb. 2.3b) und bestätigen daher die Bildung *cis-trans* isomerer Triacontenyl-TMS-Ether (Abb. 2.13b, 2.13d).

Auf der anderen Seite trägt BSA eine CH<sub>3</sub>-Gruppe an der Acetamid-Untereinheit und unterscheidet sich dadurch von BSTFA, das an gleicher Position eine CF<sub>3</sub>-Gruppe trägt. Im Vergleich zu den vermuteten TFA-Addukten, sollte der Austausch von drei Fluoratom gegen drei Wasserstoffatome daher zu Massendifferenzen von 54 amu in analogen Fragmenten und Ionen führen. In den Massenspektren des zweiten Substanzpaares des BSA-Ansatzes waren die für Aldehyde typischen Fragmente der Reihe [C<sub>n</sub>H<sub>2n-2</sub>]<sup>+</sup> sichtbar und somit eine Triacontenyl-Untereinheit wahrscheinlich (Abb. 2.4b). Daneben stimmten die Ionen *m/z* 98 und *m/z* 477 mit der Vorhersage einer Massendifferenz von 54 amu überein. Diese Ionen entsprechen demnach einem durch allylische Spaltung entstandenem Fragment [CH<sub>2</sub>=CHCH-(OCNHCH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> bzw. dem Molekülion (vgl. Abb. 2.13b, c). Weiterhin zeigten die Spektren der BSA-Derivate ein Fragment *m/z* 462 ([M-15]<sup>+</sup>), wie es auch im Spektrum des TFA-Adduktes zu finden war. In Analogie zum TFA-Addukt, deutete dieses Fragment auf eine Bindung der Acetamid-Untereinheit über den Stickstoff hin. Diese Annahme wurde im Spektrum des BSA-Derivates durch den Basispeak *m/z* 60 bekräftigt. Dieses Fragment würde dabei der Elimination eines protonierten Acetamid unter doppelter H-Umlagerung entsprechen, wie sie als charakteristisch für einige sekundäre und tertiäre Amide beschrieben wird (Seibl 1970; McLafferty und Tureček 1993).

Die Analogien zwischen den Spektren des Triacontanal (Abb. 2.3a) und dessen BSTFA- und BSA-Derivate (Abb. 2.3c und 2.4b) sowie deren Retentionsverhalten ließen es daher plausibel erscheinen, für Substanz C ein *cis-trans* isomeres *N*-Triacontenyl-trifluoracetamid anzunehmen (Abb. 2.13b). Damit konnte neben den *cis-trans* isomeren Triacontenyl-TMS-Ethern eine zweite Klasse von Reaktionsprodukten des Triacontanal mit BSTFA identifiziert werden. Während analoge Reaktionsprodukte der TMS-Ether bereits bekannt waren (Ende

und Luftmann 1984; Little 1999), stellt das Isomeren-Paar des *N*-Triacontenyltrifluoracetamid eine bisher unbeschriebene Form von Reaktionsprodukten eines Aldehydes mit BSTFA dar.

#### Substanzen D und E

Neben den bisher beschriebenen Nebenprodukten konnte in Einzelfällen ein weiteres Substanzpaar mit identischen Massenspektren gefunden werden (Abb. 2.2b, 2.3e). Little (1999) wies darauf hin, dass einige Derivatisierungsreagenzien mehrere verschiedene Addukte mit Aldehyden bilden können. Dabei wurden entweder einzelne oder alle Untereinheiten des Reagenzes an den Carbonyl-Kohlenstoff gebunden. Die Spektren der Substanzen D und E ließen sich jedoch mit keiner dieser oder anderer möglicher Strukturen in Einklang bringen. Dieses Substanzpaar konnte nach einer Behandlung mit BSTFA ausschließlich in Lösungen des Triacontanal-Standards, nicht jedoch in Extrakten kutikulärer Wachse gefunden werden. Von einer Strukturaufklärung wurde in dieser Arbeit daher abgesehen.

Zusammengefasst zeigen die Befunde der verschiedenen Experimente, dass während der Behandlung von Triacontanal mit BSTFA neue Verbindungen entstehen und sich diese zum einen aus dem Aldehyd und zum anderen aus Untereinheiten des Derivatisierungsreagenzes zusammensetzen. Dies bedeutet jedoch, dass die messbare Menge an freiem Aldehyd in den entsprechenden Lösungen reduziert wird. Sollten derartige Reaktionen auch bei der Behandlung von Extrakten kutikulärer Wachse stattfinden, wäre eine Quantifizierung dieser Substanzklasse ausschließlich anhand der freien Moleküle mit Fehlern behaftet. Es musste daher geprüft werden, ob sich diese Reaktionsprodukte auch in Lösungen der Gleit-zonenwachse von *Nepenthes* finden lassen.

#### 2.4.2 Derivatisierung kutikulärer Wachse von *Nepenthes* mit BSTFA

In Extrakten kutikulärer Wachse von *N. alata* konnte anhand des charakteristischen Massenspektrums eindeutig das Vorhandensein von freiem Triacontanal nachgewiesen werden. Die entsprechenden BSTFA-Derivate zeigten in den Experimenten mit synthetischem Triacontanal ein charakteristisches Retentionsverhalten (vgl. Abb. 2.2a). In Übereinstimmung damit konnten in den Extrakten von *N. alata* drei Substanzpeaks gefunden werden, deren Massenspektren identisch mit denen eines Triacontenyl-TMS-Ethers (Abb. 2.5a, e), eines *N*-Triacontenyl-trifluoracetamids (Abb. 2.5b, k) bzw. deren Mischpeak waren. Neben den Derivaten des Triacontanal wurden jedoch zusätzlich drei Reihen von Substanzpeaks

gefunden, deren Spektren im niedrigen Massenbereich identisch mit denen der vergleichbaren Triacontanal-Derivate waren (Abb. 2.5a, g). Im hohen Massenbereich der Spektren einer entsprechenden Reihe waren jedoch Ionen zu sehen, deren Massen mit zunehmender Retentionszeit um je 28 amu anstiegen (Abb. 2.5b-f, h-l). Daraus kann gefolgert werden, dass es sich hierbei um die Mitglieder homologer Reihen der entsprechenden Derivate von Aldehyd-Homologen mit geradzahlgiger Kettenlänge handelt. Ausgehend von den bekannten Moleküllionen und Fragmenten der Triacontanal-Derivate können die weiteren Mitglieder als entsprechende Derivate des Tetracosanal (Abb. 2.5b bzw. h), Hexacosanal (Abb. 2.5c bzw. i), Octacosanal (Abb. 2.5d bzw. j) und Dotriacontanal (Abb. 2.5f bzw. l) identifiziert werden. Die Abhängigkeit der Moleküllionen und  $M_{15}$ - bzw.  $M_{69}$ -Fragmente von der Kettenlänge, bei paralleler Unabhängigkeit der Fragmente im niedrigen Massenbereich sowie der Fragmente der Allylsplaltung, bestätigen dabei erneut die getroffenen Zuordnungen zu den Strukturen der Alkenyl-TMS-Ether bzw. *N*-Alkenyl-trifluoracetamide.

Die Befunde zeigen, dass Aldehyd-Homologe in kutikulären Wachsen während der Probenvorbereitung mit BSTFA zu neuen Verbindungen reagieren. Diese Reaktionen führen zwangsläufig zu einer Verringerung der messbaren Menge an freien Aldehyden. Eine korrekte Quantifizierung der Aldehyde in Extrakten kutikulärer Wachse ausschließlich anhand der freien Homologen ist daher nicht möglich. Anhand der Modellsubstanz Triacontanal wurde daher überprüft, wie hoch die Substanzverluste sind, inwieweit diese durch die Mengen neu entstandener Reaktionsprodukte erklärt werden können und ob die resultierende Mischung eine stabile Zusammensetzung aufweist.

#### 2.4.3 Wiederfindung von Triacontanal nach einer Behandlung mit BSTFA

Der quantitative Vergleich von Triacontanal-Lösungen vor und nach einer Behandlung mit BSTFA zeigte, dass substanzielle Mengen des freien Aldehyds mit BSTFA zu den sechs neuen Verbindungen reagierten. Wurde ausschließlich die Menge des freien Aldehyds betrachtet, konnten direkt nach der Behandlung stark schwankende Substanzverluste von ca. 30% des eingesetzten Materials beobachtet werden. Dieser Befund deckt sich mit früheren Experimenten, die Substanzverluste von 24% bis 53% innerhalb dieser Verbindungsklasse aufzeigten und eine reproduzierbare Quantifizierung von Aldehyden in derivatisierten Wachsmischungen ausschlossen (Naß et al. 1998). Es blieb jedoch unklar, worin die Ursachen der Substanzverluste lagen. Im Gegensatz dazu zeigte das vorliegende Experiment, dass sich die

Substanzverluste an freiem Aldehyd durch die entstandenen Derivatmengen erklären lassen. Wurden diese quantitativ erfasst, konnte mit guter Reproduzierbarkeit eine Wiederfindung von 92% erreicht werden. Im Vergleich dazu, konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass sich primäre Alkohole und Fettsäuren in Form der entsprechenden TMS-Ether zu ca. 89% bzw. 94% wiederfinden lassen (Naß et al. 1998). Im Allgemeinen wird die Derivatisierung dieser Substanzklassen mit BSTFA dabei trotz der Substanzverluste als verlässliche Methode zu Probenvorbereitung anerkannt.

Auf der anderen Seite zeigten die Experimente auch, dass die Quantifizierung von Aldehyden nur in einem zeitlich begrenzten Rahmen nach der Derivatisierung zu verlässlichen Ergebnissen führt. Die Aldehydmengen nahmen unabhängig von der Vorbehandlung über die Zeit ab. Die Analyse der Extrakte ergab jedoch keine Hinweise auf die Ursachen für diese Substanzverluste. Auf der einen Seite konnte weder ein Anstieg der Derivatmengen beobachtet werden, noch traten Verbindungen in den Extrakte auf, die auf eine Degradierung des Aldehyds hingewiesen hätten. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass insbesondere niedrigere Aldehyd-Homologe oligo- und polymere Strukturen bilden können, die in vergleichbarer Form auch für langkettige Aldehyde aus kutikulären Wachsen postuliert werden (vgl. Kap. 4). Würden solche Reaktionen auch während der Lagerung von Triacontanal auftreten, wären die resultierenden Strukturen auf Grund der hohen Molekülmassen gaschromatographisch nicht mehr nachweisbar. Das Ausmaß der Substanzverluste über die Zeit weist jedoch darauf hin, dass der Einfluss auf die quantitative Analyse kurz nach der Probenvorbereitung (ca. 1 Tag) vernachlässigbar ist.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Befunde, dass in synthetischer Lösung Aldehyde mit verschiedenen Untereinheiten des BSTFA reagieren und dabei bis zu sechs Derivate gebildet werden. Unter der Voraussetzung, dass die quantitative Analyse in zeitlich engem Zusammenhang mit der Derivatisierung steht, können die daraus resultierenden Substanzverluste an freiem Aldehyd durch die entstandenen Derivatmengen mit hoher Wiederfindung und Reproduzierbarkeit erklärt werden. Nur vier dieser Derivate werden auch in Extrakten kutikulärer *Nepenthes*-Wachse nach einer Behandlung mit BSTFA gefunden und können als Paare *cis-trans*-isomere Alkenyl-TMS-Ether und *N*-Alkenyl-trifluoracetamide identifiziert werden.

#### 2.4.4 Reaktionen von Aldehyden mit Komponenten der kutikulären Wachse von *N. alata* während der Behandlung mit BSTFA

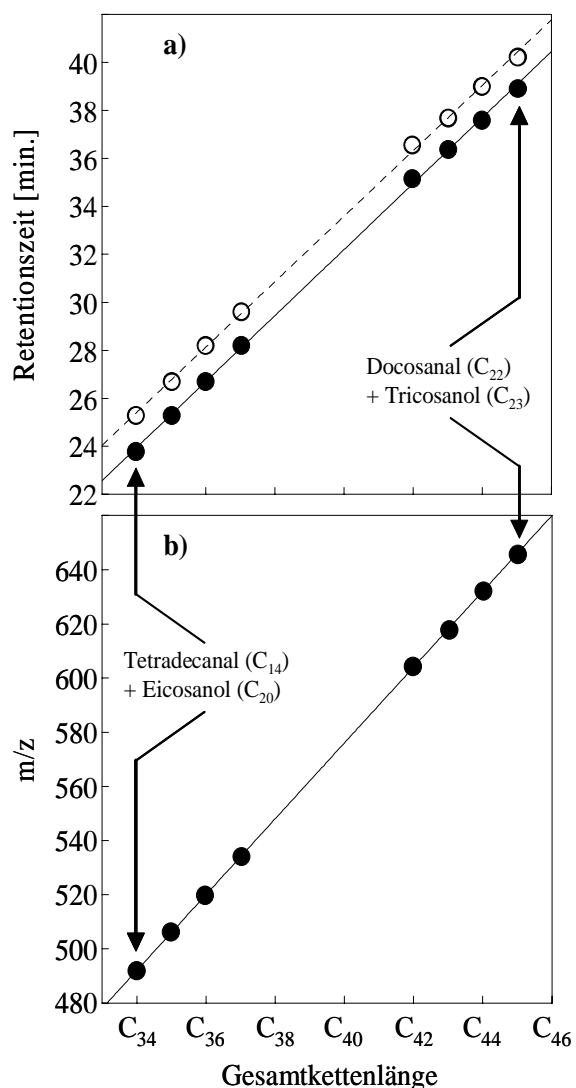
Die Analyse kutikulärer Wachsextrakte nach einer Behandlung mit BSTFA wies darauf hin, dass Aldehyde nicht nur mit dem Derivatisierungsreagenz, sondern auch mit Komponenten der kutikulären Wachse selbst reagieren können. Zusätzlich zu den Substanzpaaren der Alkenyl-TMS-Ether und *N*-Alkenyl-trifluoracetamide wurden zwei weitere Reihen von Substanzen gefunden, deren Fragmentierungsmuster einerseits paarweise nahezu identisch waren und andererseits im unteren Massenbereich charakteristische Fragmentreihen aufwiesen, wie sie sowohl in Spektren freier Aldehyde als auch in deren Derivaten mit BSTFA auftraten. Analog zu letzteren konnte daher vermutet werden, dass auch in diesen Verbindungen eine Aldehyd-Untereinheit vorhanden war, die zudem eine C=C-Doppelbindung beinhaltete. Im Unterschied zu den Derivaten mit BSTFA ähnelte das Retentionsverhalten jedoch dem sehr langkettiger, gesättigter Alkyl-Ester und die Ionen im hohen Massenbereich entsprachen nominell der elementaren Zusammensetzung von einfach ungesättigten Alkyl-Ethern oder -Estern. Im unteren Massenbereich fehlten jedoch sowohl die für gesättigte als auch ungesättigte Fettsäure-Ester charakteristischen Fragmente einer Olefin-Reihe (Seibl 1970). Es wurde daher vermutet, dass die ebenfalls in kutikulären Wachsen vorkommenden primären Alkohole an der Bildung dieser Verbindungen beteiligt waren.

#### 2.4.5 Reaktionsprodukte von synthetischen Aldehyden mit primären Alkoholen nach einer Behandlung mit BSTFA

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Aldehyde während einer Behandlung mit BSTFA mit primären Alkoholen reagieren, wurden Lösungen aus Kreuzkombinationen von Homologen unterschiedlicher Kettenlänge angesetzt. Um die Molekülgröße der vermuteten Produkte relativ gering zu halten und somit deren gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse zu erleichtern, wurden relativ kurzkettenige und kommerziell erhältliche Aldehyde (C<sub>14</sub> und C<sub>22</sub>) und Alkohole (C<sub>20</sub> bis C<sub>23</sub>) als Modellsubstanzen verwendet.

Zum einen fanden sich in den resultierenden Extrakten Derivatpaare der Aldehyde mit BSTFA, d.h. die entsprechenden Alkenyl-TMS-Ether und *N*-Alkenyl-trifluoracetamide. Zum anderen konnte jeweils ein Substanzpaar gefunden werden, dessen Retentionszeit sich mit zunehmender Kettenlänge sowohl des Aldehyds als auch des Alkohols erhöhte. Die Retentionszeiten homologer Verbindungen nehmen dabei linear zu, solange die gaschromato-

graphische Analyse bei linearem Temperaturanstieg durchgeführt wird (Kováts 1965). Die Retentionszeiten der Substanzpaare standen dementsprechend in linearem Zusammenhang mit der Gesamtkettenlänge der eingesetzten Edukte (Abb. 2.14a) und weisen somit darauf hin, dass sowohl je der Aldehyd als auch der Alkohol an der Bildung der homologen Verbindungen beteiligt ist. Analog zu den Derivaten mit BSTFA, lässt das Auftreten je eines Paares mit annähernd identischen Massenspektren vermuten, dass es sich hierbei um ungesättigte, *cis-trans* isomere Verbindungen handelt.



**Abb. 2.14** a) Retentionszeiten und b) Molekülmassen stereoisomerer Produkte aus der Reaktion synthetischer Aldehyde mit primären Alkoholen verschiedener Kettenlänge während einer Behandlung mit BSTFA in Abhängigkeit von der Gesamtkettenlänge der eingesetzten Edukte. Regressionsgeraden:

In a) gestrichelt:  $y=1,38 \cdot x-22,83$  ( $R^2=0,9995$ ;  $p \leq 0,001$ ) für erstes Isomer (geschlossene Punkte); durchgehend:  $y=1,36 \cdot x-20,99$  ( $R^2=0,9995$ ;  $p \leq 0,001$ ) für zweites Isomer (offene Punkte).

In b)  $y=16+14 \cdot x$  ( $R^2=1$ ;  $p=0$ ).

Die Fragmentierungsmuster der Verbindungen waren im unteren Massenbereich nahezu identisch mit denen freier Aldehyde und ähnelten stark denen der entsprechenden Alkenyl-TMS-Ether. Auf Grund dieser Ähnlichkeiten kann geschlossen werden, dass die Struktur der Aldehyd-Untereinheit in allen Fällen der Enol-Form des Aldehyds entspricht. Darüber hinaus zeigten die Spektren entsprechend der variierenden Kettenlängen sowohl der eingesetzten Aldehyde als auch der eingesetzten Alkohole im hohen Massenbereich Ionen, deren Masse mit zunehmender Gesamtkettenlänge und daher auch mit der Retentionszeit linear anstiegen (Abb. 2.14b). Auf Grund der jeweils gegebenen Kettenlängen der beteiligten Edukte, können diese Ionen ausschließlich einer elementaren Zusammensetzung  $C_nH_{2n}O$  und somit den Molekülionen von einfach ungesättigten Alkyl-Ethern zugeordnet werden. Weder gesättigte Alkyl-Ether ( $C_nH_{2n+2}O$ ), Alkyl-Ester ( $C_nH_{2n+2}CO_2$ ) oder einfach ungesättigte Alkyl-Ester ( $C_nH_{2n}CO_2$ ) noch mögliche Stickstoffverbindungen wie gesättigte oder ungesättigte Amine oder sekundäre Trifluoracetamide würden Ionen dieser Masse liefern.

Demgegenüber zeigten auf der einen Seite die Spektren aller Reaktionsprodukte des Tetradecanal ( $C_{14}$ ) bzw. Docosanal ( $C_{22}$ ), unabhängig von der Kettenlänge des beteiligten Alkohols, drei Fragmente ( $F'_1$ - $F'_3$ ) der Reihe  $[C_nH_{2n-2}]^+$  mit  $n \leq 14$  bzw.  $n \leq 22$ . Auf der anderen Seite fanden sich, unabhängig von der Kettenlänge des beteiligten Aldehyd, zwei Fragmente ( $F_1$  und  $F_2$ ) der Reihe  $[C_nH_{2n+1}]^+$  mit  $n \geq 20$  bei Eicosanol ( $C_{20}$ ),  $n \geq 21$  bei Heneicosanol ( $C_{21}$ ),  $n \geq 22$  bei Docosanol und  $n \geq 23$  bei Tricosanol. Die Fragmente  $F'_1$ - $F'_3$  lassen sich daher einer Aldehyd-Untereinheit und die Fragmente  $F_1$  und  $F_2$  einer Alkohol-Untereinheit zuordnen und bestätigen erneut deren Beteiligung an den resultierenden Reaktionsprodukten.

Die Fragmente  $F'_1$  und  $F'_2$  der Aldehyd-Untereinheit sind in Spektren der entsprechenden freien Aldehyde charakteristisch und entstehen dort durch die Elimination von Wasser und Ethen (Christiansen et al. 1969; Maccoll und Mruzek 1986). Sie treten ebenfalls deutlich in den Spektren der entsprechenden Alkenyl-TMS-Ether auf und entstehen dort durch die Elimination von Trimethylsilanol und Ethen. Im Unterschied dazu, tritt das Fragment  $F'_3$  in Spektren freier Aldehyde kaum auf und würde nominell einer weiteren Elimination von Ethen (28 amu) entsprechen. Die Analogien jedoch weisen erneut auf eine Bindung der Aldehyd-Untereinheit über einen Ether-Sauerstoff hin.

Demzufolge ließen sich die Fragmente  $F_1$  der Alkohol-Untereinheiten Alkylfragmenten zuordnen, die durch heterolytische Spaltung der C-O-Bindung entstanden sind (Seibl 1970). Die Fragmente  $F_2$  hingegen entsprechen nominell einer um Ethen höheren Masse. Zusammen mit den Fragmenten  $F'_3$  der Aldehyd-Untereinheiten, könnte dies auf intermolekulare Umlagerungen von Ethen während der Fragmentierung hinweisen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Aldehyde und primäre Alkohole während einer Behandlung mit BSTFA zu neuen Verbindungen reagieren. Das Retentionsverhalten und die Molekülionen dieser Reaktionsprodukte und die Analogien zu den Fragmentierungsmustern freier Aldehyde und Alkenyl-TMS-Ethern legen den Schluss nahe, dass es sich hierbei um *cis-trans* isomere Alkenyl-Alkyl-Ether handelt. Während schon frühere Berichte auf Substanzverluste an Aldehyden während der Probenvorbereitung mit BSTFA hinwiesen (Markstädter 1994, Schmidt 2000), kann hier erstmals gezeigt werden, dass auch primäre Alkohole in Nebenreaktionen chemisch gebunden werden.

---

#### 2.4.6 Reaktionsprodukte von Aldehyden mit primären Alkoholen in kutikulären Wachsen von *N. alata* nach einer Behandlung mit BSTFA

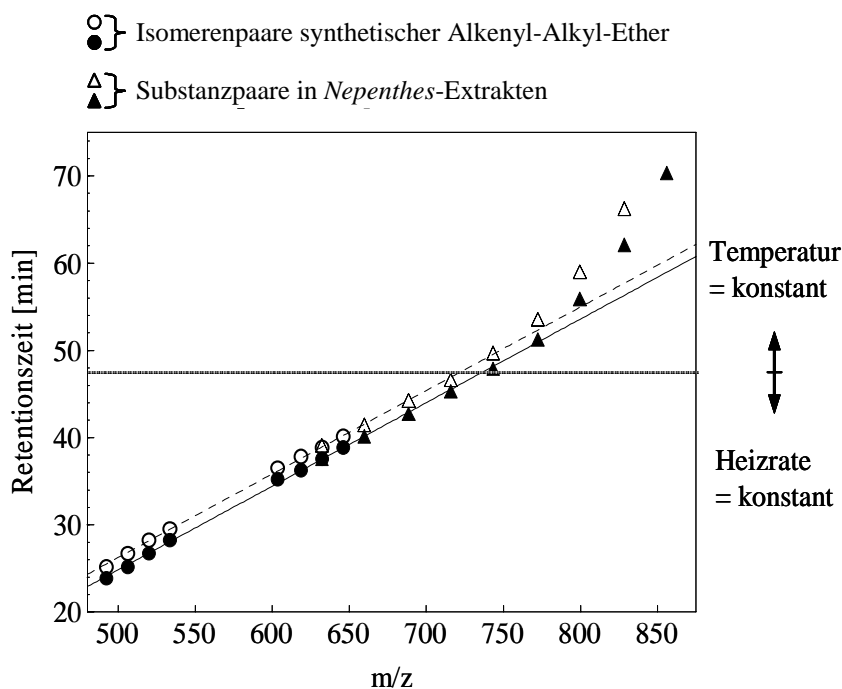
Die Massenspektren der Substanzpaare in Extrakten kutikulärer Wachse von *N. alata* waren denen der synthetischen Alkenyl-Alkyl-Ether in zahlreichen Merkmalen sehr ähnlich. Die niedrigen Massenbereiche waren nahezu identisch und wiesen daher ebenfalls auf die Beteiligung einer Aldehyd-Untereinheit in der Enol-Form hin. Das Auftreten jeweils eines Substanzpaares mit identischen Massenspektren lässt sich daher erneut auf das Vorliegen *cis-trans* isomerer Verbindungen zurückführen. In den hohen Massenbereichen waren in Abhängigkeit von der Retentionszeit des entsprechenden Substanzpaares Ionen mit zunehmender Masse der elementaren Zusammensetzung  $C_nH_{2n}O$  erkennbar. Während der gaschromatographischen Analyse im Bereich des linearen Temperaturanstieges standen die Retentionszeiten sowohl der Substanzpaare in *Nepenthes*-Extrakten als auch der synthetischen Alkenyl-Alkyl-Ether in einem linearen Zusammenhang mit der Masse (Abb. 2.15). Dies weist auf die Homologie zwischen diesen Verbindungen hin, so dass die Ionen im hohen Massenbereich als Molekülionen angesehen werden können. Nach einer Retentionszeit von ca. 50 min. wurde die Analyse bei konstanter Temperatur fortgeführt, so dass sich die Zeitintervalle zwischen den folgenden Substanzpaaren stetig vergrößerten. Anhand des Retentionsverhaltens und der Molekülionen können somit die in *Nepenthes*-Extrakten auftretenden Substanzpaare als homologe Alkenyl-Alkyl-Ether der Gesamtkettenlänge von  $C_{44}$  bis  $C_{60}$  angesprochen werden.

Die mittleren Massenbereiche der Spektren dieser Alkenyl-Alkyl-Ether waren durch zwei Ionenserien gekennzeichnet, deren elementare Zusammensetzung mit denen der synthetischen Verbindungen übereinstimmte. Im Unterschied zu den synthetischen Alkenyl-Alkyl-Ethern zeigten diese Serien jedoch breitere Intensitätsverteilungen, deren Maxima sich mit zunehmender Retentionszeit des entsprechenden Substanzpaares zu höheren Massen verschoben. Daraus kann geschlossen werden, dass in einzelnen Substanzpeaks mehrere strukturisomere Ether gleicher Gesamtkettenlänge coeluieren, und dass an deren Zusammensetzung wechselnde Anteile verschiedener Aldehyd- bzw. Alkohol-Homologer beteiligt sind.

Daraus folgt jedoch auch, dass die in den Alkenyl-Alkyl-Ethern gebundenen Homologen der quantitativen Analyse entzogen sind und die ursprüngliche Zusammensetzung vor der Behandlung anhand ausschließlich der freien Homologen nicht bewertet werden kann. Es musste daher ein Verfahren entwickelt werden, das eine Berechnung der in den Ethern gebundenen Mengen erlaubte.

---





**Abb. 2.15** Retentionszeiten sowohl von Isomerenpaaren synthetischer Alkenyl-Alkyl-Ether als auch von Substanzpaaren in Extrakten kutikulärer Wachse von *N. alata* in Abhängigkeit von der Molekülmasse. Regressionsgerade für Isomer I (geschlossene Symbole):  $y=0,10 \cdot x-23,04$  (gestrichelt;  $R^2 = 0,9994$ ,  $p \leq 0,001$ , mit  $y < 47,75$ ). Regressionsgerade für Isomer II (offene Symbole):  $y=0,10 \cdot x-21,59$  (durchgehend;  $R^2 = 0,9996$ ,  $p \leq 0,001$ , mit  $y < 47,75$ ).

#### 2.4.7 Quantifizierung der in Alkenyl-Alkyl-Ethern gebundenen Alkohol- und Aldehyd-Mengen

Eine detaillierte massenspektrometrische Analyse der synthetischen Alkenyl-Alkyl-Ether zeigte, dass sich die Kettenlängen der beteiligten Untereinheiten anhand von zwei diagnostischen Fragmentreihen eindeutig bestimmen lassen. Die Ionen traten dabei innerhalb der beiden Reihen unabhängig von den jeweiligen Kettenlängen in konstanten Intensitätsverhältnissen auf. Im Gegensatz zu den synthetischen Verbindungen aus je einem Homologen definierter Kettenlänge, können in Wachsextrakten Alkenyl-Alkyl-Ether einer bestimmten Gesamtkettenlänge auch aus der Kombinationen von Untereinheiten verschiedener, jedoch komplementärer Kettenlänge resultieren. Diese strukturisomeren Verbindungen wurden unter den gaschromatographischen Bedingungen auf Grund ihres relativ symmetrischen Molekülaufbaus nicht getrennt. Bestehen die Untereinheiten aus Homologen relativ ähnlicher Kettenlänge, zeigen die Massenspektren der resultierenden Mischpeaks folglich Überlagerungen der diagnostischen Fragmentreihen von mehreren Isomeren. Für die quantitative Analyse der beteiligten Komponenten wurde vorausgesetzt, dass die Strukturisomeren einer

Gesamtkettenlänge in gleichem Ausmaß ionisiert werden. Die Gesamtintensität eines bestimmten Fragmentes setzt sich demnach summarisch aus den Intensitäten der entsprechenden Fragmente einzelner Isomere zusammen (vgl. Abb. 2.10a). Basierend auf den Analysen der Intensitätsverhältnisse in den Spektren der synthetischen Docosenyl-Alkyl-Ether, konnten daher die Anteile der an einer Isomerenmischung beteiligten homologen Aldehyde und Alkohole bestimmt und somit deren absoluten Mengen berechnet werden. Die durch dieses Verfahren ermittelten Gesamtmengen an beteiligten Komponenten waren dabei weitgehend identisch mit denen durch Integration bestimmten Substanzmengen an Alkenyl-Alkyl-Ethern. Die lineare Regressionsgerade mit einer Steigung von annähernd 1 und einem Durchgang nahe des Ursprungs verdeutlichte dabei die Konsistenz des Verfahrens (vgl. Abb. 2.11). Durch diese Verfahren ist es daher möglich, die Substanzverluste an freien Aldehyd- und Alkohol-Homologen durch die Bildung der Alkenyl-Alkyl-Ether zu quantifizieren und somit zur Bestimmung der ursprünglichen Zusammensetzung der Wachsextrakte beizutragen.

Zusammenfassend bestätigte dieses Kapitel der vorliegenden Arbeit, dass die quantitative Analyse kutikulärer Wachse nach einer Behandlung mit BSTFA problematisch sein kann. Es konnte gezeigt werden, dass substanzelle Mengen freier Aldehyde einerseits mit BSTFA und andererseits mit einer Komponente der Wachsmischung selbst reagieren. Diese Nebenreaktionen verringern dabei die messbare Menge der freien Homologen und erklären frühere Beobachtungen, dass eine reproduzierbare Quantifizierung von Aldehyden nach einer Behandlung mit BSTFA nicht möglich sei (Markstädter 1994; Riederer und Markstädter 1996; Naß et al. 1998). Zwar wurde bereits in diesen Berichten auf die Möglichkeit hingewiesen, dass während der Behandlung unerwünschte Nebenreaktionen auftreten könnten, die Strukturen und Mengen potentieller Produkte blieben jedoch unklar.

Die vorliegende Arbeit hingegen identifizierte anhand synthetischer Komponenten je ein Paar *cis-trans* isomerer Alkenyl-TMS-Ether und *N*-Alkenylacetamide als Reaktionsprodukte von Aldehyden mit verschiedenen Untereinheiten des Derivatisierungsreagenzes. Während analoge Reaktionen, die zur Bildung von Alkenyl-TMS-Ethern führen bereits bekannt waren (Ende und Luftmann 1984), stellen die hier identifizierten *N*-Alkenylacetamide bisher unbeschriebene Nebenprodukte der Aldehyde mit BSTFA dar. Es wurde gezeigt, dass die Derivate auch während der Probenvorbereitung von Extrakten kutikulärer Wachse entstehen und die resultierenden Substanzverluste an freien Aldehyd-Homologen dadurch in ausreichender Annäherung erklärt werden können. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass Aldehyde während der Probenvorbereitung mit primären Alkoholen zu Paaren *cis-trans*

---

isomerer Alkenyl-Alkyl-Ether reagieren können. Mit Hilfe synthetischer Standards konnte ein Verfahren entwickelt werden, das die Quantifizierung der gebundenen Mengen einzelner Homologer beider Substanzklassen erlaubt.

Sämtliche Derivate, die während einer Behandlung kutikulärer Wachse von *N. alata* entstehen, können in der gaschromatographischen Analyse getrennt erfasst und die Mengen darin gebundener Komponenten quantitativ den entsprechenden Mengen freier Aldehyd- und Alkohol-Homologen zugerechnet werden. Entgegen früheren Beobachtungen konnte daher gezeigt werden, dass eine reproduzierbare, quantitative Analyse aldehyd-haltiger Extrakte auch nach einer Behandlung mit BSTFA möglich ist.

Es bleibt jedoch weitgehend unklar, welche Reaktionsmechanismen und Reaktionsbedingungen der Derivat-Bildung während der Behandlung mit BSTFA zugrunde liegen. Die Entstehung der Alkenyl-TMS-Ether kann dabei höchstwahrscheinlich auf die Tautomerisierung der Aldehyde in die Enol-Form mit anschließender Silylierung der resultierenden Hydroxyl-Gruppen zurückgeführt werden (Ende und Luftmann 1984). Im Allgemeinen werden Enol-Silyl-Ether als reaktive Verbindungen beschrieben, die als Intermediate vielfachen Einsatz in organischen Synthesen finden (Rasmussen 1977; Kopka und Rathke 1981; Tirpak und Rathke 1982; Brownbridge 1983). Da alle weiteren Derivate ebenfalls als Paare *cis-trans* isomerer Verbindungen auftraten, könnte deren Bildung von den TMS-Ethern ausgegangen sein. Auf der anderen Seite wurden jedoch auch zahlreiche Reaktionen beschrieben, in denen verschiedene Derivatisierungsreagenzien direkt an den Aldehyd addieren (Ende und Luftmann 1984; Little 1999). Derartige oder analoge Produkte konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht identifiziert werden. Die stark variierenden Derivatmengen wiesen zudem darauf hin, dass sich schon geringe Veränderungen der Reaktionsbedingungen auf deren Bildung auswirken.

Die Problematik bei der Quantifizierung von Aldehyden nach einer Behandlung mit BSTFA war schon lange bekannt und es wurden daher zahlreiche Verfahren zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen getestet. Jedoch führten auch alternative Derivatisierungsmethoden, wie die Überführung der Aldehyde in die entsprechenden *O*-Pentafluorobenzyl-oxime (Markstädter 1994), *O*-Methyloxime (Vogh 1971) oder *N,N*-Dimethylhydrazone (McDaniel und Howard 1985) nicht zu befriedigenden Resultaten. Naß et al. (1998) entwickelten daher eine Methode zur Vortrennung kutikulärer Wachse mittels Festphasenextraktion, aus der eine aldehyd-haltige Fraktion resultierte, die ohne Derivatisierung analysiert werden konnte. Parallel dazu wurden die Fraktionen mit hydroxyl-haltigen

---

---

Verbindungen mit BSTFA derivatisiert und getrennt analysiert. Dies führte auf der einen Seite zwar zu einer höheren Anzahl zu analysierender Proben, für Probenmengen von insgesamt 200-500 µg konnten jedoch auch Aldehyde verlässlich quantifiziert werden (Naß et al. 1998). Jedoch kann im Allgemeinen davon ausgegangen werden, dass sich die Probenmenge während der Vorbereitung für die Analyse mit jedem zusätzlichen Aufbereitungsschritt verringert. Stehen auf Grund der angewandten Präparationsmethoden ausreichende Mengen kutikulärer Wachse zur Verfügung, stellt die Festphasenextraktion (Naß et al. 1998) eine zuverlässige Methode zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen von Aldehyden dar.

Für die meisten Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung, wurden kutikuläre Wachse durch eine Extraktion ganzer Pflanzen oder Pflanzenteile mit organischen Lösungsmitteln gewonnen (Holloway 1984; Walton 1990; Bianchi 1995). Diese Methoden lieferten einerseits zwar hohe Ausbeuten an kutikulären Komponenten, besaßen jedoch bezüglich der Pflanzenoberfläche nur eine beschränkte räumliche (laterale und transversale) Auflösung. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es jedoch, die kutikulären Wachse der Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten mit möglichst hoher räumlicher Auflösung zu präparieren und anschließend zu analysieren (vgl. Kap. 3). Vorversuche dazu hatten ergeben, dass die resultierenden Probenmengen stark limitiert sind und zusätzliche Aufbereitungsschritte daher zu vermeiden waren. Die Befunde dieses Kapitels führten daher zu der Entscheidung, die kutikulären Wachse der Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten direkt mit BSTFA zu derivatisieren und die resultierenden Extrakte auf die beschriebene Weise zu analysieren.

---

---

### 3 Zusammensetzung und Struktur kutikulärer Wachse von *N. alata*, *N. albomerginata* und *N. intermedia*

#### 3.1 Einleitung

In den vergangenen Jahren zeigten zahlreiche Untersuchungen, dass rutschige Pflanzenoberflächen bedeutende Rollen in zahlreichen Pflanzen-Insekten-Interaktionen spielen können. Dabei setzen epikutikuläre Wachskristalle auf verschiedenen Oberflächen die Haft- und Bewegungsfähigkeit von Insekten herab oder verhindern diese sogar (Stork 1980b; Eigenbrode et al. 1996; Federle et al. 1997). Die Mechanismen die diesem verbreiteten Phänomen zugrunde liegen blieben bis lang jedoch weitgehend unverstanden, da die physikalisch-chemischen Eigenschaften der beteiligten biologischen Materialien nicht mit ausreichender Genauigkeit untersucht werden konnten. Für die chemische Analyse pflanzlicher Oberflächensubstanzen wurden kutikuläre Wachse in der Regel durch Extraktion ganzer Organe in organischen Lösungsmitteln gewonnen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Lösungsmittel nicht nur Substanzen epikutikulärer Wachskristalle mobilisierten, sondern auch in die Kutikula eindringen und intrakutikuläres Material freigesetzt wurde (Jetter et al. 2000). Obwohl derartige Extraktionsexperimente die nötige Selektivität für oberflächennahe Substanzen fehlen ließen, konnte indirekt auf die Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle geschlossen werden. Das Vorkommen bestimmter Komponenten korrelierte dabei mit charakteristischen Kristallformen auf verschiedenen Pflanzenoberflächen (Übersichten in Jeffree et al. 1976; Baker 1982; Jeffree 1986). Daraus wurde folgerichtig geschlossen, dass diese Komponenten, welche die entsprechenden Wachsmischungen in der Regel dominierten, verantwortlich für die Ausbildung der Kristalle waren. So wurde z.B. die Bildung glattrandiger Plättchen auf verschiedenen Pflanzenarten und -organen dem Vorhandensein sehr langkettiger primärer Alkohole zugeschrieben (Hallam und Chambers 1970; Barthlott et al. 1998).

Um diese Schlussfolgerungen zu bekräftigen und um beurteilen zu können, ob auch Nebenkompenten an der Bildung beteiligt sind, muss die Zusammensetzung der Kristalle direkt ermittelt werden. Dazu müssen jedoch die extraktiven Methoden durch mechanische Beprobungsstrategien ersetzt werden. Ensikat et al. (2000) haben gezeigt, dass durch die Verwendung von Kryo-Klebstoffen Wachskristalle von Pflanzenoberflächen entfernt und anschließend auf künstliche Substrate übertragen werden können. Dabei blieben die Form und Anordnung der Kristalle vollständig erhalten. Jedoch wurde weder die beprobte Fläche noch

---

---

die chemische Zusammensetzung quantifiziert und die Belegung mit epikutikulären Wachskristallen konnte daher nicht beurteilt werden. Eine ähnliche Kryo-Klebstoff-Methode wurde verwendet, um selektiv den glatten Wachsfilm von *Prunus laurocerasus* Blättern zu gewinnen (Jetter et al. 2000). Diese Methode erlaubte erstmalig eine getrennte Quantifizierung der Belegung aller epi- und intrakutikulären Wachsbestandteile. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich die chemische Zusammensetzung des epikutikulären Wachsfilms erheblich von der darunter liegenden intrakutikulären Wachsmischung unterscheidet. Basierend auf diesen quantitativen Ergebnissen konnte die Selektivität anderer Beprobungstechniken getestet werden. Daraufhin wurde Gummi arabicum als alternativer Klebstoff für die selektive Entfernung epikutikulärer Wachsfilme etabliert (Jetter und Schäffer 2001). Es wurden folglich mehrere Methoden für die mechanische Beprobung epikutikulärer Wachse beschrieben, die bisher aber noch nie für die chemische Analyse epikutikulärer Wachskristalle angewandt wurden.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die strukturellen und chemischen Eigenschaften der epikutikulären Wachskristalle auf den Gleitzonenoberflächen verschiedener *Nepenthes*-Arten zu untersuchen. Daher sollten Methoden zur mechanischen Präparation der Kristalle etabliert und durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen kontrolliert werden. Dazu mussten bereits vorhandene methodische Ansätze angepasst und geprüft werden, ob

- (1) epikutikuläre Wachskristalle selektiv präpariert werden können und deren chemische Zusammensetzung getrennt von intrakutikulären Bestandteilen analysiert werden kann.
- (2) epikutikuläre Wachsbestandteile quantitativ präpariert werden können und somit eine selektive Analyse intrakutikulärer Wachse möglich ist.
- (3) sämtliche Wachsbestandteile quantitativ erfasst und somit Aussagen über die Verteilung einzelner Bestandteile zwischen den kutikulären Kompartimenten getroffen werden können.

Diese Aspekte sollten zunächst beispielhaft an den Gleitzonenoberflächen von *N. alata* bearbeitet werden. Die geeigneten Methoden sollten dann angewendet werden, die strukturellen und chemischen Eigenschaften der rutschigen Oberflächen von zwei weiteren Arten (*N. albomarginata* und *N. intermedia*) vergleichend zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen ziehen zu können.

---

---

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Pflanzenmaterial

Alle Individuen von *Nepenthes alata* Blanco, *Nepenthes albomarginata* und *Nepenthes intermedia* stammten aus einer kontinuierlichen Gewächshauskultur des Botanischen Gartens der Universität Würzburg. Die Kannen wurden direkt vor der Beprobung geerntet. Durch Zerschneiden des Übergangs der Ranke zur Kanne wurde das Organ von der Pflanze getrennt. Dabei konnte die Flüssigkeit aus seinem Inneren abgelassen werden, ohne mit der Oberfläche der Gleitzone in Kontakt zu kommen. Die Kannen wurden der Länge nach aufgeschnitten und mit der Kanneninnenseite nach oben flächig auf einer Gummimatte befestigt. Mit Hohlbohrern (1,46 cm oder 1,56 cm Innendurchmesser) wurden runde Blattscheiben aus der Kannenwand ausgestanzt und ohne weitere Behandlung weiterverwendet.

### 3.2.2 Herstellung der Gummi arabicum Lösung

Das kommerziell erhältliche Gummi arabicum Pulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde vor dem Gebrauch drei Stunden in 100 ml Chloroform (99,9%; Roth, Karlsruhe, Deutschland) soxhlett-extrahiert. In einem Probengläschen wurden dann 1 mg des Pulvers mit 1 ml deionisiertem Wasser überschichtet, luftdicht verschlossen und das Gläschen zwei Tage ruhig stehen gelassen. In dieser Zeit konnte sich eine luftblasenfreie Lösung bilden, die bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

### 3.2.3 Mechanische Wachspräparationen

#### 3.2.3.1 Gefrorenes Wasser als Klebstoff: Kryo-Methode

Die Blattscheiben wurden in runde Vertiefungen einer Aluminiumplatte mit entsprechendem Innendurchmesser gelegt. Die Oberfläche der Kanneninnenseite war dabei nach oben gerichtet. Auf die Blattscheiben wurden Hohlzylinder (1,28 cm bzw. 1,38 cm Innendurchmesser) aus Plastik gestellt. Die Zylinder wurden solange mit deionisiertem Wasser befüllt, bis die freien Oberflächen der Blattscheiben völlig bedeckt waren. Der gesamte Aufbau wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt, bis das Wasser in allen Zylindern vollständig gefroren war. In diesem Zustand wurden die Zylinder mit den darin eingefrorenen Eisblöcken und daran

---

---

anhaftendem Wachs von den Blattscheiben abgehoben (Abb. 3.1). Durch schnelles Erwärmen der Zylinderwände rutschten die Eisblöcke aus diesen heraus und konnten direkt in ein Zweiphasengemisch aus je 4 ml Chloroform und deionisiertem Wasser überführt werden. Dabei wurden die Präparationen von vier bis sechs Blattscheiben derselben Kanne vereinigt und *n*-Tetracosan als interner Standard zugegeben. Das Zweiphasengemisch wurde unter mehrfachem kräftigem Schütteln auf ca. 40°C erwärmt. Die organische Phase wurde abgezogen und die verbliebene wässrige Phase noch zweimal mit je 4 ml Chloroform ausgeschüttelt. Alle drei Lösungen wurden vereinigt und der Extrakt für die chemische Analyse vorbereitet (Kap. 3.2.5). Der gesamte Vorgang wurde fünfmal hintereinander an den Oberflächen derselben Blattscheiben durchgeführt und die Extrakte getrennt analysiert.

### 3.2.3.2 Gummi arabicum als Klebstoff

Die wässrige Gummi arabicum Lösung wurde mit einem Pinsel auf ein rund gebogenes Drahtgewebe (1,6 cm Durchmesser) aus Edelstahl (1,18 mm Maschenweite, 0,09 mm Drahtdurchmesser; Bückmann, Mönchengladbach, Deutschland) aufgetragen. Das so vorbehandelte Drahtgewebe wurde dann auf einer Blattscheibe gleichen Durchmessers zentriert und die Gummi arabicum Lösung für 2 Stunden bei 25°C getrocknet. Der ausgehärtete Gummi arabicum Film, zusammen mit anhaftendem Wachs, wurde mit dem Drahtgewebe von den Blattscheiben abgehoben (Abb. 3.1) und direkt in ein Zweiphasengemisch aus je 4 ml Chloroform und deionisiertem Wasser überführt. Die Präparationen von vier bis sechs Blattscheiben derselben Kanne wurden vereinigt und *n*-Tetracosan als interner Standard zugegeben. Die Trennung der organischen von der wässrigen Phase erfolgte auf gleiche Weise, wie für die Kryo-Methode beschrieben (s.o.). Die Präparation wurde viermal hintereinander an den Oberflächen derselben Blattscheiben durchgeführt und die Extrakte getrennt analysiert. Das Edelstahldrahtgewebe wurde nach jeder Präparation mehrfach in Wasser gewaschen, getrocknet und anschließend mit Chloroform gespült und konnte so mehrfach für Präparationen genutzt werden.

---



### 3.2.4 Extraktion kutikulärer Wachse

#### 3.2.4.1 Nachextraktion

Anschließend an die mechanischen Wachspräparationen wurden die verbliebenen kutikulären Wachse mit warmem Chloroform (ca. 40°C) extrahiert. Dazu wurden Glaszylinder (1,0 cm bzw. 1,4 cm Innendurchmesser) mit leichtem Druck auf die mechanisch behandelten Oberflächen der Blattscheiben gepresst und die Zylinder zweimal mit je 1 ml Chloroform für 30 s befüllt (Abb. 3.2). Die beiden Lösungen wurden vereinigt, *n*-Tetracosan als interner Standard zugegeben und der Extrakt für die chemische Analyse vorbereitet (Kap. 3.2.5).

#### 3.2.4.2 Gesamtwachsextraktion

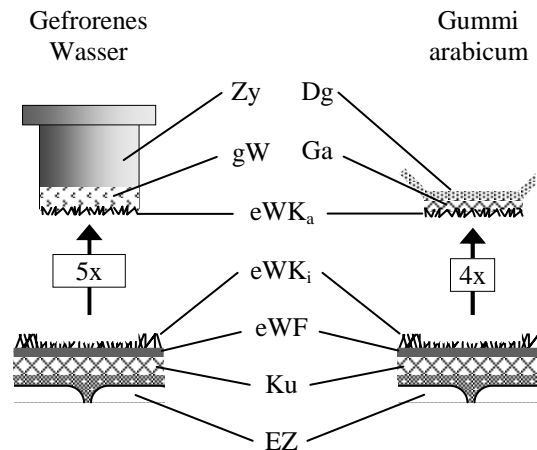
Die Gesamtheit an löslichen kutikulären Wachsen wurde nach der gleichen Methode extrahiert, wie für die Nachextraktion beschrieben (s.o.). Dafür wurden jedoch 4-5 unbehandelte Blattscheiben verwendet. Der Extraktionsvorgang (Abb. 3.2) wurde fünf mal hintereinander an den Oberflächen derselben Blattscheiben vorgenommen und die fünf Extrakte getrennt für die chemische Analyse vorbereitet (Kap. 3.2.5).

### 3.2.5 Probenvorbereitung und chemische Analyse

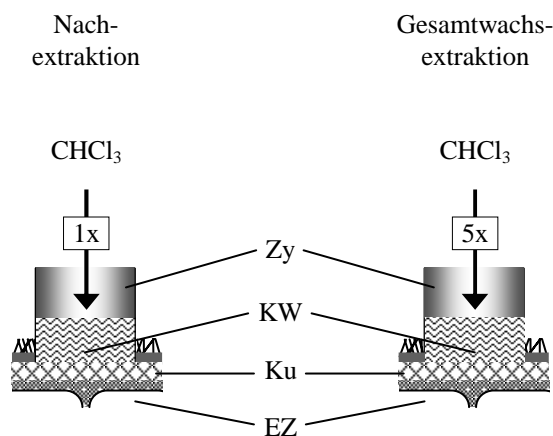
Vor der gaschromatographischen Analyse wurde aus allen Proben das Chloroform unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom und Heizen der Probengläschen auf 50°C verdampft. Danach wurden alle Proben mit 10 µl *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA; Macherey-Nagel, Düren, Germany) in 10 µl Pyridin für 30 min. bei 70°C behandelt. Anschließend wurden die Gemische in je 100 µl Chloroform aufgenommen.

Die qualitative bzw. quantitative Zusammensetzung aller Proben wurde unter den in Kap. 2.2.5 beschriebenen gaschromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen nach der GC-MS-Methode 1 bzw. GC-FID-Methode 2 (Tab. 2.1) untersucht. Einzelkomponenten wurden gegen den internen Standard durch manuelle Integration der Peakflächen quantifiziert (Kap. 2.2.6). Zur Quantifizierung der einzelnen Homologen primärer Alkohole wurden die in Reaktionsprodukten aus Aldehyden und Alkoholen gebundenen Mengen zu denen der entsprechenden freien Homologen addiert (vgl. Kap. 2.3.7). Zur Quantifizierung der einzelnen Aldehyd-Homologen wurden die in Reaktionsprodukten aus Aldehyden und

Alkoholen gebundenen Mengen, sowie die Mengen der Reaktionsprodukte mit BSTFA und die Mengen der entsprechenden freien Homologen addiert (vgl. Kap. 2.3.7).



**Abb. 3.1** Schematischer Aufbau für die mechanische Präparation epikutulärer Wachskristalle von den Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten. Gefrorenes Wasser (gW) oder Gummi arabicum (Ga) als Klebstoff werden auf kreisförmige Flächen mit definiertem Durchmesser aufgebracht. Die Klebstoffe mit darin eingebetteten, intakten epikutulären Wachskristallen (eWK<sub>i</sub>) werden anschließend mit Hilfe eines Zylinders (Zy) bzw. Drahtgewebes (Dg) entfernt. Die abgebrochenen epikutulären Wachskristalle (eWK<sub>a</sub>) werden dann für die chemische Analyse vorbereitet. Die Präparation wird mit gW fünfmal und mit Ga viermal wiederholt. eWF: epikutulärer Wachsfilm; EZ: Epidermiszelle; Ku: Kutikula.



**Abb. 3.2** Schematischer Aufbau zur Extraktion kutikulärer Wachse (KW). Zylinder (Zy) mit definiertem Innendurchmesser werden entweder auf zuvor mechanisch behandelte (Nachextraktion) oder auf unbehandelte Flächen (Gesamtwachsextraktion) gepresst. Für eine Extraktion werden die Zylinder zwei mal für 30 s mit warmem (ca. 40°C) Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) befüllt. Der Vorgang findet bei der Nachextraktion einmal statt und wird für eine Gesamtwachsextraktion fünfmal wiederholt. EZ: Epidermiszelle; Ku: Kutikula.

### 3.2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse von Oberflächen in Aufsicht wurden Proben von Blattscheiben vor bzw. nach den verschiedenen Behandlungen auf Aluminiumträgern befestigt und ein bis drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Herstellung von Querbrüchen durch die Epidermis wurden unbehandelte Blattscheiben in flüssigem Stickstoff eingefroren und manuell in mehrere Stücke gebrochen. Direkt im Anschluss wurden die Gewebestücke in einem Lyophilisator für ca. 15 h gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-2; Christ, Osterende, Deutschland). Sämtliche Proben wurden dann unter verringertem Druck in Argon-Atmosphäre mit einer ca. 20 nm dicken Gold-Palladiumschicht besputtert (Bal-Tec SCD005 Sputter Coater, 25 mA, 300 s; Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Schichtdicke war dabei für die verwendete Beschleunigungsspannung (15 kV) des Rasterelektronenmikroskops (Zeiss DSM 962; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) optimiert.

### 3.2.7 Statistische Verfahren

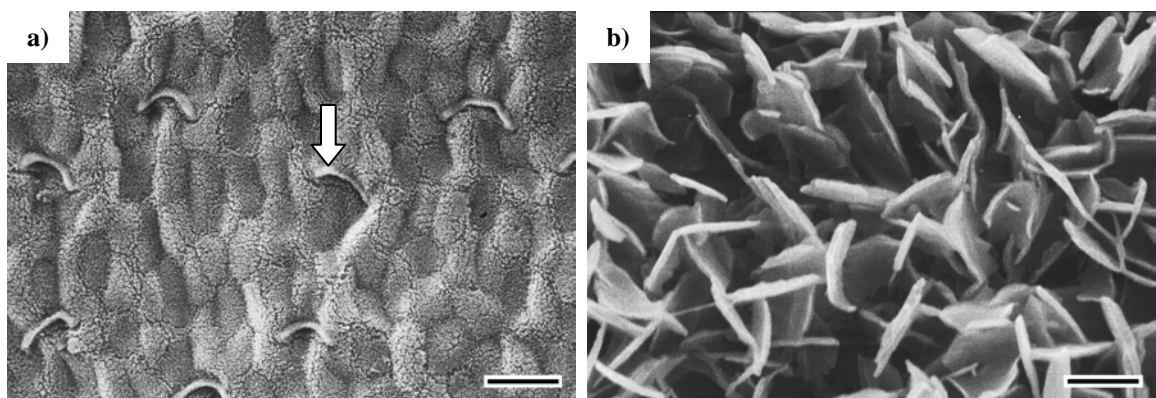
Zur Beurteilung der Effizienz der Methoden zur mechanischen Entfernung kutikulärer Wachse wurden lineare Regressionsfunktionen (Statistica 6.0; StatSoft, Tulsa, USA) an die absoluten Ausbeuten der entsprechenden Präparationsschritte angepasst. Für das Anpassungsverfahren wurde die kleinste Summe der quadrierten Abweichungen als Verlustfunktion verwendet. Die Charakterisierung der Extraktionsexperimente erfolgte durch Anpassung exponentieller Regressionsfunktionen an die absoluten Ausbeuten der entsprechenden Extraktionsschritte. Als Verlustfunktion wurde die kleinste Summe der quadrierten Abweichungen mit der Quasi-Newton-Methode (Statistica 6.0) als Schätzverfahren verwendet.

---

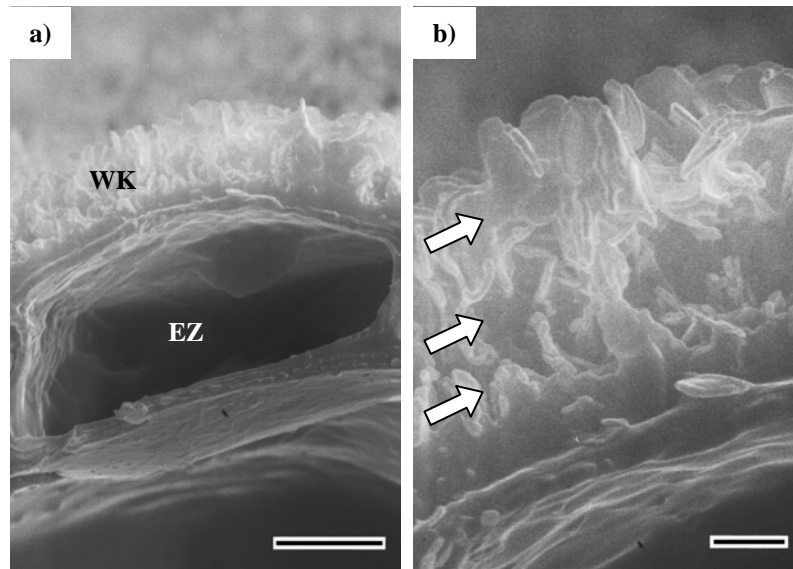
### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Rasterelektronenmikroskopie nativer Oberflächen der Gleitzzone von *N. alata* Kannen

Um die Form und räumliche Anordnung der epikutikulären Wachskristalle der Gleitzzone zu charakterisieren, wurden unbehandelte Oberflächen von *N. alata* Kannen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Bei relativ geringer Vergrößerung (200-fach) waren andeutungsweise die Umriss der Epidermiszellen sowie die halbmondförmigen Schließzellen sichtbar. Die gesamten Oberflächen aller Zellen waren mit einer rauen Schicht aus Wachsstrukturen überzogen (Abb. 3.3a). Bei stärkerer Vergrößerung (10000-fach) zeigten die Wachsstrukturen einen dichten Besatz aus plättchenförmigen Kristallen, die aufrecht auf der Oberfläche standen und deren schmale Seiten auf das Lumen der Kanne hin ausgerichtet waren (Abb. 3.3b). Die einzelnen Kristalle besaßen ebene Ränder und waren ca. 1  $\mu\text{m}$  lang und 0,1  $\mu\text{m}$  dick. In der Ausrichtung der leicht gekrümmten Plättchen war keine Vorzugsrichtung zu erkennen, wodurch sich ein zufälliges Muster aus kleinen Hohlräumen bildete. Die in Aufsicht erkennbaren Kristalle waren dabei nicht direkt den Epidermiszellen aufgelagert, sondern von weiteren Wachsstrukturen unterlagert (Abb. 3.4a). Diese insgesamt ca. 3-4  $\mu\text{m}$  mächtige kristalline Schicht bildete ein Netzwerk sich stellenweise durchdringender und miteinander verbundener Plättchen, das seine Dichte über die Höhe der Schicht veränderte (Abb. 3.4b). Distal und proximal zur Zelle fanden sich stark strukturierte Bereiche, die von einer Region mit geringerer Dichte an Konturen unterbrochen waren.



**Abb. 3.3** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten Gleitzzone einer Kanne von *N. alata*. a) Die Oberfläche ist durch umgewandelte Schließzellen (Pfeil) und eine lückenlose Belegung mit epikutikulären Wachskristallen charakterisiert. b) Die epikutikulären Wachskristalle bilden ein dichtes Netzwerk aus sich durchdringenden Plättchen. Schwarze Balken = 50  $\mu\text{m}$  (a), 1  $\mu\text{m}$  (b).



**Abb. 3.4** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Gefrierbruchs durch die Gleitzzone einer *N. alata* Kanne. a) Die epikutikulären Wachskristalle (WK) sind den Epidermiszellen (EZ) als ca. 3-4  $\mu\text{m}$  dicke Schicht aufgelagert. b) Innerhalb der epikutikulären Kristallschicht sind Bereiche mit unterschiedlichen Konturdichten erkennbar (Pfeile). Schwarze Balken = 5  $\mu\text{m}$  (a), 1  $\mu\text{m}$  (b).

### 3.3.2 Effizienz und rasterelektronenmikroskopische Kontrolle der mechanisch-chemischen Methoden zur Präparation kutikulärer Wachse

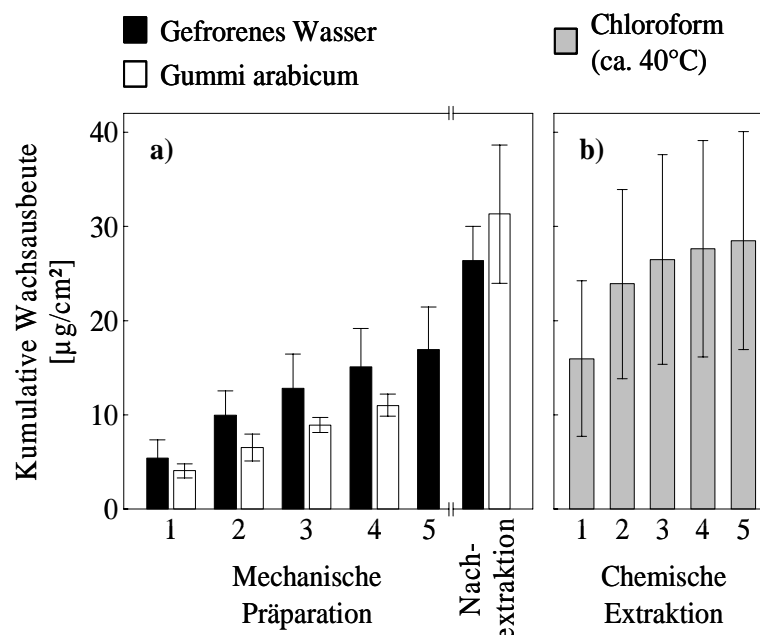
In einem ersten Experiment sollte kutikuläres Wachs durch die Verwendung von gefrorenem Wasser als Kryo-Klebstoff mechanisch von einer definierten Oberfläche der Gleitzzone entfernt und danach chemisch analysiert werden. Diese Präparationen konnten fünfmal an denselben Oberflächen wiederholt werden, ohne das darunter liegende Gewebe zu beschädigen. In der rasterelektronenmikroskopischen Kontrolle waren keine Beschädigungen der Kutikula oder der epidermalen Zellen sichtbar.

Die Wachsausbeute sank stetig von 5,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei der ersten Präparation auf 1,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei der Fünften. Insgesamt konnten so 16,9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs mechanisch von der beprobten Fläche entfernt werden (Abb. 3.5a). Eine an die Ausbeuten der aufeinander folgenden Präparationen angepasste lineare Regressionsfunktion ( $y = -0,94x + 6,22$ ) zeigte, dass nur 0,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs von einer sechsten Präparation hätten erwartet werden können. Weitere mechanische Präparationen hätten keine zusätzlichen Wachsmengen geliefert. Stattdessen, wurde dieselbe Fläche nun mit Chloroform behandelt. Diese Extraktion mobilisierte weitere 9,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  an Wachsmaterial. Die Gesamtausbeute stieg damit auf 26,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs (Abb. 3.5a).

In einem zweiten Experiment wurde Gummi arabicum als Klebstoff für die mechanische Entfernung des Wachses verwendet. Auf Grund der langen Trocknungszeit zwischen den aufeinander folgenden Präparationsschritten, konnte diese Behandlung nur vier mal an derselben Oberfläche durchgeführt werden, ohne das ebenfalls austrocknende Gewebe zu beschädigen.

Die Wachsausbeute sank linear von  $4,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei der ersten Präparation auf  $2,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei der Vierten. Mit Gummi arabicum konnten so insgesamt  $11,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs mechanisch entfernt werden (Abb. 3.5b). Durch eine lineare Regressionsfunktion ( $y=-0,60x+4,27$ ) konnte abgeschätzt werden, dass durch drei weitere mechanische Präparationsschritte zusätzlich  $1,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs hätten gewonnen werden können. Eine anschließende Behandlung derselben Fläche mit Chloroform setzte  $20,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs frei. Die Gesamtausbeute summierte sich damit auf  $31,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs (Abb. 3.5a) und unterschied sich nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test:  $P>0,05$ ) von der Gesamtausbeute aus dem ersten Experiment mit gefrorenem Wasser.

Die Ergebnisse zeigen, dass gefrorenes Wasser ein effizienterer Klebstoff zur mechanischen Entfernung kutikulärer Wachse ist als Gummi arabicum. Die Ausbeuten der einzelnen Präparationsschritte waren mit gefrorenem Wasser stets höher als mit Gummi arabicum und die Präparationen konnte häufiger an derselben Oberfläche durchgeführt werden. Im



**Abb. 3.5** Kumulative Wachsausbeuten aus drei verschiedenen methodischen Ansätzen zur Präparation kutikulärer Wachse von Gleitzonen in *N. alata* Kannen. a) Zuerst wurden die Wachse durch fünffache Behandlung mit gefrorenem Wasser als Klebstoff (N=5) oder vierfache Behandlung mit Gummi arabicum als Klebstoff (N=4) von den Oberflächen entfernt. Den mechanischen Präparationen folgte eine chemische Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C). b) Zur Bestimmung der Gesamtbelegung, wurde das Wachs durch fünf aufeinander folgende Oberflächenextraktionen (N=4) mit warmem Chloroform (ca. 40°C) entfernt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

---

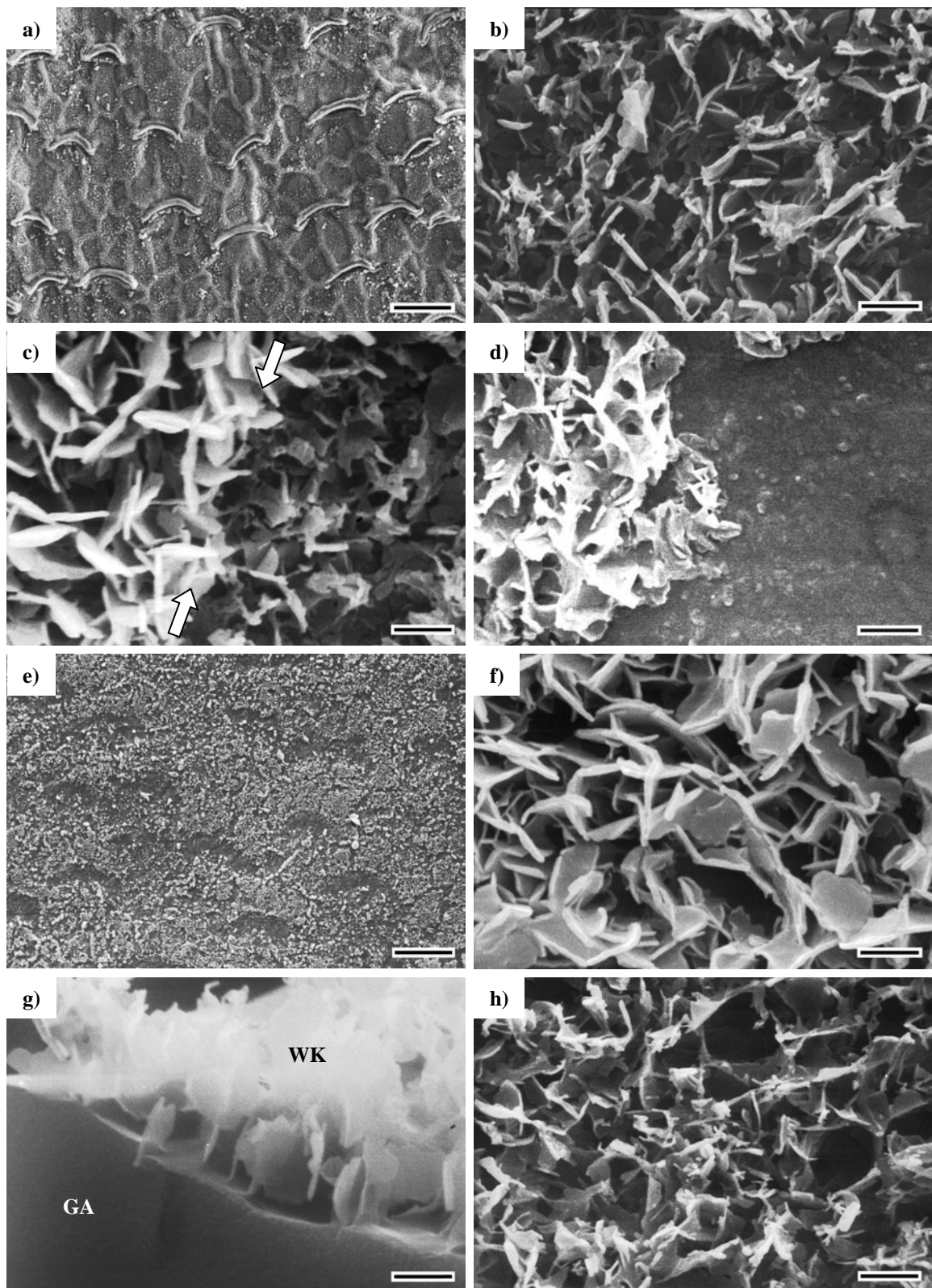
Vergleich der Gesamtausbeuten der entsprechenden Experimente ließen sich mit gefrorenem Wasser insgesamt mehr Wachse mechanisch entfernen (68%) als mit Gummi arabicum (33%).

#### Rasterelektronenmikroskopische Kontrolle

Parallel zur chemischen Analyse der entfernten Wachskristalle, wurden die Effekte auf die mechanisch behandelten Kannenoberflächen rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Bereits nach der ersten Behandlung mit gefrorenem Wasser oder Gummi arabicum waren Teile der Schicht aus Wachsstrukturen großflächig entfernt (Abb. 3.6a). Die antiklinale Zellwände der durch die Lufttrocknung eingefallenen Epidermiszellen traten nun deutlich hervor. Statt der glattrandigen Plättchen waren nun Strukturen mit unregelmäßigen Rändern sichtbar (Abb. 3.6b). An den Grenzlinien zwischen unbehandelten und behandelten Flächen zeigte sich, dass die ursprünglich vorhandenen Plättchen sehr viel höher waren als die nun sichtbaren Strukturen (Abb. 3.6c). Daraus konnte geschlossen werden, dass ausschließlich die äußersten Teile der Kristalle mit der ersten Klebstoffbehandlung abgebrochen wurden und die unregelmäßigen Ränder der zurückgebliebenen Plättchen die Bruchlinien darstellten. Weiterhin, wurde nach der fünften Präparation mit gefrorenem Wasser stellenweise eine glatte Oberfläche sichtbar (Abb. 3.6d). Die scharfe Abgrenzung der Flächen betonte wiederum zwei Schichten, in diesem Fall den deutlichen Unterschied zwischen den ausgefranzten Plättchen und der darunter liegenden glatten Oberfläche der Kutikula an sich.

Auch das mechanisch entfernte Material wurde rasterelektronenmikroskopisch charakterisiert. Dazu wurden die Kryo-Klebstoff Präparate nach dem Entfernen von der Pflanzenoberfläche auf Deckgläser überführt, was eine Betrachtung der distalen Teile der Kristalle erlaubte (Abb. 3.6e). Bis auf wenige Ausnahmen, blieben dabei sowohl die Form als auch die Anordnung der Kristalle untereinander weitgehend erhalten (Abb. 3.6f). Die proximalen Teile der entfernten Kristalle konnten auf der Unterseite des abgetragenen Gummi arabicum betrachtet werden (Abb. 3.6g). Dieses Material (Abb. 3.6h) zeigte eine hohe Ähnlichkeit mit den auf der Kannenoberfläche zurückgebliebenen Strukturen (vgl. Abb. 3.6b).

---



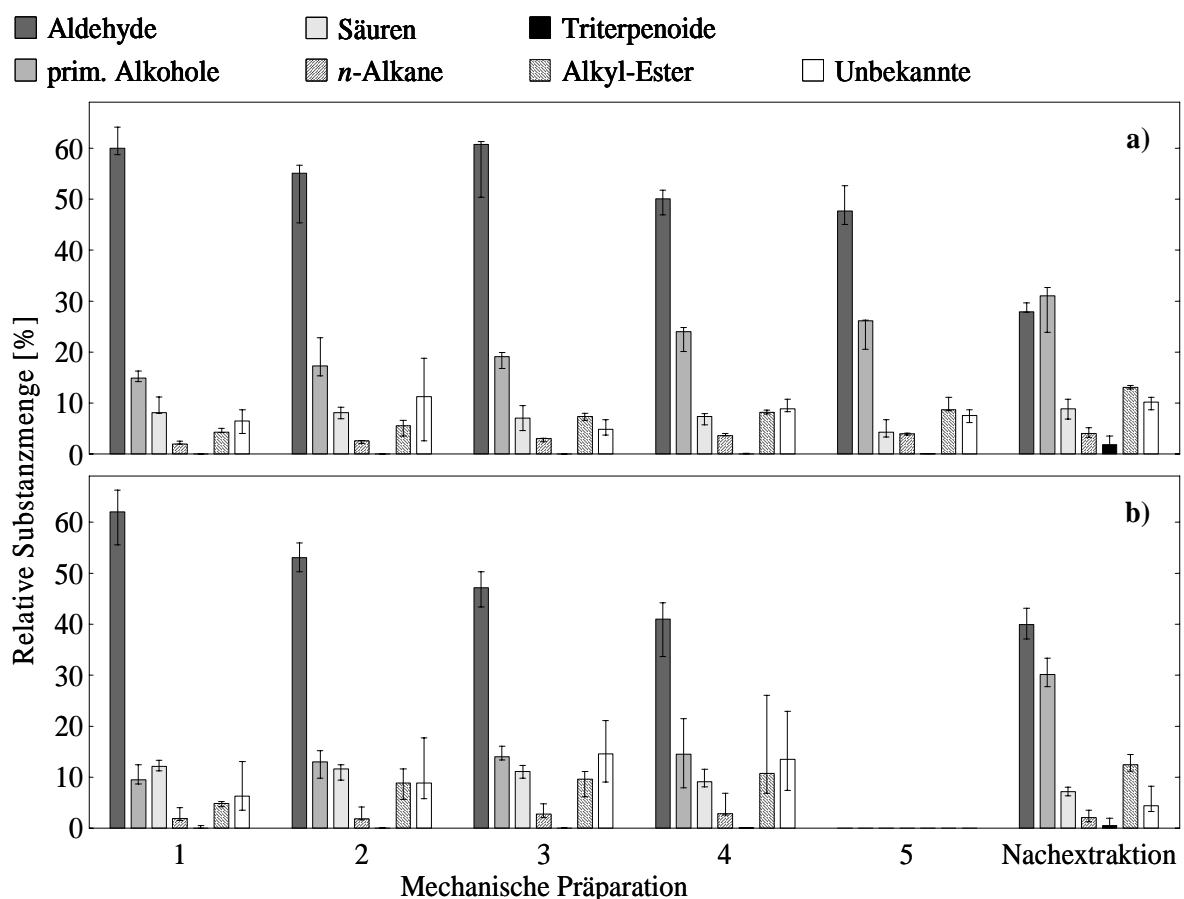
**Abb. 3.6** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gleitzonen von *N. alata* Kannen nach der ersten (a-c) und fünften (d) mechanischen Präparation epikutikulärer Wachskristalle und des mit gefrorenem Wasser (e, f) bzw. Gummi arabicum (g, h) präparierten Materials. a) Mit der ersten mechanischen Präparation werden die ursprünglich vorhandenen Plättchen großflächig entfernt. b) Die erste mechanische Präparation hinterlässt unregelmäßig geformte Wachsstrukturen. c) Grenzlinie (Pfeile) zwischen einer unbehandelten (links) und präparierten Fläche (rechts). d) Nach der fünften Präparation mit gefrorenem Wasser werden stellenweise glatte Oberflächen sichtbar (rechts). e) Mit gefrorenem Wasser präparierte und großflächig auf Glas deponierte Wachskristalle. f) Während der Präparation bleibt die Form und Anordnung der Kristalle weitgehend erhalten. g) Seitenansicht eines Gummi arabicum (GA) Präparats mit eingebetteten Wachskristallen (WK). h) Unterseite eines Gummi arabicum Präparates. Schwarze Balken = 50  $\mu\text{m}$  (a, e), 1  $\mu\text{m}$  (b-d, f-h).



3.3.3 Chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse von *N. alata*

## 3.3.3.1 Mechanische Präparationen mit gefrorenem Wasser und Gummi arabicum als Klebstoffe

Unabhängig von der Art des verwendeten Klebstoffes zeigten die Wachse der jeweils ersten Präparationsschritte identische Muster an Substanzklassen. Mit Ausnahme geringer Spuren pentazyklischer Triterpenoide, konnten nur unverzweigte und sehr langkettige aliphatische Komponenten gefunden werden (Abb. 3.7). Das Wachs bestand aus homologen Reihen primärer Alkohole ( $C_{20}$ - $C_{36}$ ), Fettsäuren ( $C_{20}$ - $C_{32}$ ), Alkyl-Estern ( $C_{38}$ - $C_{58}$ ) und *n*-Alkanen ( $C_{26}$ - $C_{36}$ ). Die bedeutendste Substanzklasse jedoch waren *n*-Aldehyde mit Kettenlängen von  $C_{20}$  bis  $C_{34}$  (Abb. 3.7). Deren Anteil betrug 60% (Abb. 3.7a) bzw. 62% (Abb. 3.7b) am Wachs der ersten Präparation mit gefrorenem Wasser bzw. Gummi arabicum.



**Abb. 3.7** Relative Substanzmengen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. alata* Kannen aus zwei verschiedenen methodischen Ansätzen zur mechanischen Präparation mit anschließender chemischer Extraktion. a) Erste bis fünfte mechanische Präparation mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und anschließende Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=5). b) Erste bis vierte mechanische Präparation mit Gummi arabicum als Klebstoff und anschließende Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C N=4). Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

Im Verlauf der mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser sank der Anteil der Aldehyde auf 48%, während die Anteile an primären Alkoholen und Alkyl-Estern stetig von 15% auf 26%, bzw. von 4% auf 9% anstiegen (Abb. 3.7a). Die Fettsäuren veränderten ihre Anteile von 8% kaum und zeigten nur im letzten Präparat eine Reduktion auf 4%. Alkane waren in allen mechanisch gewonnenen Wachsen in geringen Mengen und pentazyklische Triterpenoide nur in Spuren vertreten. Die Zusammensetzungen der Wachse aufeinander folgender Präparationen mit Gummi arabicum zeigten ähnliche Veränderungen, wie die der Präparationen mit gefrorenem Wasser (Abb. 3.7b). Der Anteil an Aldehyden nahm zu Gunsten der Alkohole und Alky-Ester ab, während Fettsäuren in annähernd gleichen Verhältnissen auftraten. Alkane trugen auch hier kaum, und Triterpenoide nicht zur Zusammensetzung bei.

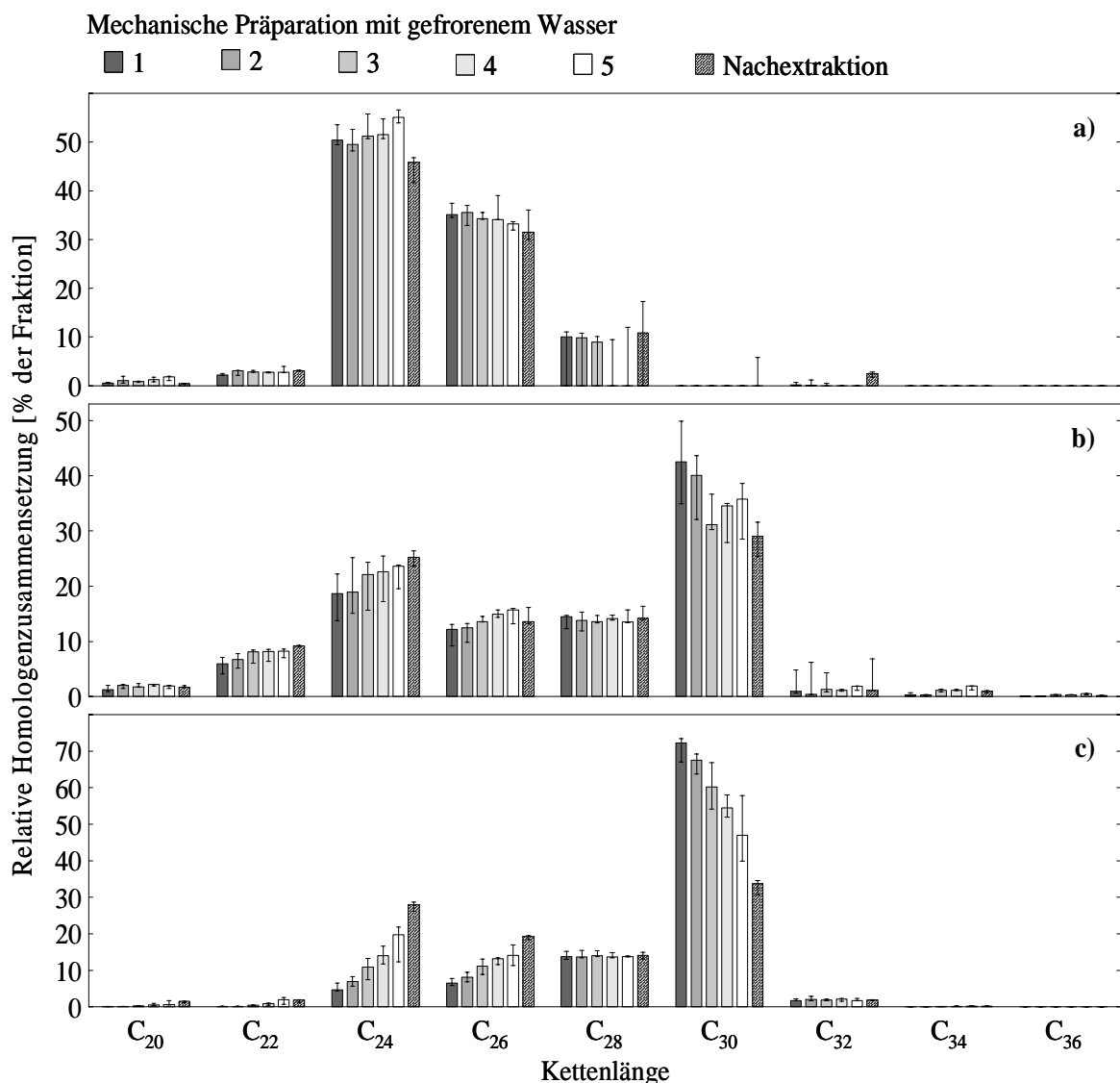
Mit Ausnahme der Alkane, dominierten Grundgerüste mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen (>95%) in allen aliphatischen Substanzklassen. Die Präparate aus der ersten Behandlung mit gefrorenem Wasser enthielten besonders hohe Anteile des C<sub>24</sub> Fettsäure-Homologen (Abb. 3.8a), während die primären Alkohole eine breite Kettenlängenverteilung mit Maxima bei C<sub>24</sub> und C<sub>30</sub> zeigten (Abb. 3.8b). Im Gegensatz dazu, war die homologe Reihe der Aldehyde durch ein ausgeprägtes Maximum bei Triacontanal (72% der Fraktion) charakterisiert (Abb. 3.8c). Dieses einzelne Homologe trug damit 43% zur gesamten präparierten Wachsmenge bei. Während die Homologenverteilungen der Säuren über die Präparationsschritte relativ unverändert blieben (Abb. 3.8a), ergaben sich insbesondere in der Aldehydfraktion starke Verschiebungen zu Kettenlängen <C<sub>28</sub> mit einem lokalen Maximum bei C<sub>24</sub> (Abb. 3.8c). Eine gleichartige, jedoch weniger stark ausgeprägte Verschiebung konnte auch in der Alkoholfraktion beobachtet werden (Abb. 3.8b).

Die Homologenmuster der drei dominierenden Substanzklassen im Wachs der ersten Präparation mit Gummi arabicum (Abb. 3.9) unterschieden sich nicht von denen der ersten Präparation mit gefrorenem Wasser (vgl. Abb. 3.8). In der Verteilung der Säuren war ein absolutes Maximum bei C<sub>24</sub> sichtbar (Abb. 3.9a), die Alkohole zeigten ein lokales Maximum bei C<sub>24</sub> und ein absolutes Maximum bei C<sub>30</sub> (Abb. 3.9b), während Triacontanal mit 71% die Aldehydfraktion klar dominierte (Abb. 3.9c). Die Verschiebung der Homologenverteilungen der Alkohole und Aldehyde zu Kettenlängen <C<sub>28</sub> war im Vergleich zu den Präparationen mit gefrorenem Wasser schwächer ausgeprägt (vgl. Abb. 3.8).

## 3.3.3.2 Chemische Extraktionen nach mechanischer Präparation

Nach erschöpfender mechanischer Entfernung der Wachse mit gefrorenem Wasser, wurde das verbliebene Wachs mit Chloroform gewonnen. Der resultierende Extrakt setzte sich zu 28% aus Aldehyden und relativ hohen Anteilen primärer Alkohole (31%) und Alkyl-Ester (13%) zusammen (Abb. 3.7a). Pentazyklische Triterpenoide waren in höheren Konzentrationen (2%) vertreten als in den entsprechenden mechanischen Präparationen.

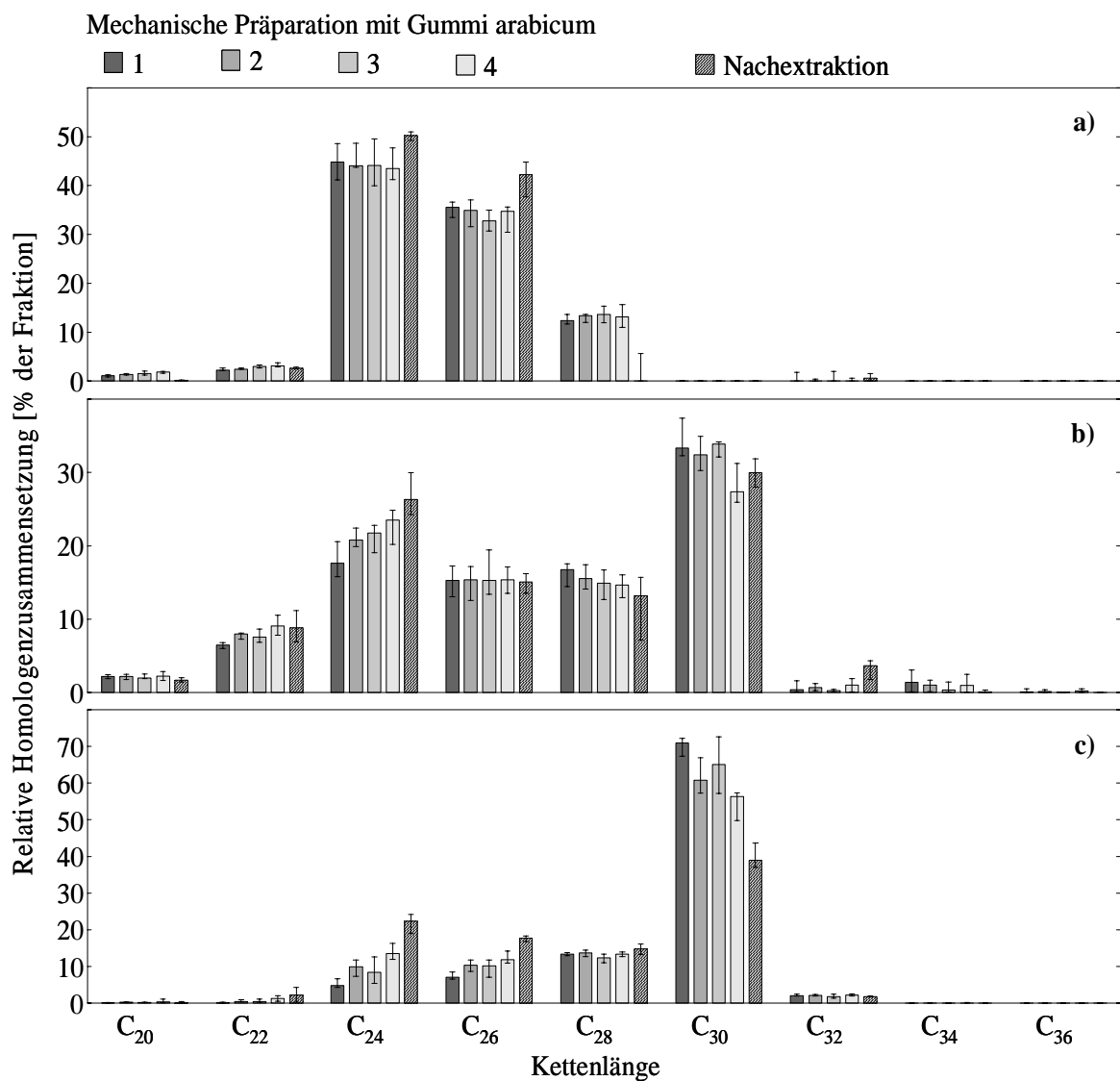
Während in der Fettsäurefraktion das Verteilungsmuster im extrahierten Wachs leicht zu höheren Kettenlängen verschoben war (Abb. 3.8a), nahmen im Vergleich zu den mechanisch gewonnenen Wachsen in der Alkohol- und Aldehydfraktion Homologe mit Kettenlängen  $<C_{28}$



**Abb. 3.8** Relative Homologenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. alata* Kannen aus fünf aufeinander folgenden mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und anschließender Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=5). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

zu (Abb. 3.8b, c). Insbesondere die Verteilung der Aldehyd-Homologen zeigte ein ausgeprägtes lokales Maximum bei  $C_{24}$  (28% der Fraktion, Abb. 3.8c). Obwohl auch hier Triacontanal das Homologe mit dem größten Anteil darstellte (34% der Fraktion), trug es nur mit 9% zum gesamten Extrakt bei.

Nach wiederholten Behandlungen mit Gummi arabicum, beinhaltete der entsprechende Chloroformextrakt 40% Aldehyde (Abb. 3.7b), während die Anteile der anderen Substanzklassen in beiden Nachextraktionen ähnlich waren (Abb. 3.7a, b). Die Verschiebung innerhalb der Aldehyde zu Kettenlängen  $<C_{28}$  (Abb. 3.9c) mit einem lokalen Maximum bei  $C_{24}$  (22% der Fraktion) und einem absoluten Maximum bei  $C_{30}$  (39% der Fraktion) war weniger ausgeprägt als nach der Behandlung mit gefrorenem Wasser (vgl. Abb. 3.8c). Somit zeigt der

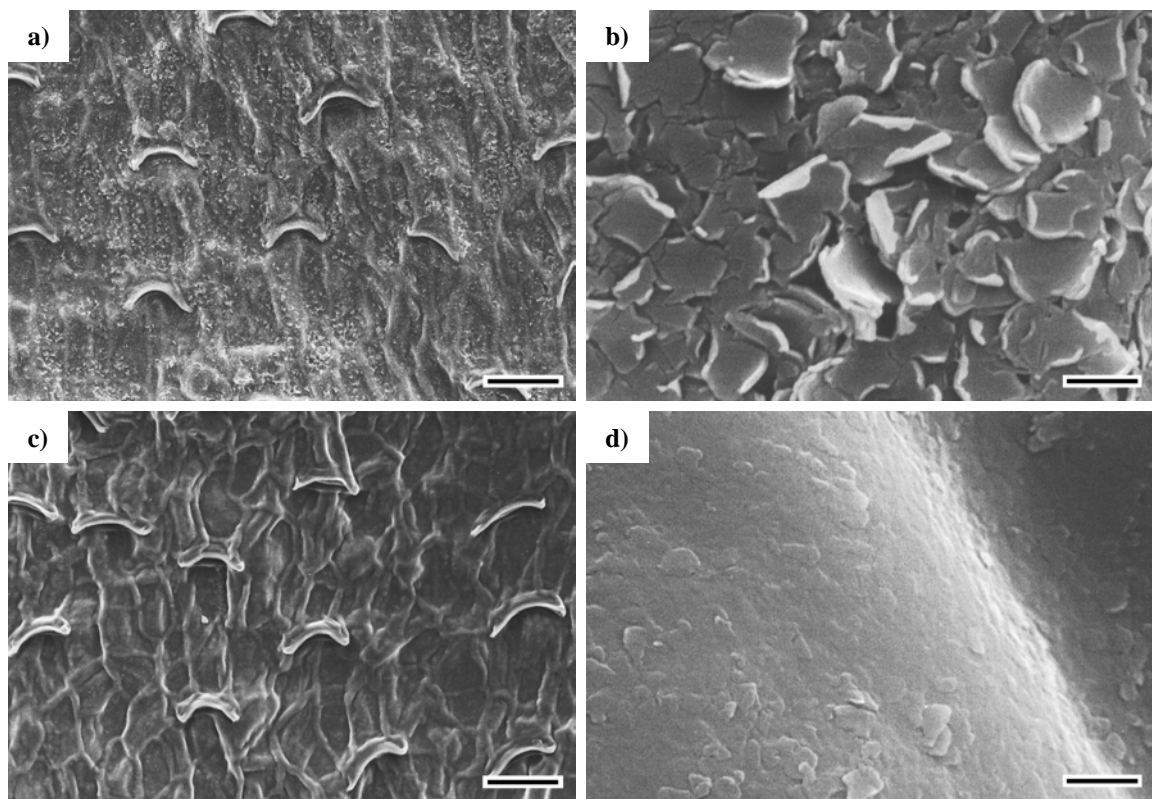


**Abb. 3.9** Relative Homologenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. alata* Kannen aus vier aufeinander folgenden mechanischen Präparationen mit Gummi arabicum als Klebstoff und anschließender Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=4). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

nach der Behandlung mit Gummi arabicum gewonnene Extrakt eine mittlere Zusammensetzung zwischen der ersten Behandlung mit gefrorenem Wasser und der entsprechenden Nachextraktion.

### 3.3.3.3 Gesamtwachsextraktionen

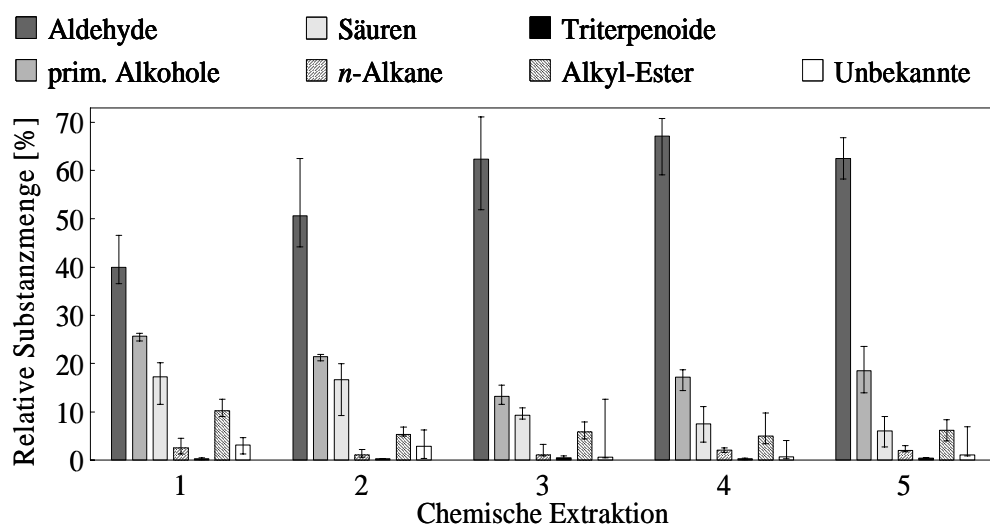
In einem dritten Experiment wurde die Gesamtwachsbelegung der Gleitzzone von *N. alata* durch fünf aufeinander folgende Extraktionen bestimmt. Da Vorversuche jedoch gezeigt hatten, dass die epikutikulären Wachskristalle bei Raumtemperatur in Chloroform nur schwer löslich sind (Abb. 3.10a, b), wurden die Extraktionen mit auf ca. 40°C erwärmtem Chloroform durchgeführt. Mit dem ersten Extraktionsschritt konnten 16,9 µg/cm<sup>2</sup> Wachs gewonnen werden (Abb. 3.5b). Mit vier weiteren Schritten wurde eine Gesamtausbeute von 28,5 µg/cm<sup>2</sup> Wachs erreicht (Abb. 3.5b). An die einzelnen Ausbeuten der aufeinander folgenden Extraktionsschritte wurde eine nichtlineare Regressionsfunktion ( $y = -0,40 + e^{-0,75 \cdot x + 3,56}$ ) angepasst. Anhand dieser Funktion konnte abgeschätzt werden, dass zusätzliche Extraktionsschritte



**Abb. 3.10** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gleitzonen von *N. alata* Kannen nach Extraktion der kutikulären Wachse mit Chloroform bei unterschiedlichen Temperaturen. a, b) Eine Extraktion bei Raumtemperatur hinterlässt große Mengen an epikutikulären Wachskristallen. c, d) Nach fünf Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C) sind keine Kristalle erkennbar. Schwarze Balken = 50 µm (a, c), 1 µm (b, d).

keine nennenswerten Mengen an Wachs ergeben hätten. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die kutikulären Wachse erschöpfend extrahiert wurden. Dieses Ergebnis wurde durch eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Kannenoberfläche nach fünf Extraktionen bestätigt. Auf diesen Oberflächen waren keine Wachsstrukturen erkennbar (Abb. 3.10c, d). Auf der anderen Seite konnte die Anwesenheit von Markersubstanzen aus dem darunter liegenden Gewebe (z.B. Chlorophylle oder Carotinoide) in den Extrakten durch visuelle Begutachtung und durch die chemische Analyse ausgeschlossen werden, so dass das Extraktionsprotokoll als selektiv für lösliche kutikuläre Bestandteile angenommen werden konnte. Die Gesamtausbeute der Extraktionen glich den in den ersten beiden Experimenten bestimmten Ausbeuten (Kruskal-Wallis-Test:  $H_{(2, n=13)}=1,74$ ;  $P=0,42$ ).

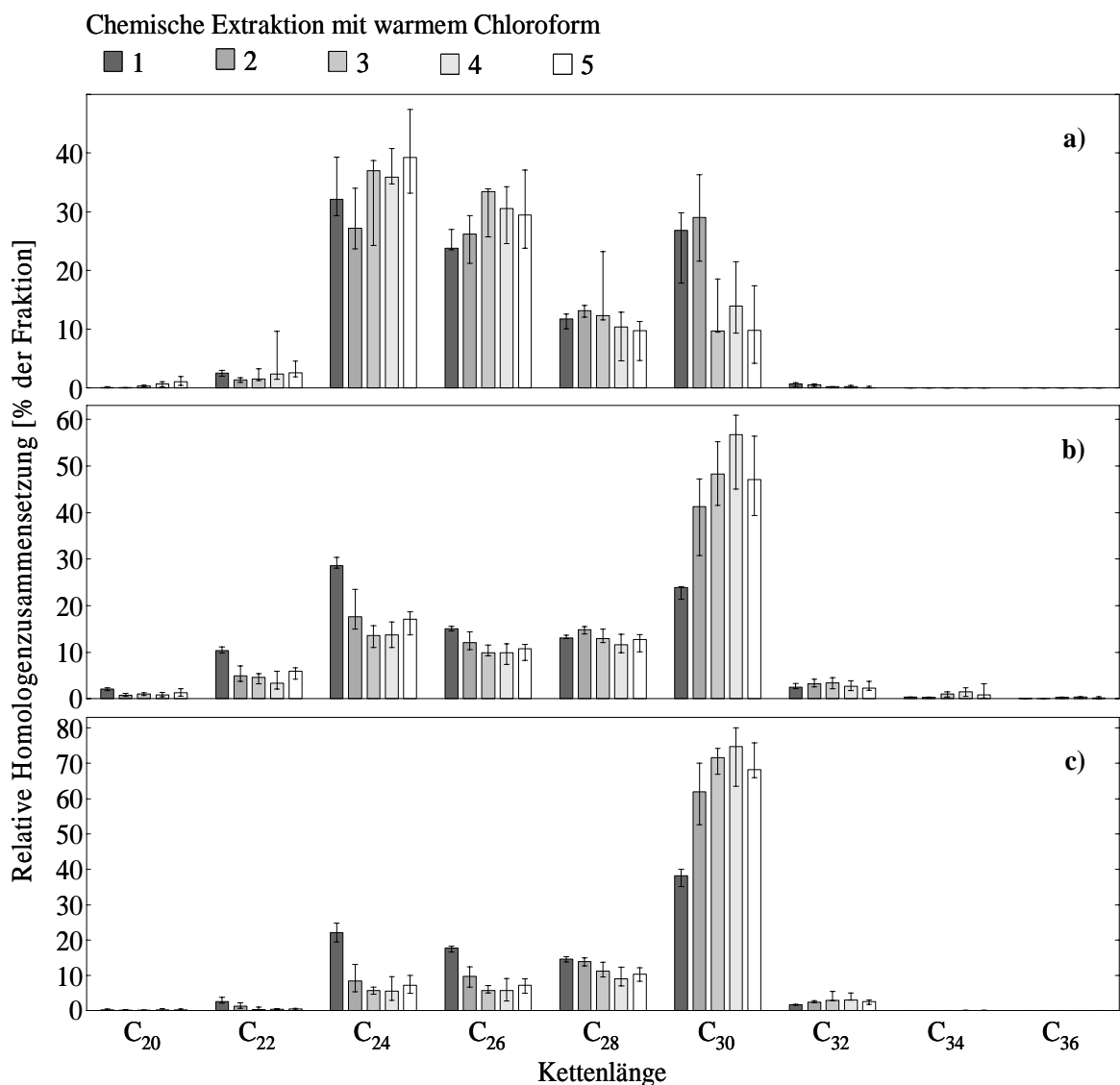
Die Zusammensetzung des Wachses aus dem ersten Extraktionsschritt (Abb. 3.11) zeigte viele Ähnlichkeiten mit der aus der Nachextraktion nach Behandlung mit Gummi arabicum (vgl. Abb. 3.7b). Während Aldehyde dominierten (40%), wurden jedoch auch bedeutende Mengen an Alkoholen (26%), Fettsäuren (17%) und Alkyl-Estern (10%) gewonnen (Abb. 3.11). Im Verlauf der aufeinander folgenden Extraktionsschritte verschoben sich die relativen Anteile der Substanzklassen schrittweise, wobei die Anteile der Aldehyde auf 62% stiegen, während die Anteile der Alkohole auf 19% und die der Fettsäuren und Alkyl-Ester auf je 6% sanken (Abb. 3.11). Damit ähnelte die Zusammensetzung des fünften Extraktionsschrittes stark derjenigen der ersten mechanischen Präparation (vgl. Abb. 3.7). Die Homologen- und Zusammensetzungen der Fettsäurefraktionen (Abb. 3.12a) zeigten im Verlauf der fünf aufeinander folgenden Extraktionen breitere Verteilungen als in den mechanisch bzw. durch



**Abb. 3.11** Relative Substanzmengen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. alata* Kannen aus fünf aufeinander folgenden Extraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=4). Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil

anschließende Nachextraktion gewonnenen Wachsen. Gleichzeitig waren in den Alkohol- und Aldehydfractionen im Vergleich zu den ersten beiden Experimenten entgegen läufige Verschiebungen hin zu Kettenlängen  $>C_{28}$  sichtbar (Abb. 3.12b, c). Die Homologenmuster dieser beiden Fraktionen im Wachs der ersten Extraktion ähnelten dabei denen der Wachse aus beiden Nachextraktionen, während das Wachs der fünften Extraktion den Wachsen der jeweils ersten mechanischen Präparationen entsprach.

Pflanzen der Gattung *Nepenthes* zeigen eine hohe Variabilität in zahlreichen morphologischen Merkmalen ihrer Kannen. Über die Morphologie und die chemische Zusammensetzung der epikutikulären Wachskristalle war jedoch sehr wenig bekannt. Es sollte daher untersucht



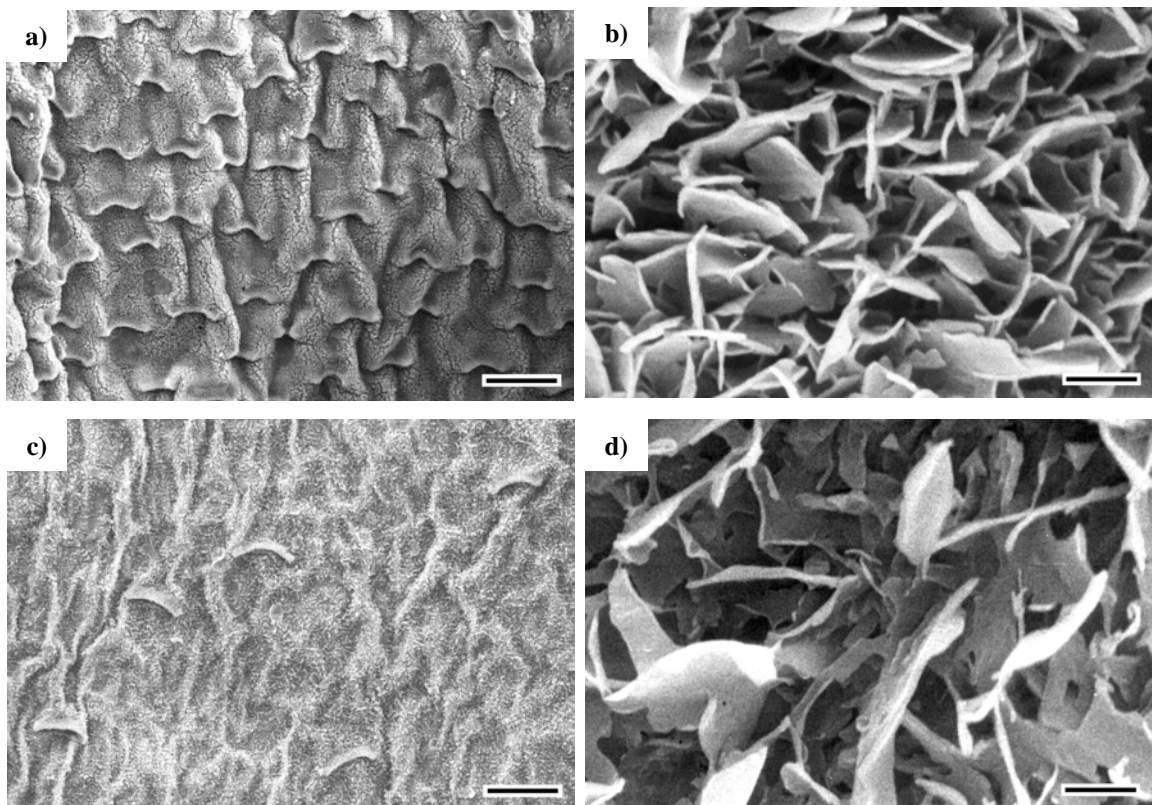
**Abb. 3.12** Relative Homologenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. alata* Kannen aus fünf aufeinander folgenden Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=4). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

werden, inwieweit die an *N. alata* gewonnenen Ergebnisse auf andere *Nepenthes*-Arten übertragen werden können. Dazu wurden *N. albomarginata* und *N. intermedia* vergleichend untersucht.

### 3.3.4 Rasterelektronenmikroskopie nativer Oberflächen der Gleitzzone von *N. albomarginata* und *N. intermedia* Kannen

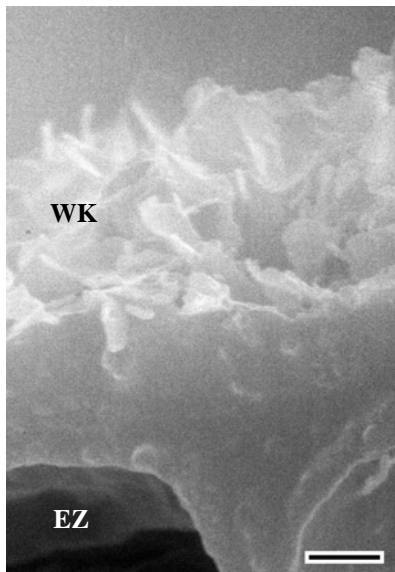
Die Oberflächen der Epidermiszellen und der halbmondförmigen Zellen der Gleitzzone von *N. albomarginata* Kannen zeigten eine lückenlose Belegung mit epikutikulären Wachskristallen (Abb. 3.13a). Die einzelnen Kristalle bildeten leicht gekrümmte Plättchen von ca. 1  $\mu\text{m}$  Länge und 0,1  $\mu\text{m}$  Dicke (Abb. 3.13b). Die Ränder der Plättchen waren glatt und mit ihrer schmalen Seite zum Lumen der Kanne hin ausgerichtet. Die Kristalle waren stellenweise miteinander verbunden und bildeten so ein dichtes Netzwerk in dem keine Vorzugsrichtung einzelner Kristalle erkennbar war. In der Form, Größe und Ausrichtung waren die Kristalle identisch mit denen von *N. alata* (vgl. Abb. 3.3b), standen dabei jedoch dichter beieinander.

Auch die Oberfläche der Gleitzzone von *N. intermedia* war lückenlos mit epikutikulären Wachskristallen überzogen (Abb. 3.13c). Die einzelnen Kristalle unterschieden sich jedoch in



**Abb. 3.13** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unbehandelter Gleitzonen der Kannen von *N. albomarginata* (a, b) und *N. intermedia* (c, d). Schwarze Balken = 50  $\mu\text{m}$  (a, c), 1  $\mu\text{m}$  (b, d).





**Abb. 3.14** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefrierbruchs durch die Gleitzone einer *N. intermedia* Kanne. Die epikutikulären Wachskristalle (WK) sind den Epidermiszellen (EZ) als ca. 3 µm dicke Schicht aufgelagert. Schwarzer Balken = 1 µm.

ihrer Form, Größe und Anordnung deutlich von denen der Gleitzonen von *N. alata* und *N. albomarginata* (Abb. 3.13c). Die Kristalle bildeten flächige Strukturen, deren Ränder oft zum Lumen der Kanne aufgebogen waren und zahlreiche Einbuchtungen und Kerben aufwiesen (Abb. 3.13d). Die Ausdehnungen der zusammenhängenden Flächen variierten stark in einem Bereich bis 4 µm. Die einzelnen Flächenabschnitte waren untereinander verbunden, sodass die Kristalle nicht als isolierte Aggregate zu erkennen waren und den netzwerkartigen Charakter der Kristallschicht unterstrichen. Zwischen den Kristallen bildeten sich relativ große Hohlräume, durch die weitere Strukturen unterhalb der oberflächennächsten Kristalle erkennbar waren. Insgesamt war den Epidermiszellen eine ca. 3 µm mächtige Schicht aufgelagert (Abb. 3.14).

### 3.3.5 Präparation kutikulärer Wachse der Gleitzone von *N. albomarginata* und *N. intermedia* Kannen

#### 3.3.5.1 Mechanische Präparation mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und Nachextraktion

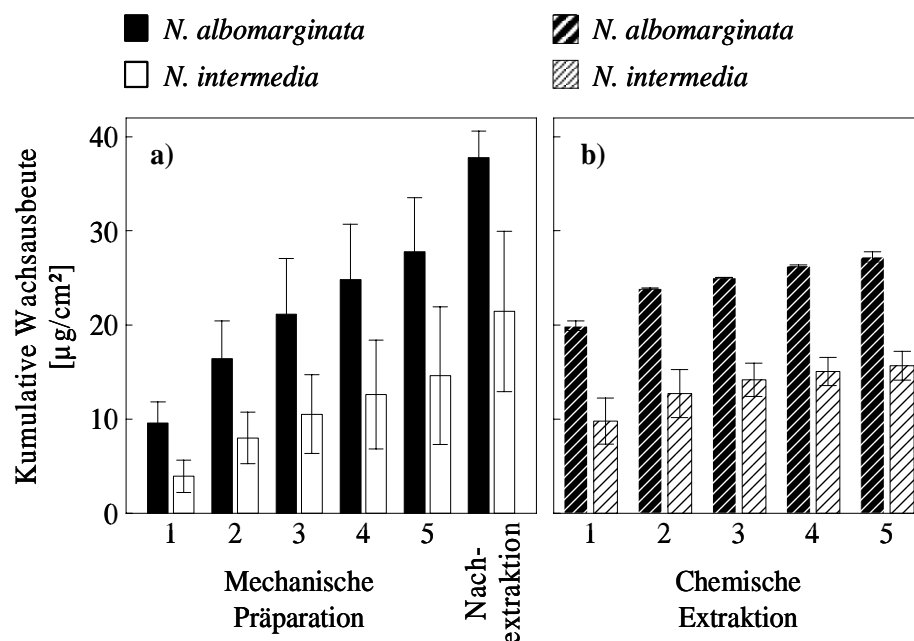
In den Experimenten zur mechanischen Entfernung kutikulärer Wachse an *N. alata* konnte gezeigt werden, dass gefrorenes Wasser ein effizienter Klebstoff zur Präparation kutikulärer Wachse darstellt. Diese Methode wurde daher für die Präparation kutikulärer Wachse an *N. albomarginata* und *N. intermedia* verwendet. Die Präparationen konnten bei beiden Arten fünfmal an den Oberflächen derselben Blattscheiben durchgeführt werden, ohne das darunter liegende Gewebe zu beschädigen. Die rasterelektronenmikroskopische Kontrolle zeigte keine Verletzungen der Kutikula oder der epidermalen Zellen.

Bei *N. albomarginata* sank die Wachsausbeute kontinuierlich von 9,6 µg/cm<sup>2</sup> (Abb. 3.15a) bei der ersten mechanischen Präparation auf 2,9 µg/cm<sup>2</sup> Wachs bei der fünften Präparation. Insgesamt konnten so 27,8 µg/cm<sup>2</sup> Wachs (Abb. 3.15a) und damit ca. 11 µg/cm<sup>2</sup> mehr als bei *N. alata* (vgl. Abb. 3.5a) mechanisch von der Gleitzoneoberfläche präpariert werden. An die

Ausbeuten der aufeinander folgenden Präparationsschritte wurde eine lineare Regressionsfunktion ( $y = -1,64 \cdot x + 10,49$ ) angepasst. Dadurch konnte abgeschätzt werden, dass mit einem zusätzlichen Schritt lediglich  $0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs hätten gewonnen werden können.

Die Ausbeute der ersten Präparation bei *N. intermedia* war mit  $3,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  vergleichsweise niedrig (Abb. 3.15a). Im Gegensatz zu *N. albomarginata* und *N. alata*, wurde in der zweiten Präparation jedoch mit  $4,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mehr Material gewonnen als in der ersten Präparation. Bei der dritten Präparation betrug die Ausbeute  $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  und sank auf  $2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  bei der Letzten. Insgesamt konnte so bei *N. intermedia* mit  $14,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  die geringste Menge an Wachs mechanisch von der behandelten Oberfläche entfernt werden (Abb. 3.15a). Durch eine lineare Regression ( $y = -0,58 \cdot x + 4,67$ ) konnte abgeschätzt werden, dass durch drei weitere Präparationsschritte  $1,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs hätten gewonnen werden können.

Anschließend an die mechanischen Präparationen wurden die Oberflächen der Blattscheiben mit warmem Chloroform behandelt. Bei *N. albomarginata* setzte diese Extraktion weitere  $10,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs frei. Die Gesamtausbeute an kutikulären Wachsen summierte sich somit auf  $37,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Abb. 3.15a) und lag damit um  $10,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  höher, als bei *N. alata*



**Abb. 3.15** Kumulative Wachsausbeuten aus zwei verschiedenen methodischen Ansätzen zur Präparation kutikulärer Wachse von Gleitzonen in *N. albomarginata* und *N. intermedia* Kannen. a) Zuerst wurden die Wachse durch fünffache Behandlung mit gefrorenem Wasser als Klebstoff (beide Arten  $N=4$ ) von den Oberflächen entfernt. Den mechanischen Präparationen folgte eine chemische Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca.  $40^\circ\text{C}$ ). b) Zur Bestimmung der Gesamtbelegung, wurde das Wachs durch fünf aufeinander folgende Oberflächenextraktionen ( $N=2$  für *N. albomarginata*;  $N=4$  für *N. intermedia*) mit warmem Chloroform (ca.  $40^\circ\text{C}$ ) entfernt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

(vgl. Abb. 3.5a). Bei *N. intermedia* konnten durch eine Oberflächenextraktion  $6,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Wachs gewonnen werden. Die Gesamtausbeute an kutikulären Wachsen summierte sich damit auf  $21,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Abb. 3.15a).

Die höchste Gesamtausbeute an kutikulären Wachsen konnte somit bei *N. albomarginata* ( $37,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) erreicht werden (vgl. Abb. 3.15a, 3.5a). Die Wachsbelegung lag damit deutlich über denen von *N. alata* mit  $26,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Abb. 3.5a) und *N. intermedia* mit  $21,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Abb. 3.15a). Dabei konnten bei *N. albomarginata* 75% der Gesamtmenge an Wachs, bei *N. alata* 68% und bei *N. intermedia* 69% mechanisch mit gefrorenem Wasser gewonnen werden.

### 3.3.5.2 Rasterelektronenmikroskopische Kontrolle der mechanisch-chemischen Präparationsmethoden

Sowohl bei *N. albomarginata* als auch bei *N. intermedia* zeigte die rasterelektronenmikroskopische Kontrolle, dass bereits mit der ersten Präparation die ursprünglich vorhandenen Strukturen großflächig entfernt wurden (Abb. 3.16a, b). Während bei *N. albomarginata* nur punktförmig glattrandige Plättchen zurück geblieben waren (Abb. 3.16a) konnten bei *N. intermedia* inselhaft Flächen mit unveränderten Strukturen beobachtet werden (Abb. 3.16b). Die jeweils dazwischen liegenden Bereiche wiesen jedoch bei *N. albomarginata* (Abb. 3.16c) und *N. intermedia* (Abb. 3.16d) scharfkantige Strukturen mit unregelmäßigen Rändern auf, die denen bei *N. alata* weitgehend glichen (vgl. Abb. 3.6b). An den Grenzlinien von unbehandelten zu behandelten Flächen wurde ein deutlicher Höhenunterschied zwischen den ursprünglichen Plättchen und den verbliebenen Strukturen sichtbar (Abb. 3.16e, f). Analog zu den Ergebnissen bei *N. alata* konnte daher geschlossen werden, dass auch bei *N. albomarginata* und *N. intermedia* ausschließlich die äußersten Teile der Kristalle bei der Präparation entfernt wurden.

### 3.3.6 Chemische Zusammensetzung kutikulärer Wachse von *N. albomarginata* und *N. intermedia*

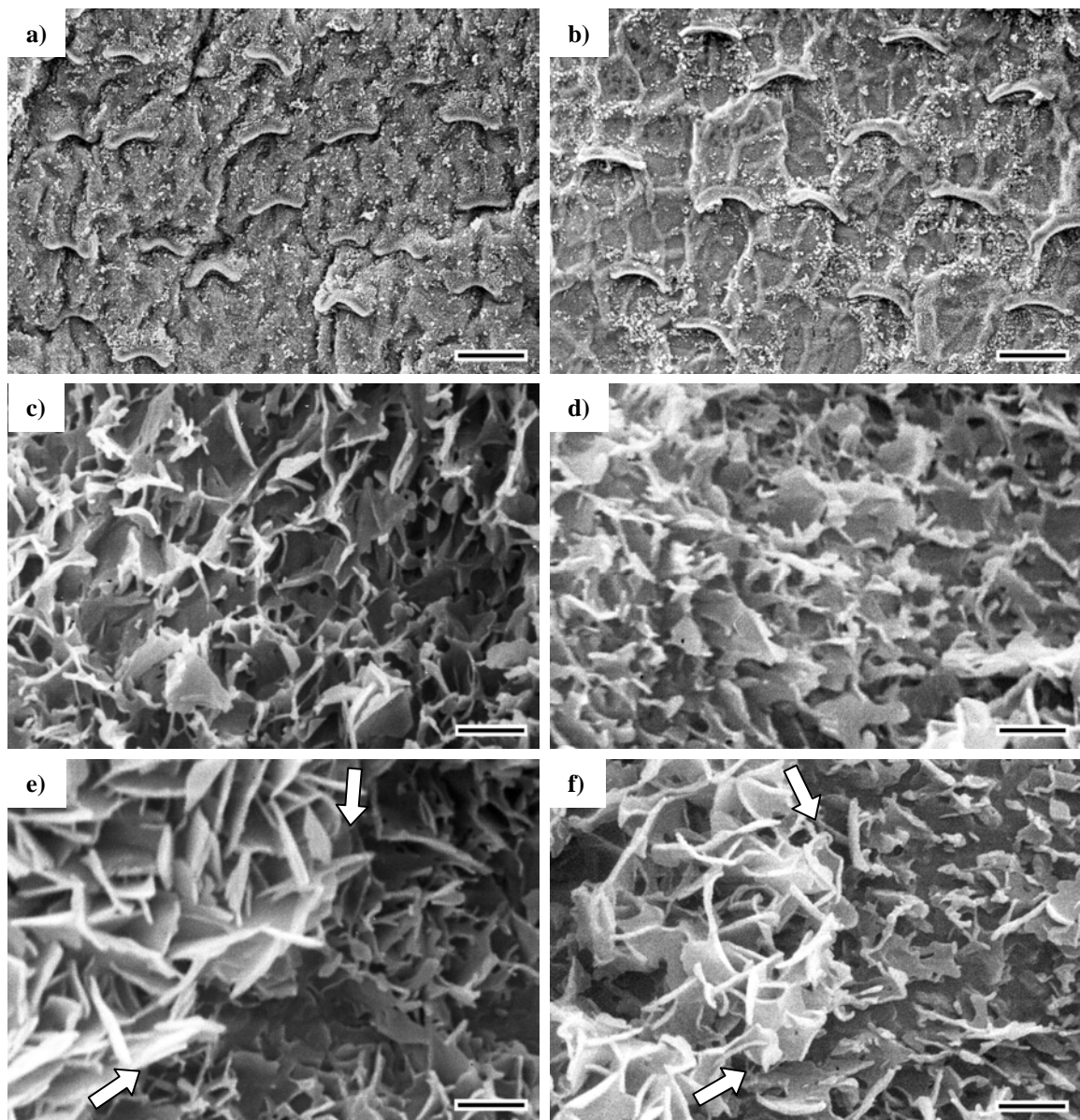
#### 3.3.6.1 Mechanische Präparationen

Die Gleitzonenwachse aus Kannen von *N. albomarginata* und *N. intermedia* bestanden hauptsächlich aus langkettigen aliphatischen Substanzklassen (Abb. 3.17). Es fanden sich

---

homologe Reihen primärer Alkohole ( $C_{20}$ - $C_{34}$ ), Fettsäuren ( $C_{20}$ - $C_{28}$ ), Alkyl-Estern ( $C_{38}$ - $C_{56}$ ) und *n*-Alkanen ( $C_{25}$ - $C_{34}$ ). Pentazyklische Triterpenoide waren nur in geringen Spuren vorhanden. Die dominierende Substanzklasse war jedoch bei beiden Arten *n*-Aldehyde mit Kettenlängen von  $C_{22}$  bis  $C_{32}$ .

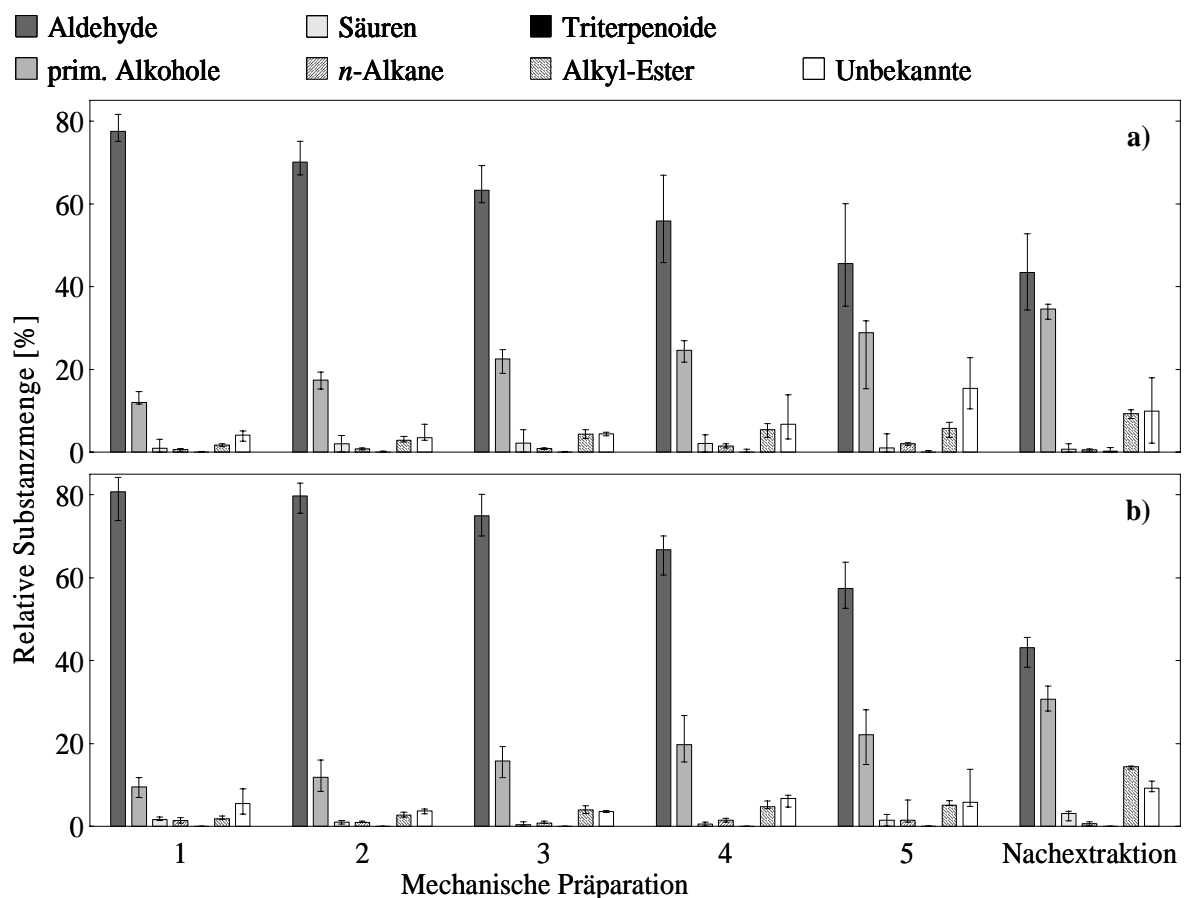
Die Anteile der Aldehyde am Wachs der ersten mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser betragen bei *N. albomarginata* 78% (Abb. 3.17a) und bei *N. intermedia* 81% (Abb. 3.17b). Im Gegensatz dazu, waren primäre Alkohole (12% bzw. 10%) und insbesondere Fettsäuren (1% bzw. 2%) sowie Alkyl-Ester (je 2%) in relativ geringen Anteilen



**Abb. 3.16** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gleitzonen von *N. albomarginata* (a, c, e) und *N. intermedia* (b, d, f) Kannen nach der ersten mechanischen Präparation epikutikulärer Wachskristalle mit gefrorenem Wasser. a, b) Mit der ersten mechanischen Präparation werden die ursprünglich vorhandenen Plättchen großflächig entfernt. c, d) Die erste mechanische Präparation hinterlässt unregelmäßig geformte Wachsstrukturen. e, f) Grenzlinie (Pfeile) zwischen einer unbehandelten (links) und präparierten Fläche (rechts). Schwarze Balken = 50  $\mu$ m (a, b), 1  $\mu$ m (c-f).

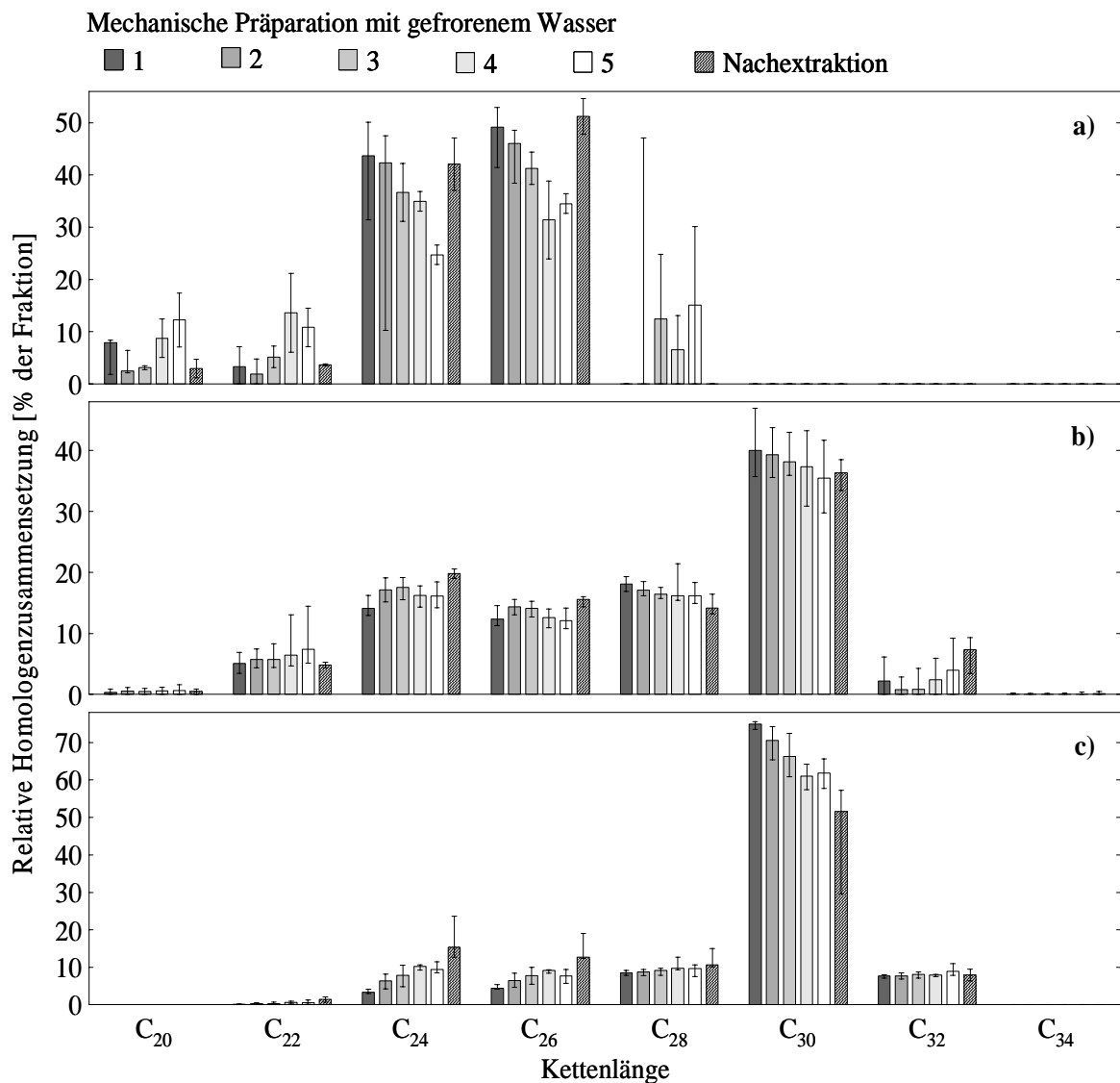
bei *N. albomarginata* bzw. *N. intermedia* vertreten (Abb. 3.17a, bzw. 3.17b). Die Zusammensetzungen der Wachse dieser beiden Arten ähnelten damit der von *N. alata*, wobei die Dominanz der Aldehyde jedoch stärker ausgeprägt war (vgl. Abb. 3.7a).

Im Verlauf der weiteren Präparationen zeigten sich bei beiden Arten deutliche Gradienten in der Zusammensetzung der mechanisch gewonnenen Wachse. Bei *N. albomarginata* sank mit der fünften Präparation der Anteil der Aldehyde auf 46%, während vor allem primäre Alkohole mit 29% aber auch Alkyl-Ester mit 6% stärker zur Zusammensetzung beitrugen (Abb. 3.17a). In ähnlicher Weise waren Aldehyde bei *N. intermedia* im Wachs der fünften Präparation noch mit 57% vertreten, während sich die Anteile der primären Alkohole und Alkyl-Ester mit 22% bzw. 5% mehr als verdoppelten (Abb. 3.17b). Auch bei *N. alata* konnte ein Gradient in der Zusammensetzung der Wachse aufeinander folgender Präparationen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.7a). Die Abnahmen der relativen Aldehydmengen und die Zunahmen vor allem der relativen Mengen primärer Alkohole waren bei *N. albomarginata* und *N. intermedia* jedoch stärker ausgeprägt.



**Abb. 3.17** Relative Substanzmengen in kutikulären Wachsen der Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten aus fünf mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und anschließender Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C). a) *N. albomarginata* (N=4). b) *N. intermedia* (N=4). Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

Die Kohlenstoffgrundgerüste der aliphatischen Substanzklassen waren mit Ausnahme der Alkane von Homologen mit geradzahligen Kettenlängen dominiert. In den Fettsäurefraktionen aus den ersten mechanischen Präparationen fand sich unabhängig von der Art vor allem das C<sub>26</sub>-Homologe (Abb. 3.18a, 3.19a). Bei *N. albomarginata* stellte Hexacosansäure 49% und Tetracosansäure 44% der Fraktion (Abb. 3.18a). Bei *N. intermedia* war Hexacosansäure mit 55% in der Fraktion und Tetracosansäure mit 37% vertreten (Abb. 3.19a). Im Verlauf der folgenden Präparationen war bei *N. albomarginata* eine deutliche Abnahme der Anteile der beiden Homologen zu erkennen (Abb. 3.18a), wobei das C<sub>26</sub>-Homologe mit 35% im Wachs der fünften Präparation weiterhin dominierte. Bei *N. intermedia* verschoben sich lediglich die Verhältnisse der beiden vorherrschenden Homologen zueinander (Abb. 3.19a),

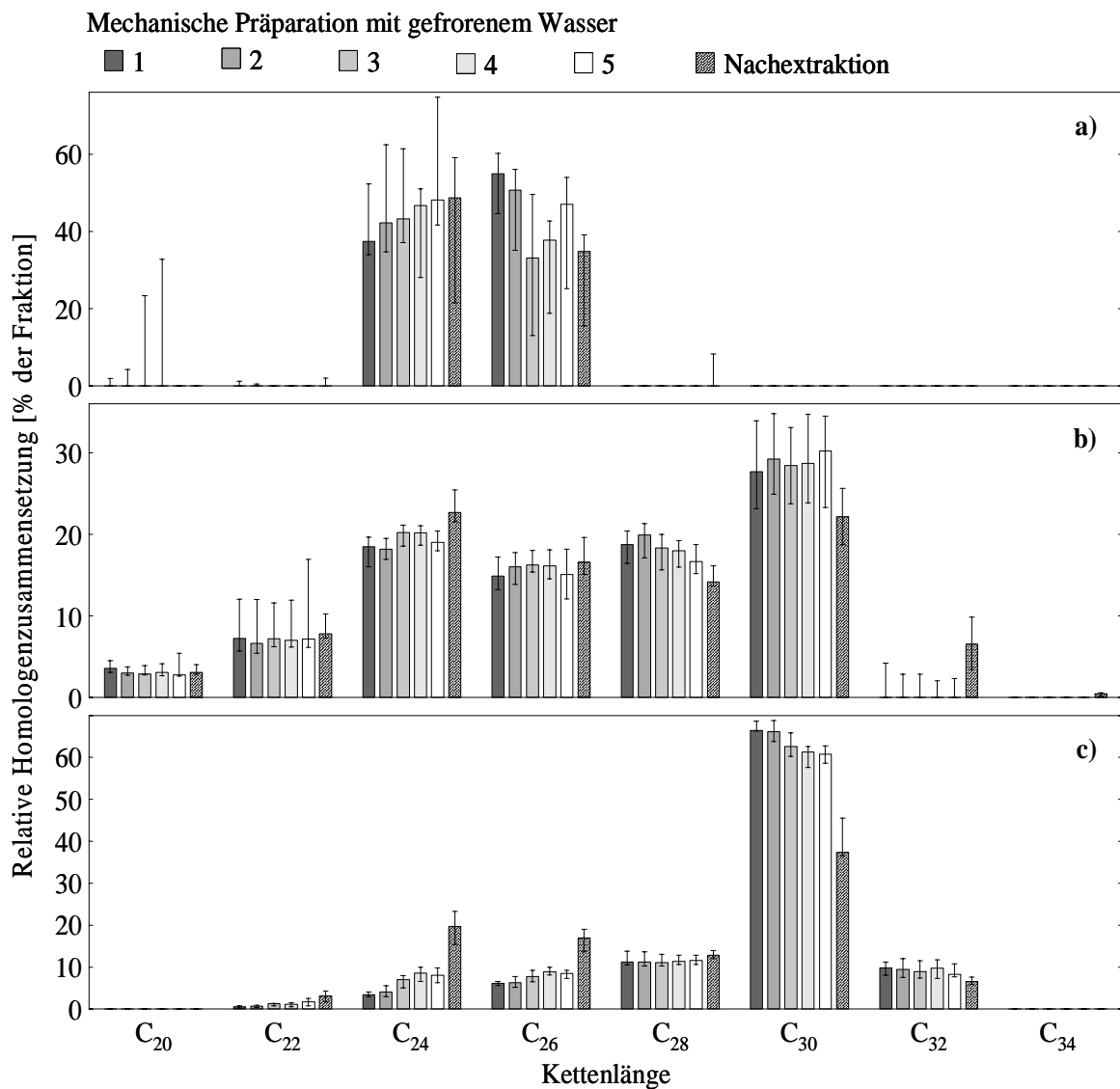


**Abb. 3.18** Relative Homologenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzone von *N. albomarginata* Kannen aus fünf aufeinander folgenden mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und anschließender Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=4). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

sodass Tetracosansäure im Wachs der fünften Präparation mit 48% leicht über Hexacosansäure (47%) dominierte.

Die Homologenmuster der Alkoholfraktionen der ersten Präparationen an beiden Arten zeigten breite Verteilungen mit je einem absoluten Maximum bei C<sub>30</sub> und einem wenig ausgeprägten lokalen Maximum bei C<sub>24</sub> (Abb. 3.18b, 3.19b). Die Dominanz des C<sub>30</sub>-Homologen war bei *N. albomarginata* (Abb. 3.18b) mit 40% der Fraktion stärker ausgeprägt als bei *N. intermedia* mit 28% (Abb. 3.19b). Bis zu den fünften mechanisch gewonnenen Präparaten veränderten sich die relativen Mengen einzelner Homologen bei beiden Arten kaum.

Die Verteilungen der Aldehyd-Homologen der ersten Präparationen zeigten stark ausgeprägte Maxima bei C<sub>30</sub>, mit 75% bei *N. albomarginata* (Abb. 3.18c) und 66% bei *N. inter-*



**Abb. 3.19** Relative Homogenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. intermedia* Kannen aus fünf aufeinander folgenden mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser als Klebstoff und anschließender Nachextraktion mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=4). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

*media* (Abb. 3.19c). Dieses einzelne Homologe trug somit bei *N. albomarginata* zu 57% und bei *N. intermedia* zu 51% zur präparierten Wachsmenge bei. In den nachfolgenden vier Präparationen war in den Wachsen beider Arten eine leichte Verschiebung zu Kettenlängen  $<C_{30}$  erkennbar (Abb. 3.18c, 3.19c).

Die Homologenzusammensetzungen der Fettsäure-, Alkohol- und Aldehydfraktion in den ersten mechanisch präparierten Wachsen von *N. albomarginata*, *N. intermedia* und *N. alata* waren sich sehr ähnlich. In den entsprechenden Aldehydfractionen dominierte bei allen drei Arten das  $C_{30}$ -Homologe stark, während in den Alkoholfraktionen auch kürzere Kettenlängen stärker vertreten waren. Nur in den Verteilungen der Fettsäure-Homologen zeigten sich, verglichen zu *N. alata*, bei *N. albomarginata* und *N. intermedia* Unterschiede in den Lagen des Maximums und insbesondere bei *N. intermedia* auch Unterschiede in der Breite der Verteilung.

#### 3.3.6.2 Chemische Extraktion nach mechanischen Präparationen

Nach wiederholter mechanischer Entfernung kutikulärer Wachse mit gefrorenem Wasser als Klebstoff wurden die Oberflächen der Blattscheiben mit warmem Chloroform behandelt. Die resultierenden Extrakte setzen sich bei *N. albomarginata* zu 43% aus Aldehyden zusammen und wiesen relativ hohe Anteile primärer Alkohole (35%) und Alkyl-Ester (9%) auf (Abb. 3.17a). Fettsäuren trugen mit 1% kaum zur Zusammensetzung bei und Alkane sowie Triterpenoide waren nur in Spuren ( $\leq 0,5\%$ ) vorhanden. Die entsprechenden Extrakte von *N. intermedia* bestanden ebenfalls zu 43% aus Aldehyden, wiesen jedoch leicht geringere Anteile an primären Alkoholen (31%) und höhere Anteile an Alkyl-Estern (15%) sowie Fettsäuren (3%) auf (Abb. 3.17b). Alkane waren nur geringen Mengen ( $<1\%$ ) vorhanden und Triterpenoide konnten nicht detektiert werden. Im Vergleich zu der Extraktion nach mechanischer Präparation mit gefrorenem Wasser bei *N. alata* (vgl. Abb. 3.7a), wiesen die Wachse der Nachextraktion bei *N. albomarginata* und *N. intermedia* wesentlich höhere Anteile an Aldehyden auf, während Fettsäuren, Alkane und Triterpenoide kaum zur Zusammensetzung beitrugen (Abb. 3.17a, b). Sie zeigten somit mehr Ähnlichkeit mit den Wachsen der entsprechenden Nachextraktion nach mechanischer Präparation mit Gummi arabicum (vgl. Abb. 3.7b). Dennoch unterschieden sich bei allen drei Arten die Zusammensetzungen der Wachse in den Nachextraktionen deutlich von denen der entsprechenden ersten mechanischen Präparation mit gefrorenem Wasser. Diese waren durch besonders hohe Anteile an Aldehyden



gekennzeichnet (vgl. Abb. 3.7a; 3.17a, b), während die Wachse der Nachextraktionen hohe Anteile primärer Alkohole und Alkyl-Ester aufwiesen.

Im Wachs der Nachextraktion bei *N. albomarginata* war die Kettenlängenverteilung der Fettsäurefraktion deutlich vom C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Homologen (42% bzw. 51%) dominiert (Abb. 3.18a) und glich somit der Verteilung aus der ersten mechanischen Präparation mit gefrorenem Wasser. Die Homologenverteilung der Alkoholfraktion im Wachs der Nachextraktion war denen der entsprechenden mechanischen Präparationen weitgehend ähnlich (Abb. 3.18b). In der Aldehydfraktion jedoch, war eine deutliche Verschiebung zu Kettenlängen <C<sub>28</sub> erkennbar (Abb. 3.18c). Der Anteil des C<sub>30</sub>-Homologen sank auf 52% der Fraktion und Triacontanal trug somit 24% zum gesamten extrahierten Wachs bei.

Bei *N. intermedia* konnte im Wachs der Nachextraktion eine Verschiebung zu Kettenlängen <C<sub>28</sub> in den Homologenmustern aller drei Substanzklassen festgestellt werden (Abb. 3.19). In der Fettsäurefraktion dominierte nun das C<sub>24</sub>-Homologe mit 49% über das C<sub>26</sub>-Homologe mit 34% (Abb. 3.19a). In der Alkoholfraktion verlagerte sich das absolute Maximum der Verteilung zum C<sub>24</sub>-Homologen (23% der Fraktion), während das C<sub>30</sub>-Homologe (22% der Fraktion) mit einem leicht geringeren Anteil vorlag (Abb. 3.19b). In der Aldehydfraktion war die Verschiebung zu Kettenlängen <C<sub>28</sub> am deutlichsten ausgeprägt (Abb. 3.19c). Die Verteilung zeigte ein deutliches lokales Maximum bei C<sub>24</sub> (20% der Fraktion) und ein absolutes Maximum mit 37% bei Triacontanal (Abb. 3.19c). Dieses Homologe trug daher mit 17% zum gesamten extrahierten Wachs bei.

Die Homologenmuster der Alkohole und Aldehyde in den Wachsen der Nachextraktionen unterschieden sich bei allen drei Arten von denen der entsprechenden ersten mechanischen Präparationen mit gefrorenem Wasser (vgl. Abb. 3.8b, c; 3.18b, c; 3.19b, c). In allen Fällen waren Verschiebungen in den Verteilungen zu Kettenlängen ≤ C<sub>28</sub> beobachtbar, die in der Aldehydfraktion besonders stark ausgeprägt waren.

Triacontanal war somit der Hauptbestandteil der epikutikulären Wachskristalle bei allen drei hier untersuchten *Nepenthes*-Arten. Innerhalb der epikutikulären Wachsschicht zeigten sich Gradienten in der Zusammensetzung, sowohl auf der Ebene der Substanzklassen als auch in deren Homologenzusammensetzung. In dieser Hinsicht unterschieden sich die Zusammensetzungen der epikutikulären Wachse zudem deutlich von den intrakutikulären Wachsen.

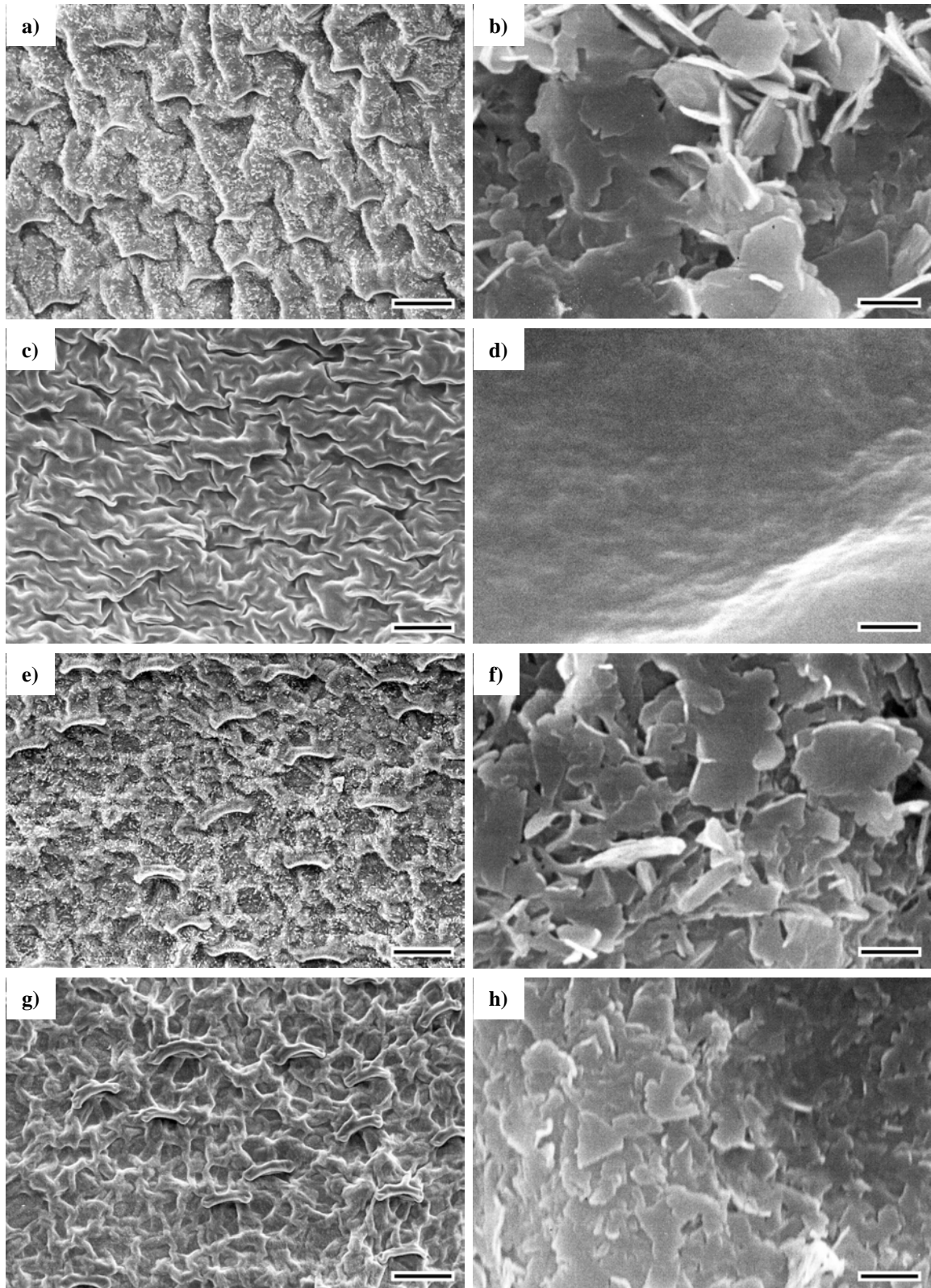
## 3.3.6.3 Gesamtwachsextraktionen

Entsprechende Vorversuche hatten gezeigt, dass auch die epikutikulären Wachskristalle von *N. albomarginata* (Abb. 3.20a, b) und *N. intermedia* (Abb. 3.20e, f) bei Raumtemperatur kaum in Chloroform löslich sind. Analog zu den Experimenten an *N. alata*, sollten die Gesamtwachsbelegungen der Gleitzonen der folgenden Arten durch wiederholtes Extrahieren mit warmem Chloroform bestimmt werden.

Mit dem ersten Extraktionsschritt konnten bei *N. albomarginata* 19,9 µg/cm<sup>2</sup> Wachs gewonnen werden. (Abb. 3.15b). Die Ausbeute sank mit der zweiten Extraktion stark auf 3,9 µg/cm<sup>2</sup> ab und blieb bei den folgenden Extraktionen mit ca. 1 µg/cm<sup>2</sup> auf gleich bleibendem Niveau. Insgesamt konnten mit den fünf aufeinander folgenden Extraktionen 27,3 µg/cm<sup>2</sup> Wachs gewonnen werden (Abb. 3.15b). Damit lag die Gesamtausbeute aus diesem Extraktionsexperiment ca. 10 µg/cm<sup>2</sup> unter der Gesamtausbeute der mechanischen Präparationen mit anschließender Extraktion (vgl. Abb. 3.15a). Die so ermittelten Gesamtbelegungen unterschieden sich jedoch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test: P>0,05). Eine an die absoluten Ausbeuten der fünf Extraktionsschritte angepasste Regression ( $y=0,97+e^{-1,88x+4,82}$ ) näherte sich asymptotisch dem Wert 0,97 an und ließ vermuten, dass die kutikulären Wachse nicht erschöpfend extrahiert wurden. Die rasterelektronenmikroskopische Kontrolle der extrahierten Oberflächen zeigte jedoch keine Reste epikutikulären Materials (Abb. 3.20c, d)

Bei *N. intermedia* konnten mit der ersten Extraktion 9,8 µg/cm<sup>2</sup> Wachs gewonnen werden (Abb. 3.15b). Die Ausbeuten der folgenden Extraktionen sanken nach der Zweiten (2,9 µg/cm<sup>2</sup>) stetig auf 0,6 µg/cm<sup>2</sup> mit der fünften Extraktion. In der Summe belief sich die Ausbeute auf 15,7 µg/cm<sup>2</sup> Wachs. Damit lag sie nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test; P>0,05) mit ca. 6 µg/cm<sup>2</sup> unter der im ersten Experiment ermittelten Wachsbelegung (vgl. Abb. 3.15a). Eine an die Ausbeuten der einzelnen Extraktionsschritte angepasste Regressionsfunktion ( $y=0,70+e^{-1,37x+3,58}$ ) deutete auch bei *N. intermedia* darauf hin, dass die kutikulären Wachse nicht erschöpfend extrahiert wurden. Im Gegensatz zu *N. albomarginata* und *N. alata*, waren bei *N. intermedia* selbst nach fünf Extraktionen mit warmem Chloroform noch deutliche Überreste der epikutikulären Kristalle zu erkennen (Abb. 3.20g, h).

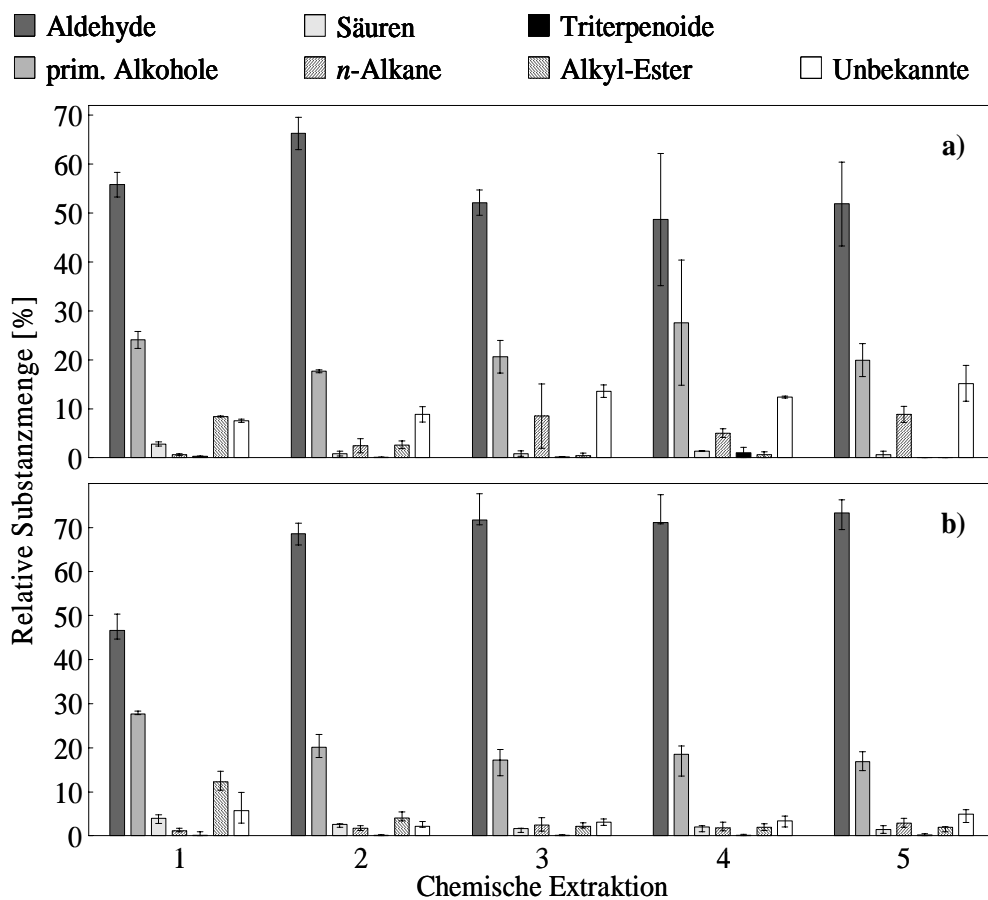
Das Wachs der ersten Extraktion an *N. albomarginata* zeigte in seiner Zusammensetzung Merkmale sowohl der ersten mechanischen Präparation als auch der entsprechenden Nachextraktion (Abb. 3.21a). Aldehyde waren im Vergleich zur ersten mechanischen Präparation mit 56% relativ schwach vertreten, während primäre Alkohole mit 24% und Alkyl-Ester mit



**Abb. 3.20** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gleitzonen von *N. albomarginata* (a-d) und *N. intermedia* (e-h) Kannen nach Extraktion der Wachse mit Chloroform bei unterschiedlichen Temperaturen. a, b, e, f) Eine Extraktion bei Raumtemperatur hinterlässt große Mengen an epikutikulären Wachs-kristallen. c, d) Nach fünf Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C) sind bei *N. albomarginata* keine Kristalle erkennbar. g, h) Nach fünf Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C) sind bei *N. intermedia* die Kristalle unvollständig gelöst. Schwarze Balken = 50  $\mu\text{m}$  (a, c, e, g), 1  $\mu\text{m}$  (b, d, f, h).

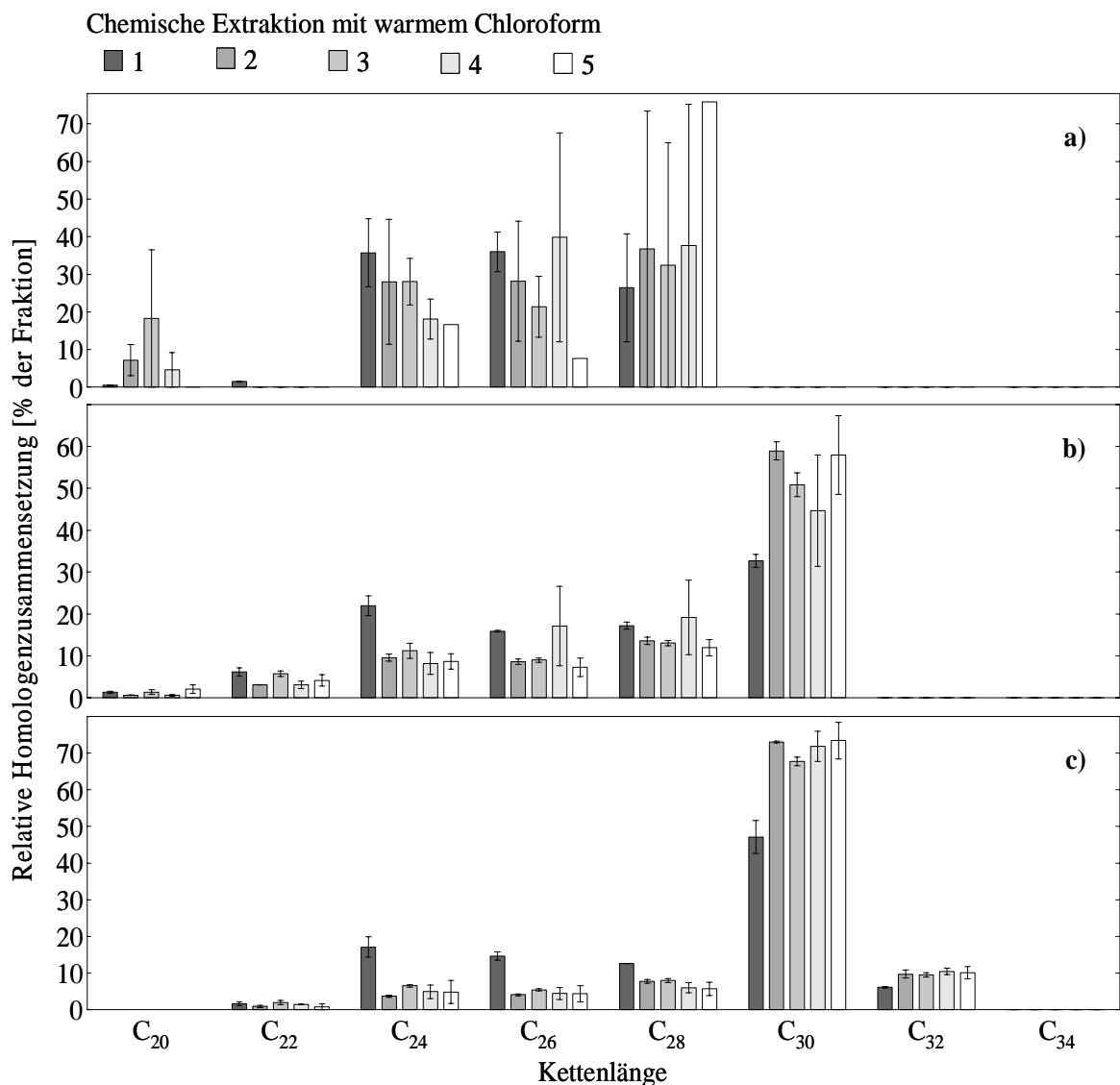
8%, ähnlich der Nachextraktion, relativ hohe Anteile aufwiesen (Abb. 3.21a). In der Folge der weiteren Extraktionen veränderten sich die relativen Anteile der Aldehyde, Alkohole und Fettsäuren kaum. Im Gegensatz dazu, sank der Anteil der Alkyl-Ester kontinuierlich bis unter die Nachweisgrenze mit der fünften Extraktion, wohingegen die relative Menge an *n*-Alkanen auf 9% stieg (Abb. 3.21a).

Das Wachs des ersten Extrakts bei *N. intermedia* (Abb. 3.21b) ähnelte dem Wachs der entsprechenden Nachextraktion (vgl. Abb. 3.17b). Der Anteil der Aldehyde war mit 47% relativ niedrig, während primäre Alkohole (28%) und Alkyl-Ester (12%) vergleichsweise hohe Anteile aufwiesen (Abb. 3.21b). In den Wachsen der darauf folgenden Extraktionen stieg der Anteil der Aldehyde stark an und betrug in der fünften Extraktion 73%. Gleichzeitig nahm der Anteil der Alkohole auf 17% und der der Alkyl-Ester auf 2% ab (Abb. 3.21b). Das Wachs der fünften Extraktion ähnelte damit dem Wachs der ersten mechanischen Präparation (vgl. Abb. 3.17b).



**Abb. 3.21** Relative Substanzmengen in kutikulären Wachsen der Gleitzonen in Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten aus fünf aufeinander folgenden Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C). a) *N. albomarginata* (N=2). b) *N. intermedia* (N=4). Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil

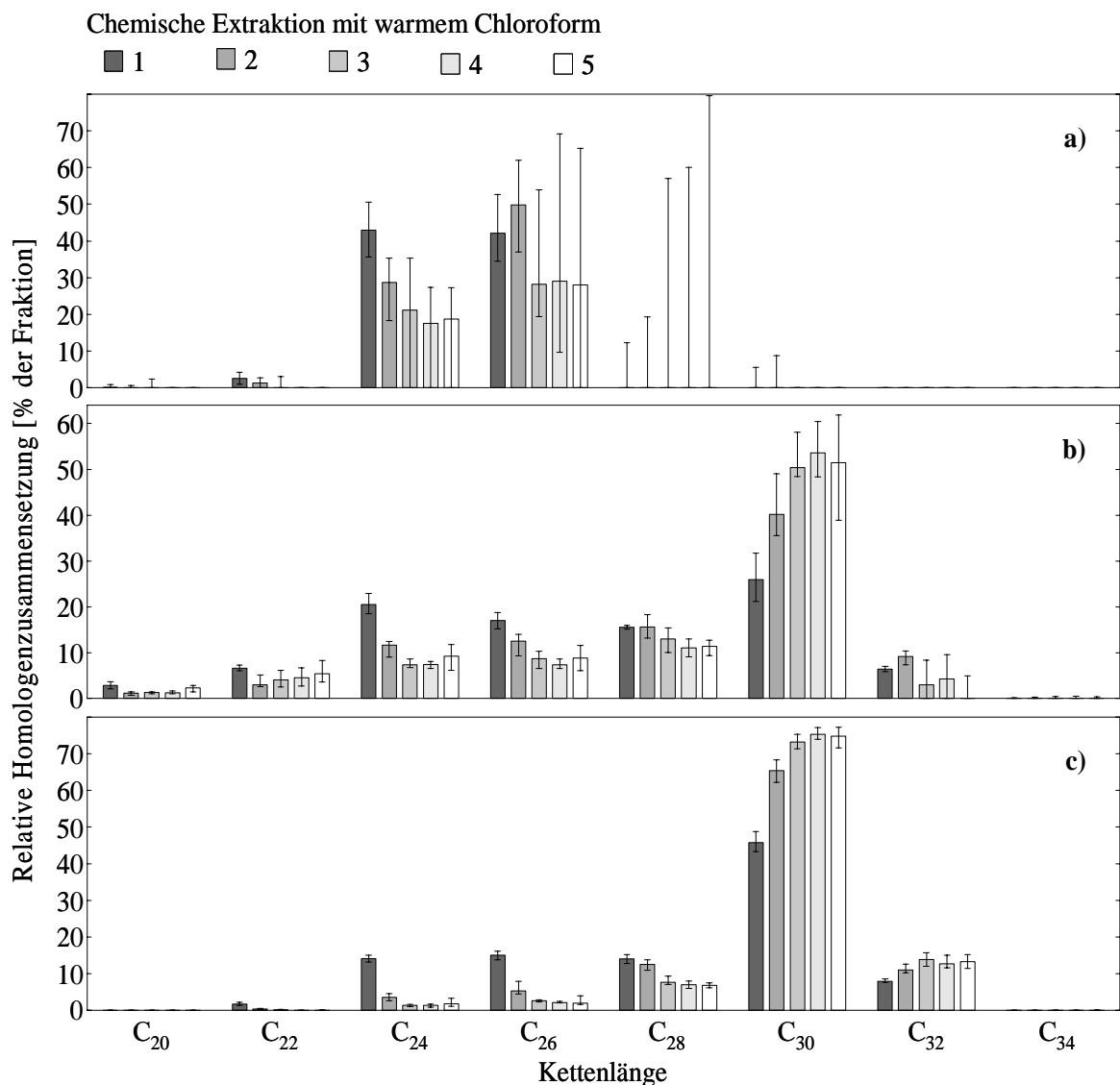
Die Homologenzusammensetzungen der Fettsäuren, Alkohole und Aldehyde veränderten sich im Verlauf der fünf Extraktionen sowohl bei *N. albomarginata* (Abb. 3.22) als auch bei *N. intermedia* (Abb. 3.23). Bei *N. albomarginata* zeigte sich in der Fettsäurefraktion eine Verschiebung zum C<sub>28</sub>-Homologen (Abb. 3.22a). Während im Wachs der ersten Extraktion das C<sub>24</sub>-Homologe mit 36% dominierte, war im Wachs der fünften Extraktion das C<sub>28</sub>-Homologe mit 76% am stärksten vertreten. Die Verteilung in der Alkoholfraktion wies im ersten Extrakt ein deutliches lokales Maximum bei C<sub>24</sub> (23% der Fraktion) auf, wohingegen im fünften Extrakt die Verteilung stetig zum C<sub>30</sub>-Homologen (58% der Fraktion) hin anstieg (Abb. 3.22b). Homologe mit Kettenlängen >C<sub>30</sub> konnten nicht detektiert werden. Eine gleichgerichtete Verschiebung zu Kettenlängen  $\geq$  C<sub>30</sub> war auch in der Aldehydfraktion deutlich (Abb.



**Abb. 3.22** Relative Homologenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. albomarginata* Kannen aus fünf aufeinander folgenden Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=2). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

3.22c). Das lokale Maximum bei C<sub>24</sub> (17% der Fraktion) im Wachs des ersten Extrakts bildete sich zu Gunsten einer steilen Verteilung mit einem prominenten Maximum bei C<sub>30</sub> (73% der Fraktion) zurück.

In gleicher Weise waren diese Verschiebungen in den Homologenverteilungen auch bei *N. intermedia* zu beobachten (Abb. 3.23). In der Fettsäurefraktion zeigten sich starke Schwankungen v. a. im relativen Anteil des C<sub>28</sub>-Homologen (Abb. 3.23a), dennoch war eine Abnahme bei den Anteilen des C<sub>24</sub>- und C<sub>26</sub>-Homologen beobachtbar. Im Gegensatz zu *N. albomarginata*, konnten bei *N. intermedia* Alkohol-Homologe bis zu Kettenlängen von C<sub>34</sub> gefunden werden (Abb. 3.23b), wohingegen das Maximum bei C<sub>30</sub> in der Verteilung des fünften Extrakts mit 52% weniger stark ausgeprägt war (Abb. 3.23b). Die Kettenlängen-



**Abb. 3.23** Relative Homologenzusammensetzung [% der Fraktion] aliphatischer Substanzklassen in kutikulären Wachsen der Gleitzzone von *N. intermedia* Kanna aus fünf aufeinander folgenden Extraktionen mit warmem Chloroform (ca. 40°C; N=4). a) Fettsäuren, b) primäre Alkohole und c) *n*-Aldehyde. Gezeigt sind Mediane, 1. und 3. Quartil.

---

verteilungen der Aldehydfractionen der fünf Extraktionen waren bei *N. intermedia* (Abb. 3.23c) denen bei *N. albomarginata* (vgl. Abb. 3.22c) weitgehend ähnlich.

Die mit der ersten Extraktion mit warmem Chloroform gewonnenen Wachse waren bei allen drei Arten durch relativ niedrige Anteile an Aldehyden und relativ hohe Anteile an primären Alkoholen sowie Alkyl-Estern gekennzeichnet. Bei *N. albomarginata* und *N. intermedia* wiesen die Zusammensetzungen dieser Wachse Ähnlichkeiten mit denen aus den Extraktionen nach Behandlung mit gefrorenem Wasser auf (vgl. Abb. 3.21a, b; 3.17a, b). Bei *N. alata* traten Ähnlichkeiten zwischen den Zusammensetzungen der ersten Extraktion und der Extraktion nach Behandlung mit Gummi arabicum auf (vgl. Abb. 3.11, 3.7b). Durch die Veränderungen der Zusammensetzungen im Verlauf der fünf Extraktionen hingegen, waren bei *N. alata* (vgl. Abb. 3.11, 3.7a) und *N. intermedia* (vgl. Abb. 3.21b, 3.17b) Übereinstimmungen in den Zusammensetzungen der fünften Extraktion und der ersten mechanischen Präparation mit gefrorenem Wasser zu erkennen. Die Ähnlichkeiten in den Zusammensetzungen der Wachse aus verschiedenen Präparations- bzw. Extraktionsschritten waren dabei auch auf der Ebene der Homologen zusammensetzungen, insbesondere bei Alkoholen und Aldehyden zu erkennen.

---

---

### 3.4 Diskussion

Die chemische Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Jeffree 1986; Walton 1990; Bianchi 1995) und es ist allgemein anerkannt, dass einzelne Substanzen oder Substanzklassen für die Bildung der Kristalle verantwortlich sind (Baker 1982). Dies wurde zuerst aus vergleichenden Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenarten geschlossen, die eine Korrelation zwischen der Vorherrschaft bestimmter Wachsbestandteile und verschiedenen charakteristischen Kristallformen fanden (Holloway et al. 1976). Andererseits konnten Kristalle mit verschiedenen charakteristischen Formen *in vitro* durch Rekristallisation ausgewählter Reinsubstanzen aus Pflanzenwachsen erzeugt werden (Jetter und Riederer 1994, 1995). Basierend auf diesen indirekten Beweisen wurde vermutet, dass epikutikuläre Wachskristalle spontan durch Selbstorganisation entstehen, sobald die Konzentration einzelner Komponenten einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Demzufolge sollte die Abtrennung einer kristallinen Phase von der komplexen und amorphen Wachsmischung zu Unterschieden in den chemischen Zusammensetzungen der Kristalle und der sie umgebenden Mischungen verursachen. Um diese Gradienten innerhalb der kutikulären Wachse erkennen zu können, müssen die genauen Anteile einzelner Komponenten entweder in den epikutikulären Kristallen oder den darunter liegenden (teilweise) amorphen intrakutikulären Wachsen bestimmt werden. Bisher standen jedoch keine Methoden zur Verfügung, mit denen beide Schichten hätten selektiv beprobt werden können und es konnten somit keine direkten Beweise für die chemische Zusammensetzung erbracht werden.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden die kutikulären Wachse der Gleitzonen von *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia* Kannen vergleichend untersucht. Am Beispiel von *N. alata* wurden zunächst die kutikulären Wachse in drei unabhängigen Experimenten beprobt und analysiert. Durch die wiederholte Anwendung und Kombination verschiedener Methoden zur Wachspräparation von Pflanzenoberflächen, konnten sowohl die absoluten Mengen als auch die relativen Zusammensetzungen der epikutikulären Kristalle und intrakutikulären Wachse bestimmt werden. Basierend auf den Ergebnissen an *N. alata* sollten anschließend die am besten geeigneten Methoden verwendet werden, um die kutikulären Wachse von *N. albomarginata* und *N. intermedia* zu untersuchen.

---



### 3.4.1 Selektivität von Methoden zur mechanischen Wachspräparation

In allen drei Experimenten unterschieden sich bei *N. alata* die Gesamtausbeuten an Wachs von ca. 30 µg/cm<sup>2</sup> nicht signifikant und repräsentierten folglich die gesamte Belegung mit epi- und intrakutikulären Wachsen.

Werden alle Ergebnisse der chemischen Analysen und der Rasterelektronenmikroskopie zusammengefasst, kann die Selektivität der Methoden beurteilt werden. Die wiederholten Präparationen mit gefrorenem Wasser, die Oberflächenmaterial ausschließlich durch Adhäsion beprobten, lieferten stetig abnehmende Wachsmengen (vgl. Abb. 3.5). Folglich wurde in diesem Experiment eine mechanisch stabile Grenze erreicht, die mit höchster Wahrscheinlichkeit durch die äußere Grenze der Kutinpolymermatrix (vgl. Abb. 3.6d) definiert werden kann (Jetter et al. 2000). Wachsbestandteile jenseits dieser Grenze waren nur durch eine chemische Extraktion zu erreichen, was durch die erhöhte Wachsausbeute der Nachextraktion deutlich wurde (Abb. 3.5a). Demzufolge können die mechanisch präparierten Bestandteile als epikutikuläres Wachs bezeichnet werden, wohingegen die extrahierten Bestandteile intrakutikuläres Wachs darstellen. Die Regressionsanalyse zeigte, dass nur geringe Mengen an epikutikulärem Wachs, das nicht mit dem Kryo-Klebstoff gewonnen wurde, die Probe des intrakutikulären Wachses kontaminierte. Gefrorenes Wasser erwies sich daher als wirkungsvoller Klebstoff für die scharfe Unterscheidung zwischen den beiden Wachskompartimenten der Gleitzzone von *N. alata*. Von der gesamten Wachsbelegung waren 68% im epikutikulären Kompartiment lokalisiert.

Die Ergebnisse der Behandlungen mit Gummi arabicum unterschieden sich in einigen wesentlichen Aspekten von denen aus dem Experiment mit gefrorenem Wasser: (1) In den mechanischen Präparationsschritten mit Gummi arabicum konnte deutlich weniger Wachs gewonnen werden als mit gefrorenem Wasser (33% der Gesamtbelegung, vgl. Abb. 3.5). (2) Nach der Behandlung mit Gummi arabicum wurden in der anschließenden Nachextraktion mit Chloroform relativ hohe Anteile an Aldehyden gefunden (vgl. Abb. 3.7b) und (3) alle Substanzklassen zeigten in ihren Homologenmustern Merkmale sowohl der ersten Behandlung mit gefrorenem Wasser als auch der entsprechenden Nachextraktion (vgl. Abb. 3.8, 3.9). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die wiederholten mechanischen Behandlungen mit Gummi arabicum nicht ausreichten, um die epikutikulären Wachse vollständig von der Gleitzonenoberfläche zu entfernen. Die verbliebenen epikutikulären Bestandteile wurden daraufhin zusammen mit den intrakutikulären Wachsen in der anschließenden Chloroformextraktion freigesetzt. Folglich kann die intrakutikuläre Wachszusammensetzung durch die

---

Daten des Experiments mit Gummi arabicum nur qualitativ bewertet werden. Nichtsdestotrotz, die erste Behandlung mit Gummi arabicum war hoch selektiv für die epikutikulären Wachskristalle und konnte somit als Bekräftigung der entsprechenden Ergebnisse aus dem Experiment mit gefrorenem Wasser dienen.

Weiterhin konnte eine Schichtung innerhalb der Belegung mit epikutikulären Wachskristallen auf den Oberflächen von *N. alata* Kannen beobachtet werden. Unter der Verwendung beider Klebstoffe brachen die Kristalle in gleicher Höhe über ihrer Basis und hinterließen dabei Stümpfe mit fransigen Rändern (vgl. Abb. 3.6b). Daher verursachten Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften Schwachstellen zwischen den äußeren glattrandigen Teilen der Plättchen und deren darunter liegenden Enden auf der Oberfläche (oder in) der Kutikula. Die Wachspräparationen der ersten Behandlungen mit beiden Klebstoffen beinhalteten ausschließlich die äußersten Schichten des Kristallnetzwerkes und spiegelten daher spezifisch die chemische Zusammensetzung der Grenzfläche zwischen Pflanze und Insekt wider. Die relativ geringen Ausbeuten zusammen mit der intakten Struktur der entfernten Kristalle deuteten darauf hin, dass beide Klebstoffe in gleichem Maße selektiv für die äußersten Teile der Plättchen waren.

Auf Grund der höheren Effektivität in der Präparation der epikutikulären Wachse und der daraus folgenden Selektivität der anschließenden Extraktion für intrakutikuläre Wachse, wurde gefrorenes Wasser für die vergleichenden Untersuchungen der kutikulären Wachse weiterer *Nepenthes*-Arten verwendet. Gefrorenes Wasser erwies sich auch an *N. albomarginata* und *N. intermedia* als geeigneter Klebstoff für die selektive Präparation epikutikulärer Wachskristalle. Die rasterelektronenmikroskopische Kontrolle zeigte, dass ausschließlich die äußersten Teile des Kristallnetzwerkes mit dem ersten Präparationsschritt entfernt wurden (vgl. Abb. 3.16c, d). Analysen dieser Präparate lassen folglich vergleichende Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der Grenzflächen zwischen Pflanze und Insekt bei verschiedenen *Nepenthes*-Arten zu.

Die Ausbeuten der aufeinander folgenden Präparationen zeigten jedoch Unterschiede in der Effektivität, epikutikuläres Material zu entfernen. Während bei *N. alata* und *N. albomarginata* nach dem fünften Präparationsschritt nur sehr geringe Mengen auf den Oberfläche verblieben waren, hätten bei *N. intermedia* weitere Präparationen zusätzlich nennenswerte Wachsmengen geliefert. Die Stabilität des verwendeten Blattmaterials ließ jedoch mit zunehmender Anzahl an Präparationen nach. Nach fünf Behandlungen mit gefrorenem Wasser war das Gewebe gerade noch stabil genug, um für eine anschließende Extraktion mit Chloroform verwandt werden zu können. Damit ergaben sich für *N. intermedia* die gleichen

---

Einschränkungen für die Analyse der intrakutikulären Wachse, wie sie bei *N. alata* nach den Präparationen mit Gummi arabicum getroffen wurden. Das verbliebene epikutikuläre Material wurde zusammen mit den intrakutikulären Wachsen gewonnen. Daher ließ sich die chemische Zusammensetzung des intrakutikulären Wachses von *N. intermedia* anhand der Daten dieses Experimentes nur qualitativ bewerten.

#### 3.4.2 Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle und intrakutikulärer Wachse der Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten

Die mechanischen Präparationen kutikulärer Wachse unter Verwendung von gefrorenem Wasser als Klebstoff erwiesen sich als sehr selektiv für die äußersten Teile der epikutikulären Wachsplättchen. Die Ergebnisse der ersten Präparationen an den drei untersuchten *Nepenthes*-Arten erlauben es daher, die chemischen Zusammensetzungen der Kristalle direkt zu bestimmen und vergleichend zu untersuchen. Die Experimente zeigten übereinstimmend, dass die epikutikulären Wachsplättchen aller drei Arten hauptsächlich aus sehr langkettigen Aldehyden bestanden. (vgl. Abb. 3.7a; 3.17a, b). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Bildung der epikutikulären Wachskristalle durch Aldehyde ein für die Gattung *Nepenthes* charakteristisches Merkmal ist. Eichner (2003) analysierte unter Verwendung der für die vorliegende Arbeit entwickelten Methode die kutikulären Wachse der Gleitzonen von *N. khasiana* und einer weiteren, nicht endgültig zugeordneten Hybride (vorläufig als *N. superba* klassifiziert). In den epikutikulären Kristallen dieser Arten fanden sich mit 72% (*N. khasiana*) und 69% (*N. superba*) ebenfalls sehr hohe Anteile an langkettigen Aldehyden (Eichner 2003).

Die Gattung *Nepenthes* hat mit 82 bekannten Arten eine hohe Diversität erreicht und ist geographisch weit verbreitet (Danser 1928; Kurata 1976; Jebb und Cheek 1997). Meimberg et al. (2001) untersuchten anhand molekularbiologischer Daten von 71 Arten die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Nepenthes*. Zu den untersuchten Arten gehörten u.a. *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. khasiana*. Die phylogenetische Analyse stellte diese drei Arten dabei in drei deutlich getrennte Linien (Meimberg et al. 2001). Auch in ihren geographischen Hauptverbreitungsgebieten unterscheiden sich die drei Arten, von Assam (*N. khasiana*) über die malaiischen Inseln (*N. albomarginata*) bis zu den Philippinen (*N. alata*). Dennoch bestehen die epikutikulären Wachskristalle der bisher untersuchten Arten einheitlich zu großen Anteilen aus Aldehyden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich hierbei um ein relativ ursprüngliches Merkmal der Gattung *Nepenthes* handelt und evolutionär an die ökologische Funktion im Beutefang angepasst ist (s. auch Kap. 4.4.6,

4.4.7). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde begonnen, an weiteren Arten sowohl die chemische Zusammensetzung der Kristalle, als auch deren Verwandtschaftsverhältnisse anhand molekularbiologischer Daten zu analysieren.

Im Vergleich zu der einheitlichen Zusammensetzung auf Ebene der Substanzklassen, konnten jedoch Unterschiede in den Homologenmustern der Aldehyde bei verschiedenen *Nepenthes*-Arten gefunden werden. Auf der einen Seite waren die Aldehydfractionen der Wachskristalle von *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia* einheitlich von einem Homologen (Triacontanal) dominiert (vgl. Abb. 3.8c, 3.18c, 3.19c). Damit trug dieses einzelne Aldehyd-Homologe jeweils mit 43% (*N. alata*), 57% (*N. albomarginata*) und 51% (*N. intermedia*) zur gesamten Kristallmasse bei. Auf der anderen Seite waren bei *N. khasiana* und *N. superba* die Maxima der Homologenverteilungen weniger stark ausgeprägt und bei *N. superba* zum C<sub>32</sub>-Homologen verschoben. Triacontanal war bei *N. khasiana* zwar auch die Hauptkomponente (30% der gesamten Kristallmasse) trat bei *N. superba* mit 17% aber hinter Dotriacontanal (21%) zurück (Eichner 2003).

Aldehyde wurden in den kutikulären Wachsen verschiedener Pflanzenarten gefunden, stellten jedoch normalerweise nur eine Nebenkompente dar (Walton 1990). Es wurde auch beschrieben, dass sich Aldehyde in den epikutikulären Wachsplättchen von Reis und Zuckerrohr befinden können (Haas et al. 2001). Im Allgemeinen wurde diese charakteristische Kristallform auf verschiedenen Pflanzenarten jedoch mit der Anwesenheit von primären Alkoholen verbunden (Baker 1982; Barthlott et al. 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der in enger Zusammenarbeit erstellten Diplomarbeit (Eichner 2003), zusammen mit früheren Berichten zeigen, dass dieser Kristalltyp bei verschiedenen Pflanzenarten durch reine Alkohole, Aldehyde und möglicherweise durch Mischungen beider Substanzklassen gebildet werden kann. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, ob sich Plättchen, die aus Alkoholen oder Aldehyden bestehen, in ihren physikalischen Eigenschaften und ökologischen Funktionen unterscheiden (s. auch Kap. 4.4.6, 4.4.7).

Seit langem stand die Frage im Raum, ob Nebenkompenten zu epikutikulären Wachskristallen beitragen können. Die vorliegenden Analysen zeigten, dass zum Teil mehr als die Hälfte der Kristallmasse aus anderen Komponenten als Triacontanal bestand. Es konnten homologe Reihen von primären Alkoholen, Fettsäuren, Alkyl-Estern und Alkanen gefunden werden. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob diese Komponenten zufällig über das gesamte Kristallnetzwerk verteilt waren oder ob sie sich in bestimmten Kristallen anreicherten. Interessanterweise jedoch, wurden Substanzen mit ähnlicher Polarität, z.B. homologe C<sub>24</sub>-C<sub>32</sub> Aldehyde und Substanzen mit ähnlicher Molekülgeometrie, z.B. C<sub>30</sub>-

Aldehyd und C<sub>30</sub>-Alkohol, in besonders hohen Konzentrationen in den Kristallen gefunden. Die hohen Ähnlichkeiten zwischen den kristallisierenden Molekülen, zusammen mit der meist homogenen Erscheinung der Kristalle, könnte jedoch anzeigen, dass diese Komponenten cokrystallisieren.

Die Nachextraktion mit Chloroform im Experiment mit gefrorenem Wasser als Klebstoff erlaubte eine direkte Analyse der intrakutikulären Wachse der Gleitzzone von *N. alata* und *N. albomarginata* Kannen. Diese Wachsschichten enthielten nur gemäßigte Mengen an Aldehyden, jedoch relativ hohe Anteile an Alkoholen, Alkyl-Estern und bei *N. alata* auch an Triterpenoiden. Damit konnten für einzelne Substanzklassen distinkte Gradienten zwischen den epi- und intrakutikulären Schichten gefunden werden. Neben diesen Gradienten, v. a. in den relativen Aldehyd- und Alkoholmengen, waren auch deutliche Unterschiede in den relativen Anteilen einzelner Homologer innerhalb der beiden Substanzklassen ersichtlich. Interessanterweise waren Aldehyde und Alkohole mit besonders hohen Kettenlängen in den epikutikulären Kristallen angereichert, während die amorphen Mischungen der intrakutikulären Wachse homogenere Zusammensetzungen aufwiesen.

Die Zusammensetzungen der Wachse aufeinander folgenden Präparationen mit gefrorenem Wasser ließen kontinuierliche Übergänge zwischen denen der oberflächennächsten epikutikulären Kristallanteile und dem intrakutikulären Wachs erkennen. Mit Ausnahme der ersten Präparation, die ausschließlich die äußersten Teile der Plättchen erfasste, stellten die gewonnenen Wachse der folgenden Präparationsschritte keine definiert abgrenzbaren Schichten dar. Dennoch konnte davon ausgegangen werden, dass Wachsbestandteile aus unterschiedlichen horizontalen Lagen innerhalb der epikutikulären Kristallschicht in den einzelnen Präparaten angereichert waren. Die Gradienten in den Zusammensetzungen dieser Wachse, zusammen mit den Unterschieden zwischen epi- und intrakutikulärem Wachs quantifizierten erstmalig direkt die Hauptkomponenten innerhalb epikutikulärer Kristalle und bestätigten somit die ursprüngliche Hypothese, die die Kristallbildung als spontane Phasentrennung hoch konzentrierter Bestandteile beschreibt.

### 3.4.3 Gesamtwachsextraktionen

Die Experimente zur Bestimmung der Gesamtwachsbelegung der Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten durch wiederholte Extraktionen mit Chloroform zeigten, dass relativ hohe Lösungsmittelvolumina und erhöhte Temperaturen nötig waren, um die von Triacontanal dominierten epikutikulären Kristalle zu lösen. In den Experimenten an *N. albo-*

---

*marginata* und *N. intermedia* ergaben sich deutliche, wenn auch nicht signifikante Unterschiede in den Gesamtausbeuten an Wachs, verglichen mit denen aus den entsprechenden mechanischen Präparationen mit anschließender Extraktion (vgl. Abb. 3.15). Die raster-elektronenmikroskopische Kontrolle der Gleitzonenoberfläche von *N. albomarginata* nach fünf Extraktionen mit warmem Chloroform ließ jedoch keine Rückstände an epikutikulären Wachskristallen erkennen (vgl. Abb. 3.20d). Die Ursache für die Differenz in der Wachsbelegung könnte im Entwicklungszustand der beiden verwendeten Kannen gelegen haben. Für *N. alata* wurde beschrieben, dass sich die vom Deckel verschlossenen Kannen innerhalb von ca. 30-40 Tagen unter kontinuierlichem Wachstum entwickeln und nach dem Öffnen des Deckels voll funktionsfähig sind (Owen et al. 1999). Eichner (2003) beprobte die epikutikulären Wachse in unterschiedlichen Phasen des Kannenwachstums und fand, dass die Wachsbelegung dabei ständig anstieg und im letzten beprobten Intervall (3-7 Tage nach Deckelöffnung) am höchsten war. In der vorliegenden Arbeit wurden in allen Experimenten, mit einer Ausnahme, Kannen mit seit ca. 7-10 Tagen geöffneten Deckeln beprobt. Auf Grund stark limitierten Pflanzenmaterials wurde für die Gesamtwachsextraktion an *N. albomarginata* jedoch auf jüngere (ca. 5-7 Tage) Kannen zurückgegriffen. Es könnte daher vermutet werden, dass die Wachsbelegung dieser jungen Kannen niedriger war als die der mechanisch beprobten Kannen.

Im Gegensatz zu den Gesamtwachsextraktionen an *N. alata* und *N. albomarginata*, waren auf der Gleitzonenoberfläche von *N. intermedia* auch nach fünf Extraktionen mit warmem Chloroform deutliche Überreste epikutikulärer Kristalle zu erkennen (vgl. Abb. 3.20h). Diese Wachsmengen flossen folglich nicht in die Berechnung der Gesamtausbeute des Experiments ein und führten so zu Differenzen zu der im Experiment mit gefrorenem Wasser ermittelten Wachsbelegung.

Die Ergebnisse der Extraktionsexperimente stehen in offensichtlichem Gegensatz zu der guten Löslichkeit der meisten kutikulären Pflanzenwachse in organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur (Holloway 1984; Walton 1990; Bianchi, 1995). Obwohl synthetisches Triacental in Chloroform bei Raumtemperatur eine Löslichkeit von 50 mg/ml besitzt (Schmidt 2000), konnten unter denselben Bedingungen lediglich ca. 6 µg/ml derselben Komponente aus den Kristallen von *N. alata* gelöst werden. Dies deutet darauf hin, dass sehr langkettige Aldehyde in zwei Formen existieren können. Frühere Untersuchungen beschrieben dementsprechend eine monomere und polymere Form von Aldehyden in kutikulären Wachsen von Zuckerrohr (Lamberton und Redcliff 1960). Da die Polymere in organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur unlöslich waren, konnte ihre Struktur nicht vollständig

aufgeklärt werden (Lamberton 1965). Haas et al. (2001) berichteten, dass die epikutikulären Wachskristalle auf den Blattoberflächen von Zuckerrohr und Reis bei Raumtemperatur unlöslich waren, während heißes Chloroform diese auflöste und dabei hohe Anteile an Aldehyden freisetzte. Die Autoren schlossen daraus, dass sich die zuvor beschriebenen polymeren Aldehyde, zumindest teilweise, in den epikutikulären Kristallen befanden. In Übereinstimmung mit diesen Berichten kann vermutet werden, dass die Kristalle von *N. alata* Aldehyde in polymerer und somit unlöslicher Form enthielten.

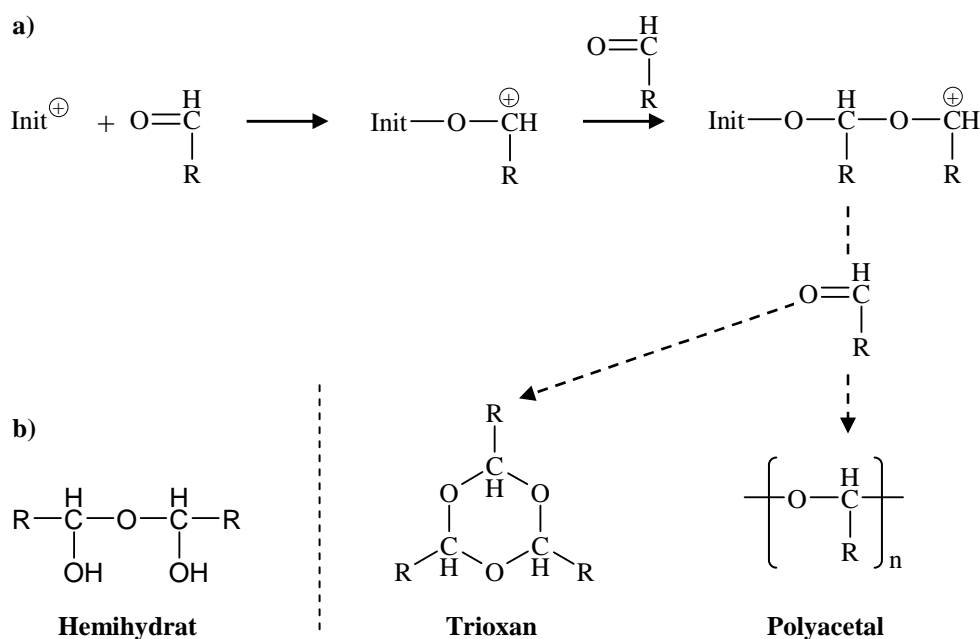
Soweit bekannt, ist in der Literatur nur ein Bericht über die chemische Zusammensetzung epikutikulärer Wachskristalle anderer *Nepenthes*-Arten vorhanden. Juniper et al. (1989) rieben die Gleitzonenoberfläche von *N. x williamsii* mit chloroform-getränkter Baumwolle ab. Dabei fanden sie, dass Aldehyde, Alkohole und Fettsäuren annähernd gleich zur Zusammensetzung beitrugen und konnten daher nicht auf die kristallbildende Substanz (oder Substanzklasse) zurück schließen. Aber die Autoren erwähnten auch, dass die Kristalle durch das Waschen mit Chloroform nicht vollständig entfernt werden konnten und erweckten somit Zweifel an der epikutikulären Herkunft deren Materials. Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde über das intrakutikuläre Wachs von *N. alata* sind sehr ähnlich zur berichteten Zusammensetzung des *N. x williamsii*-Wachses. Es erscheint daher möglich, dass hauptsächlich die intrakutikulären Wachse der letzteren Art analysiert wurden. Die entsprechenden epikutikulären Kristalle könnten polymere Aldehyde enthalten und würden sich daher signifikant von den intrakutikulären Wachsen unterscheiden.

Die Anwesenheit polymerer Aldehyde in den epikutikulären Kristallen von *N. alata* Kannen wurde weiterhin durch die Zusammensetzungen der Chloroformextrakte des dritten Experiments gestützt. Die erste und fünfte Extraktion lieferte Wachsmischungen (vgl. Abb. 3.11, 3.12), die ähnlich zu denen der chemisch extrahierten (Nachextraktion) bzw. mechanisch präparierten Proben des Experiments mit gefrorenem Wasser waren (vgl. Abb. 3.7a, 3.8). Im ersten Schritt wurden hauptsächlich die intrakutikulären Wachse extrahiert, während wenig Material aus den epikutikulären Kristallen gelöst werden konnte. Im Verlauf der aufeinander folgenden Extraktionen wurden alle leicht löslichen Wachsbestandteile entfernt und nur die chloroform-resistenten Kristalle verblieben auf der Oberfläche. Demzufolge lieferten die letzten Extraktionsschritte selektiv Bestandteile der epikutikulären Kristalle. Um die Hypothese der Existenz polymerer Aldehyde zu überprüfen, wurden epikutikuläre Wachskristalle von *N. alata* Infrarot-spektroskopisch untersucht (s. Kap. 4). Zuerst wurden dazu die für monomere Aldehyde charakteristischen Absorptionseigenschaften bestimmt und geprüft werden, ob diese in den Kristallen nachweisbar sind.

## 4 IR-Spektroskopische Analyse epikutikulärer Wachse von *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia*

### 4.1 Einleitung

Aldehyde besitzen eine stark polarisierte C=O-Doppelbindung und sind daher sehr reaktionsfreudige Verbindungen. Seit langem war von niederen Homologen wie Form- und Acetaldehyd (C<sub>1</sub> bzw. C<sub>2</sub>) bekannt, dass sie zur Bildung oligo- und polymerer Strukturen in der Lage sind (Staudinger 1920, 1936; Vogl 2000a). Diese Strukturen entstehen in Anwesenheit anionischer oder kationischer Initiatoren durch ionische Polymerisation in Form von Trioxanen oder Polyacetalen (Abb. 4.1a). Die Polymerisation von Aldehyden stellt im Allgemeinen eine Gleichgewichtsreaktion dar, deren Lage durch die Gibbsche Freie Standardenthalpie  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$  beschrieben werden kann. Die Polymerisation läuft nur dann spontan ab, wenn  $\Delta G^\circ$  insgesamt negativ und die Reaktion somit exergon ist. Dabei ist auf der einen Seite der Energiegewinn durch die Umbildung einer C=O-Doppelbindung in zwei C-O-Einfachbindungen relativ gering ( $\Delta H^\circ = -21$  kJ/mol; Vogl 2000a). Auf der anderen Seite erhöht die Polymerisation den Ordnungszustand, wodurch die Standardreaktionsentropie negativ wird ( $\Delta S^\circ < 0$ ). Daraus folgt, dass das Gleichgewicht mit steigenden Temperaturen (T) auf die Seite der Monomere verschoben wird bzw. niedrige Temperaturen die



**Abb. 4.1** Hypothetische Strukturen oligo- und polymerer Aldehyde in kutikulären Wachsen a) Bildung von Trioxanen und Polyacetalen aus aliphatischen Aldehyden durch ionische Polymerisation (hier kationisch).  $\text{Init}^+$  = kationischer Initiator (z.B.  $\text{H}^+$ ). b) Dimeres oder höher polymeres Hemihydrat nach Einlagerung von Wasser.  $\text{R} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$



Polymerisation fördern. Weiterhin wurde darauf hingewiesen, dass die Polymerisation zu Polyacetalen durch zusätzliche Enthalpieeffekte aus intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den sich bildenden Polymerketten begünstigt werden kann. Polymere Aldehyde fallen während ihrer Bildung oft als kristalline Feststoffe aus der Lösung aus und die Enthalpie dieser exothermen Reaktion liefert in vielen Fällen den größten Beitrag zur Gesamtenthalpie der Polymerisations-Kristallisationsreaktion (Vogl 2000a). Diese Effekte spiegeln sich auch im Phasenverhalten von Polyacetalen höherer Aldehyde (<C<sub>9</sub>) wider, die durch das unterschiedliche Schmelzen einerseits des Polyoxymethylen Rückgrades und andererseits der kristallinen Phase der aliphatischen Seitenketten zwei Schmelzpunkte aufwiesen (Vogl 2000a, 2000b).

Auf Grund der Fähigkeit von niederen Aldehyd-Homologen zur Polymerisation, stellte sich daher die zentrale Frage, ob auch sehr langkettige Aldehyde in kutikulären Wachsen verschiedener Pflanzenarten in oligo- oder polymeren Formen vorliegen können. Deren Existenz wurde schon früher vorgeschlagen (Lamberton und Redcliffe 1960; Lamberton 1965; Mladenova et al. 1976) und verschiedene chemische Formen wie Polyacetale, Trioxane und Hemihydrate diskutiert (Abb. 4.1a, b). Wurden bei Raumtemperatur chloroformunlösliche Rückstände kutikulärer Wachse von Zuckerrohr destilliert, traten im Destillat große Mengen aliphatischer Aldehyde auf, die in den entsprechenden Lösungen spektroskopisch kaum nachgewiesen werden konnten (Lamberton und Redcliffe 1960). Haas et al. (2001) konnten durch Chloroformextraktionen an Zuckerrohr- und Reisblättern zeigen, dass insbesondere die epikutikulären Wachskristalle bei Raumtemperatur nicht in Lösung gehen. Diese konnten erst durch Verwendung von heißem Chloroform (60°C) vollständig von den Oberflächen entfernt werden, wobei große Mengen an sehr langkettigen aliphatischen Aldehyden freigesetzt wurden. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde indirekt geschlossen, dass die Aldehyde im nativen Wachs in einer polymeren und somit unlöslichen Form vorlagen.

Zu ähnlichen Befunden führten die Extraktionsexperimente an epikutikulären Wachskristallen auf den Gleitzoneoberflächen verschiedener *Nepenthes*-Arten (vgl. Kap. 3.3.3.3, 3.3.6.3). Die Kristalle waren bei Raumtemperatur kaum in Chloroform löslich und zum vollständigen Entfernen der Kristalle wurden erhöhte Temperaturen (ca. 40°C) und relativ große Lösungsmittelvolumina benötigt. Die resultierenden Extrakte beinhalteten hauptsächlich sehr langkettige, aliphatische Aldehyde, insbesondere Triacontanal. Obwohl synthetisches Triacontanal bei Raumtemperatur eine Löslichkeit von 50 mg/ml besitzt (Schmidt 2000), konnten unter denselben Bedingungen lediglich ca. 6 µg/ml dieser Komponente aus den Kristallen von *Nepenthes* gelöst werden. In Analogie zu den früheren Befunden an

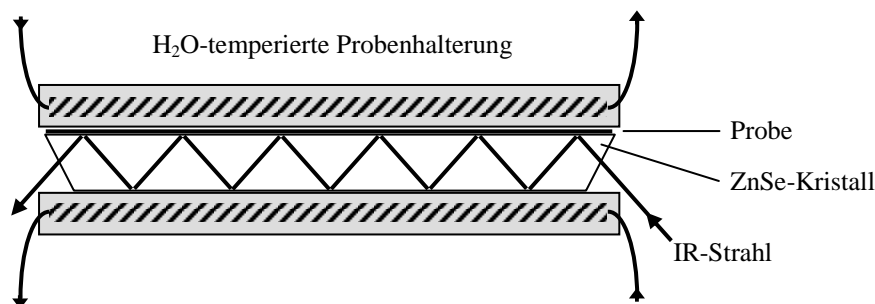
verschiedenen Pflanzenarten wurde daher vermutet, dass die Aldehyde vor der extraktiven Gewinnung im nativen Gleitzonenwachs von *Nepenthes* nicht in monomerer Form vorlagen. Bisher konnte auf die Form von Aldehyden in nativen Wachsen jedoch nur indirekt über das Lösungs- und Destillationsverhalten geschlossen werden. Um die Hypothese von polymeren Aldehyden direkt überprüfen zu können, müssen Präparations- und Analyseverfahren angewendet werden, bei denen das zu untersuchende Wachsmaterial weder hohen Temperaturen noch organischen Lösungsmitteln ausgesetzt wird.

Die Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) ist ein geeignetes Verfahren zur Identifizierung funktioneller Gruppen in organischen Molekülen und zur Untersuchung der molekularen Anordnung aliphatischer Verbindungen in verschiedenen Aggregatzuständen. Im Unterschied zu oligomeren und polymeren Strukturen sind monomere Aldehyde durch den Besitz einer freien C=O-Doppelbindung der Carbonyl-Gruppe charakterisiert. Diese neigt zu starken intra- und intermolekularen Wechselwirkungen und liefert Absorptionsbanden hoher Intensität in einem Spektralbereich, der wenig von anderen Gruppen in Anspruch genommen wird. Daher stellt die Carbonyl-Gruppe eine der infrarotspektroskopisch bestuntersuchten Gruppen dar und kann als Indikator für die vorliegende chemische Struktur der Aldehyde dienen (Iwahashi et al. 1990; Mantsch und McElhaney 1991; Chamel und Maréchal 1992; Ramirez et al. 1992). Darüber hinaus bietet sich insbesondere für die Untersuchung von Grenzflächen das FTIR-spektroskopische Aufnahmeverfahren der „abgeschwächten Totalreflexion“ (ATR, Attenuated Total Reflectance) an. Bei dieser Technik wird die Totalreflexion von Lichtstrahlung ausgenutzt, die dann auftritt, wenn der Strahl in einem optisch dichteren Medium unter einem bestimmten Winkel auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium auftrifft. Ein Teil der elektromagnetischen Energie dringt dabei jedoch immer einige Wellenlängen (1-10  $\mu\text{m}$ ) tief in das optisch dünnere Medium ein (Fringeli 1992). Wird dabei Strahlung vom optisch dünneren Medium absorbiert, fehlen die entsprechenden Wellenlängen im reflektierten Reststrahl. Als optisch dichtes Medium dient ein trapezförmig geschnittener Zink-Selenid-Kristall auf dessen Oberfläche die zu analysierende Probe (optisch dünneres Medium) aufgebracht wird (Abb. 4.2). Durch die Form des ZnSe-Kristalls wird der eintreffende IR-Strahl bis zu 50 mal an den Grenzflächen hin und her reflektiert und in Abhängigkeit von der Probe bei bestimmten Wellenlängen wiederholt abgeschwächt. Der resultierende Reststrahl wird dann als Absorptionsspektrum detektiert.

Bei der ATR-Technik ist ausschließlich die Grenzfläche zwischen dem ZnSe-Kristall und der Probe von Bedeutung und es wurde gezeigt, dass nach einer Rekristallisation kutikulärer

Wachse aus einer Lösung sowohl deren resultierende chemische Struktur als auch deren molekulare Anordnung analysiert werden kann (Merk et al. 1998). Zudem konnte mit Hilfe einer entsprechenden technischen Einrichtung parallel zur spektroskopischen Analyse die Temperatur des gesamten Versuchsaufbaus kontrolliert verändert werden (Abb. 4.2). Dadurch war es möglich, zusätzlich das Phasenverhalten rekristallisierter Wachse anhand der damit verbundenen Änderungen in deren molekularen Anordnung zu untersuchen (Merk et al. 1998). Rückschlüsse auf die Eigenschaften in nativem Zustand und die Bestimmung der Herkunft des Wachses bezüglich verschiedener kutikulärer Kompartimente waren bei einer extraktiven Gewinnung des Materials jedoch nicht möglich. Auf der anderen Seite konnte jedoch auch gezeigt werden, dass mit der ATR-Technik die Eigenschaften epikutikulärer Wachse bei physiologischen Temperaturen auch in nativem Zustand direkt auf der intakten Pflanzenoberfläche analysiert werden können (Dubis et al. 1999). Eine Analyse ausschließlich des epikutikulären Materials wäre allerdings bei Temperaturen oberhalb des Schmelzgebietes der beteiligten Komponenten nicht möglich, da sich im flüssigen Zustand die Bestandteile unterschiedlicher kutikulärer Kompartimente vermischen würden.

In Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit konnte hingegen gezeigt werden, dass epikutikuläre Wachskristalle rein mechanisch mit gefrorenem Wasser von Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten selektiv präpariert und auf künstliche Unterlagen transferiert werden können. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, das epikutikuläre Material isoliert von den darunter liegenden intrakutikulären Wachsen und ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel einer ATR-FTIR-spektroskopischen Analyse in einem weiten Temperaturbereich zuzuführen. Durch vergleichende Analysen an rekristallisierten und nativen Wachsen können dann die Effekte der Präparation mit gefrorenem Wasser auf die chemische Struktur



**Abb. 4.2** Schematischer Querschnitt durch den Probenträger für die Aufnahme von FTIR-Spektren im ATR-Modus. Das Probenmaterial befindet sich auf der Oberfläche eines trapezförmigen ZnSe-Kristalls, der allseitig von einer temperierbaren Probenhalterung umgeben ist. Als Wärmeträgerflüssigkeit dient destilliertes Wasser. Der IR-Strahl wird an der Grenzfläche zwischen ZnSe-Kristall und Probe unter probenspezifischer Abschwächung mehrfach totalreflektiert.

---

und molekulare Anordnung des Wachsmaterials kontrolliert werden.

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war es, durch eine Kombination der ATR-Technik mit unterschiedlichen Präparationsmethoden die epikutikulären Wachskristalle verschiedener *Nepenthes*-Arten FTIR-spektroskopisch zu charakterisieren. Die zentralen Fragen dabei waren, in welcher chemischen Form und molekularen Anordnung die Aldehyde in den Kristallen vorliegen und welchen Einfluss die Temperatur und Lösungsmittel auf diese Eigenschaften haben. Dazu erfolgte bei verschiedenen Temperaturen eine Charakterisierung der Absorptionseigenschaften

- (1) von synthetischen Triacontanal als Referenzsubstanz (23-95°C).
  - (2) von mechanisch präparierten epikutikulären Wachskristallen der Gleitzone von *N. alata* (23-95°C).
  - (3) von nativen epikutikulären Wachskristallen auf der intakten Gleitzoneoberfläche von *N. alata* (23-95°C).
  - (4) von mechanisch präparierten, anschließend in Chloroform gelöst und dann rekristallisierten epikutikulären Wachskristalle von *N. alata* (23°C).
  - (5) von mechanisch präparierten epikutikulären Wachskristallen der Gleitzone von *N. albomarginata* und *N. intermedia* (23-95°C).
-

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 FT-IR-Spektroskopie

Die Aufnahme der fourier-transformierten Infrarotspektren erfolgte mit einem FTIR-Spektrometer (Bio-Rad FTS 165; Bio-Rad, Krefeld, Deutschland) im Modus der horizontalen abgeschwächten Totalreflexion (h-ATR). Dafür befand sich im Probenraum des Spektrometers eine speziell angefertigte Probenhalterung, die einen trapezförmigen ZnSe-Kristall (Bio-Rad) zur Aufnahme der Wachsproben umschloss (Abb. 4.2). Über einen Wasserkreislauf konnte eine am Thermostaten (Haake F3-C; Haake, Karlsruhe, Deutschland) eingestellte Temperatur an die Probe weitergegeben werden, wobei der Istwert mit einem Temperaturfühler direkt an der Probenhalterung abgegriffen wurde. Der Probenraum wurde konstant mit getrockneter Luft (Purge gas generator 75-45; Whatman, Haverhill, MA, USA) gespült. IR-Spektren wurden entweder bei 23°C oder in einem Temperaturbereich von 23-95°C in 2°C-Schritten für einen Wellenzahlbereich von 4000-670 cm<sup>-1</sup> aufgenommen. Die Auflösung betrug 4 cm<sup>-1</sup> und für jede Temperatur wurden 10 Scans gemittelt.

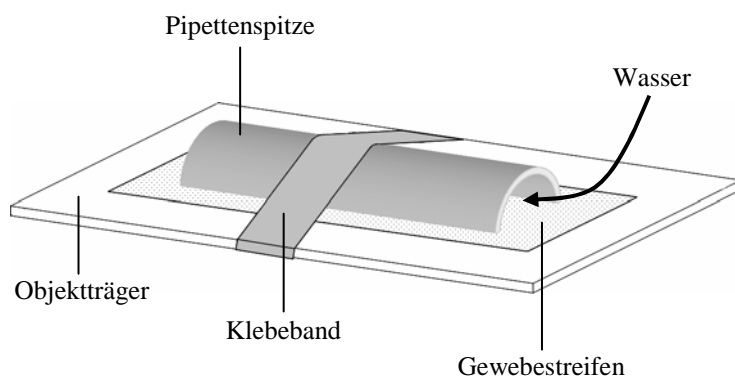
### 4.2.2 Pflanzenmaterial

Pflanzen von *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia* stammten aus einer kontinuierlichen Gewächshauskultur des Botanischen Gartens der Universität Würzburg. Die Kannen wurden direkt vor den Experimenten von den Pflanzen getrennt. Dazu wurde der Übergang der Ranke zur Kanne zerschnitten, wobei gleichzeitig die Flüssigkeit aus dem Inneren der Kanne abgelassen werden konnte, ohne diese mit der Gleitzonenoberfläche in Berührung zu bringen. Aus den Gleitzonenwänden wurden Gewebestreifen ausgeschnitten (ca. 10 x 35 mm) und ohne weitere Behandlung verwendet.

### 4.2.3 Präparation epikutikulärer Wachskristalle

(i) Für die FTIR-spektroskopische Untersuchung im ATR-Modus wurden die epikutikulären Wachskristalle von Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten mechanisch präpariert und auf einen ZnSe-Kristall deponiert. Dazu wurde die für die chemische Analyse entwickelte Kryo-Methode abgewandelt (vgl. Kap. 3.2.3.1). Zuerst wurde ein Gewebestreifen der Gleitzonenwand mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt (Abb. 4.3). Um

das zunächst flüssige Wasser auf der Gewebeoberfläche fixieren zu können, wurden Pipettenspitzen (epT.I.P.S., 1000 $\mu$ l; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) der Länge nach halbiert und die Mittelteile (Länge ca. 30 mm) herausgeschnitten. Die so erhaltenen Rinnen wurden an einem Ende mit Parafilm verschlossen und auf dem Gewebestreifen mit Klebeband fixiert. Der Hohlraum zwischen Gewebeoberfläche und Pipettenspitze wurde vollständig mit deionisiertem Wasser befüllt und der Aufbau in flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem vollständigen Gefrieren des Wassers, wurde das Klebeband zerschnitten und die Pipettenspitze samt Eisblock und daran anhaftenden Wachskristallen von der Gewebeoberfläche abgehoben. Nach Erwärmen der Außenseite der Pipettenspitze konnte der Eisblock auf dem ZnSe-Kristall abgesetzt werden. Während des Auftauens wurde überschüssiges Wasser vorsichtig mit Zellstoff entfernt, wobei flächige Schollen aus epikutikulärem Wachs auf dem ZnSe-Kristall zurückblieben. Der Vorgang wurde mehrfach mit jeweils frischen Gewebestreifen wiederholt, bis die gesamte Oberfläche des ZnSe-Kristalls (ca. 7,5 cm<sup>2</sup>) flächendeckend mit Wachsmaterial (ca. 200-300  $\mu$ g) belegt war. Der ZnSe-Kristall wurde anschließend in die Probenhalterung eingesetzt und über Nacht getrocknet.



**Abb. 4.3** Schematischer Aufbau der mechanischen Präparation epikutikulärer Wachskristalle für die FTIR-spektroskopische Untersuchung im ATR-Modus. Eine der Länge nach halbierte Pipettenspitze dient zur Fixierung des flüssigen Wassers auf der Oberfläche eines Gewebestreifens. Diese Anordnung wird durch einen Klebestreifen mit einem Objektträger verbunden und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren.

(ii) Für die Rekristallisation epikutikulärer Wachse aus einer Chloroformlösung wurden die Wachskristalle mit Hilfe der Kryo-Methode präpariert (Kap. 3.2.3.1) und in einem 2-Phasensystem aus je 4 ml Wasser und Chloroform gelöst. Die weiteren Aufbereitungsschritte entsprachen dabei dem Protokoll für die Probenvorbereitung zur gaschromatographischen Analyse, wobei die Proben jedoch keiner Behandlung mit BSTFA unterzogen wurden. Die resultierende Wachslösung (ca. 100  $\mu$ l) wurde dann tropfenweise auf den ZnSe-Kristall verteilt. Während des Verdampfens des Lösungsmittels bildete sich dabei ein flächiger

Wachsbelag. Um Lösungsmittelreste zu entfernen, wurde der ZnSe-Kristall in die Probenhalterung eingesetzt und über Nacht stehen gelassen.

(iii) Für die Analyse nativer Gleitzonenoberflächen wurden 2-3 Gewebestreifen (ca. 9 x 30 mm) aus den Kannenwänden der Gleitzone von *N. alata* herausgeschnitten. Die Gewebestreifen wurden dann flächendeckend, mit der physiologischen Kanneninenseite direkt auf den ZnSe-Kristall gelegt. Durch die Verschraubung der Probenhalterung wurde das Blattmaterial fixiert und leicht an die Oberfläche des ZnSe-Kristalls gepresst.

#### 4.2.4 Extraktion des ZnSe-Kristalls

Um deponiertes oder rekristallisiertes Wachs gaschromatographisch oder wiederholt FTIR-spektroskopisch untersuchen zu können, wurde der ZnSe-Kristall in warmem Chloroform extrahiert. Dazu wurde der Kristall in ein Reagenzglas gestellt, das Gefäß mit Chloroform (ca. 6 ml) aufgefüllt und der Ansatz für 30 min. in ein Wasserbad (ca. 40°C) gegeben. Das Chloroform wurde anschließend abgezogen und die Lösung bis zur Trockenheit unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom eingedampft. Der Rückstand wurde dann entweder für die gaschromatographische Analyse vorbereitet (s. Kap. 3.2.5) oder in ca. 100 µl Chloroform aufgenommen und erneut auf dem ZnSe-Kristall rekristallisiert.

#### 4.2.5 Triacontanal-Standard

Triacontanal wurde durch Oxidation des entsprechenden primären Alkohols (1-Triacontanol; 99%, Sigma, Steinheim, Deutschland) gewonnen. Die Aldehydlösung stammte aus einer Synthese mit Pyridiniumchlorochromat (s. Kap. 2.2.2) und zeigte keine Verunreinigungen, so dass sie ohne weitere Aufreinigung verwendet werden konnte. Ca. 500 µl dieser Lösung wurden tropfenweise auf den ZnSe-Kristall aufgetragen. Während des Verdampfens des Lösungsmittels bildete sich dadurch ein flächiger Wachsbelag (ca. 400 µg). Um Lösungsmittelreste zu entfernen, wurde der ZnSe-Kristall in die Probenhalterung eingesetzt und über Nacht stehen gelassen.

### 4.3 Ergebnisse

#### 4.3.1 Phasenverhalten von *n*-Triacontanal

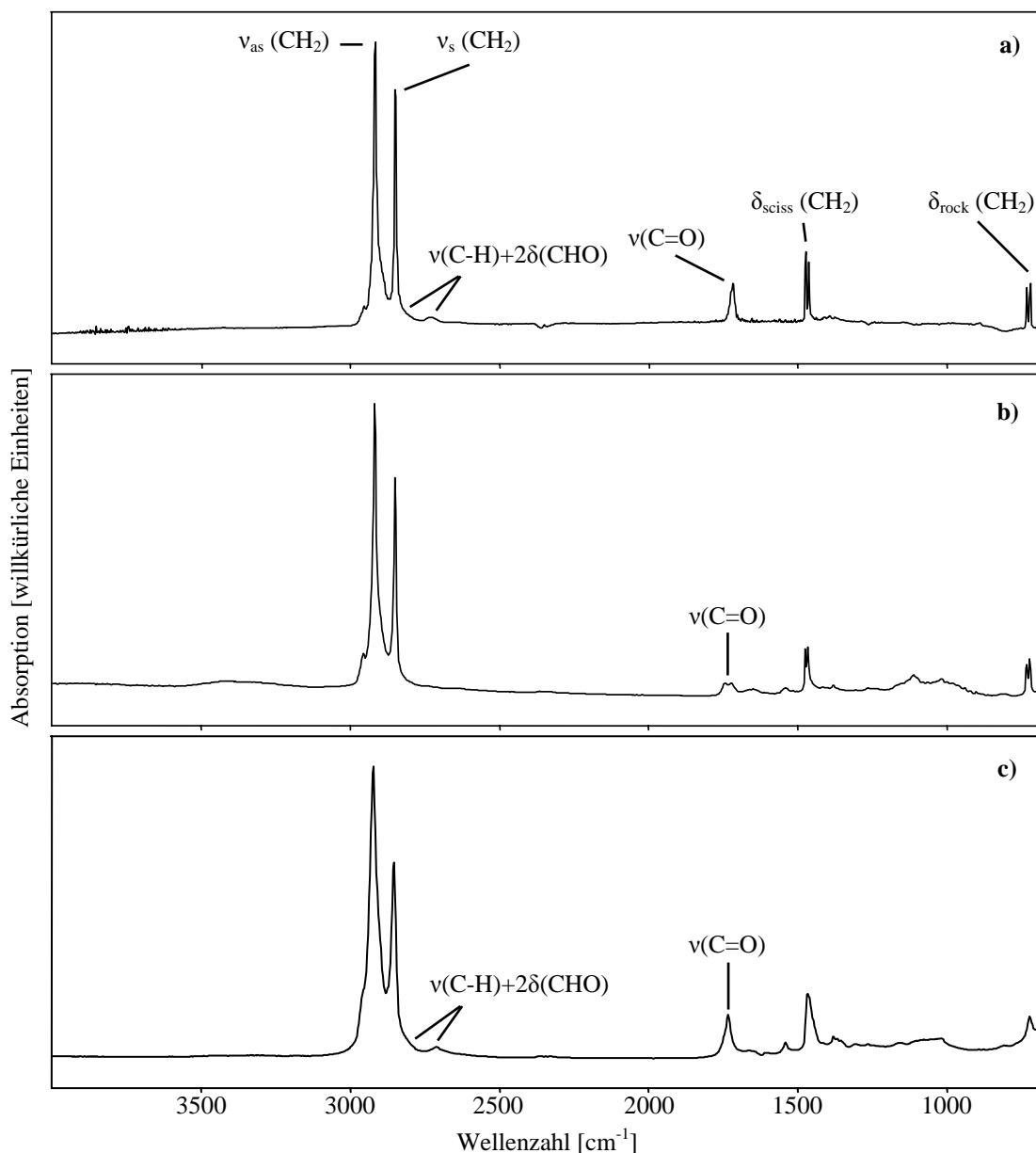
Als Referenz für die Zuordnung der Absorptionsbanden diene synthetisches Triacontanal, das aus einer Chloroformlösung auf dem ZnSe-Kristall kristallisiert wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass der Aldehyd hier in monomerer Form vorlag. Bei 23°C wies das Spektrum von Triacontanal im Wellenzahlbereich von 4000 cm<sup>-1</sup> bis 670 cm<sup>-1</sup> mehrere charakteristische Banden auf (Abb. 4.4a). Die zwei intensiven Banden mit Absorptionsmaxima bei ca. 2917 cm<sup>-1</sup> und ca. 2849 cm<sup>-1</sup> konnten den asymmetrischen ( $\nu_{as}$ ) und symmetrischen ( $\nu_s$ ) CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen zugeordnet werden. Durch Scher- ( $\delta_{sciss}$ ) und Wiegeschwingungen ( $\delta_{rock}$ ) der Methylen-Gruppen entstanden Bandendoublets mittlerer Intensität bei ca. 1472-1462 cm<sup>-1</sup> bzw. ca. 730-720 cm<sup>-1</sup>. Bei ca. 1718 cm<sup>-1</sup> befand sich eine Bande mittlerer Intensität, die durch Streckschwingungen der Carbonyl-Gruppe ( $\nu(C=O)$ ) verursacht wurde. Weiterhin war ein für monomere Aldehyde charakteristisches Bandendoppel bei 2900-2800 cm<sup>-1</sup> und 2775-2695 cm<sup>-1</sup> erkennbar (Abb. 4.4a). Diese Banden hatten ihren Ursprung in einer Fermi-Resonanz der C-H-Streckungsschwingungen ( $\nu(CH)$ ) am Carbonyl-Kohlenstoff mit dem ersten Oberton der H-C=O-Deformationsschwingung ( $2\delta(CHO)$ ).

Um das Phasenverhalten des synthetischen Triacontanal zu untersuchen, wurde die Probe kontinuierlich von 23°C auf 95°C erhitzt und in Intervallen von 2°C IR-Spektren aufgenommen. Dabei zeigten die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Schwingungsbanden der Methylen-Gruppen Veränderungen in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Bandenmaxima der asymmetrischen und symmetrischen Streckschwingungen verschoben sich von 2917 cm<sup>-1</sup> und 2849 cm<sup>-1</sup> bei 23°C nach 2922 cm<sup>-1</sup> und 2853 cm<sup>-1</sup> bei 95°C (Abb. 4.5). Die Verschiebung der Peakmaxima mit steigender Temperatur lässt sich auf Konformationsänderungen (Zunahme von *gauche*-Konformeren) innerhalb der Alkylketten zurückführen. Damit geht eine Zunahme der Unordnung zwischen den Alkylketten einher. Anhand der Auftragung der Wellenzahlmaxima gegen die Temperatur kann der Phasenübergang von fest nach flüssig und somit die Schmelzkurve des aliphatischen Anteils des Wachses abgelesen werden. Diese Veränderungen finden bei Reinsubstanzen sprunghaft um den Schmelzpunkt statt, während Gemische verschiedener Substanzklassen einen breiteren Übergangsbereich zeigen. An die Daten der asymmetrischen Streckschwingungen wurde eine sigmoidale Kurvengleichung angepasst und daraus der Schmelzbereich (5% bis 95% der Wellenzahländerung) und die Schmelzmitte (50% der Wellenzahländerung) bestimmt. Für Triacontanal



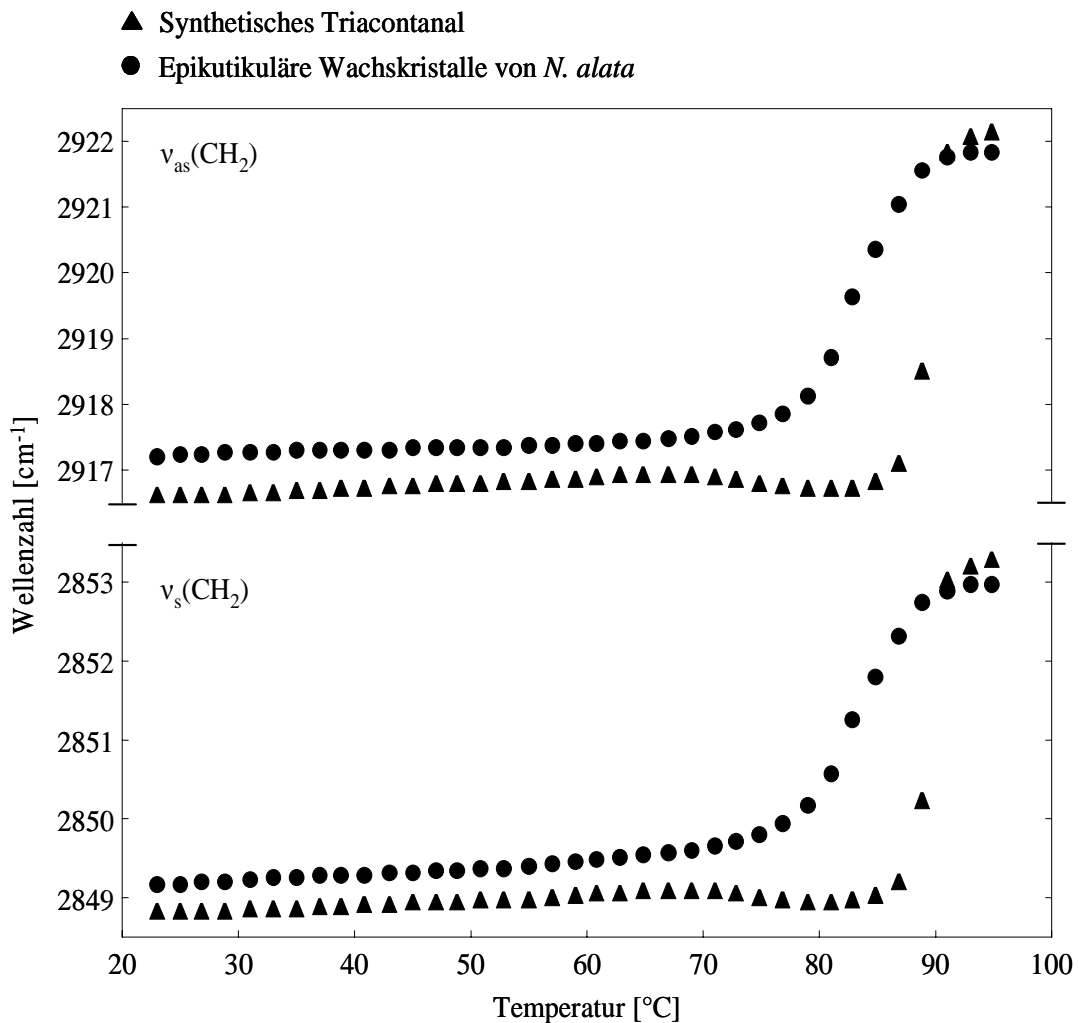
zeigte sich dabei ein enger Schmelzbereich von 88°C bis 91°C, wobei die Schmelzmitte bei 90°C lag (Abb. 4.5).

Auch die Bandendoublets bei 1472-1462  $\text{cm}^{-1}$  bzw. 730-720  $\text{cm}^{-1}$  waren stark temperaturabhängig. Die Frequenzaufspaltung der  $\text{CH}_2$ -Scher- und  $\text{CH}_2$ -Wiegeschwingungen weist auf eine orthorhombische Kristallstruktur der Kohlenwasserstoffketten hin. Mit zunehmender Temperatur konnte eine starke Abnahme der Absorption in den beiden Maxima sowohl der  $\text{CH}_2$ -Scher- (Abb. 4.6a) als auch der  $\text{CH}_2$ -Wiegeschwingungen (Abb. 4.6b) beobachtet



**Abb. 4.4** ATR-FTIR-Spektren (4000-670  $\text{cm}^{-1}$ ) von a) rekristallisiertem, synthetischem *n*-Triacontanal bei 23°C, b, c) epikutikulären Wachs kristallen von *N. alata* Gleitzonen nach mechanischer Präparation und Deponieren mit gefrorenem Wasser bei 23°C (b) und 95°C (c).

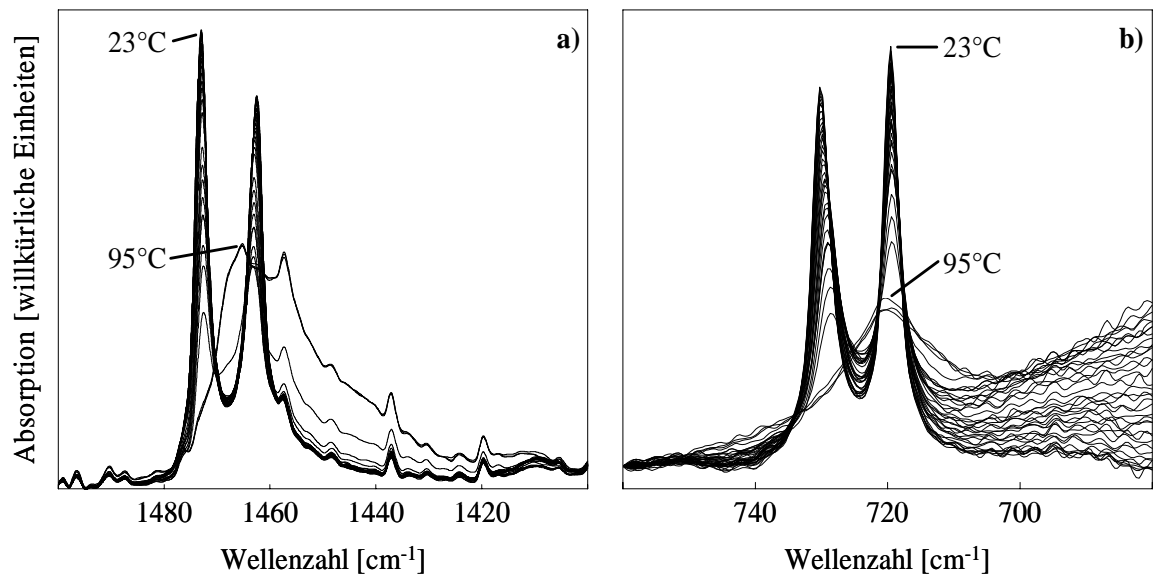
$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ : asymmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung;  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ : symmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung;  $\nu(\text{C-H})+2\delta(\text{CHO})$ : Resonanzschwingung der Carbonyl-C-H-Streck- mit dem 1. Oberton der H-C=O-Deformationsschwingung (Fermi-Resonanz);  $\nu(\text{C=O})$ : Carbonyl-Streckschwingung;  $\delta_{\text{sciss}}(\text{CH}_2)$ :  $\text{CH}_2$ -Scherschwingung;  $\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$ :  $\text{CH}_2$ -Wiegeschwingung.



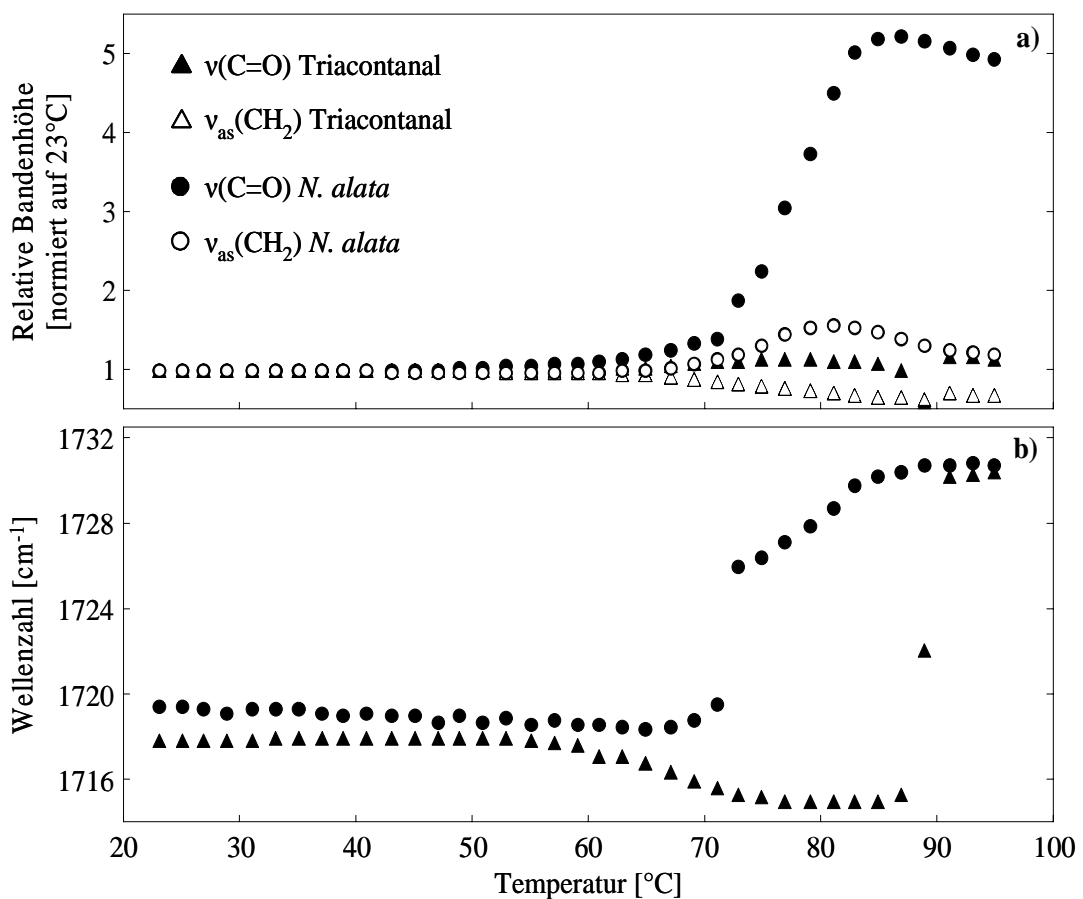
**Abb. 4.5** Wellenzahlen [ $\text{cm}^{-1}$ ] der Bandenmaxima der asymmetrischen ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ) und symmetrischen ( $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung in Abhängigkeit von der Temperatur (23-95 $^{\circ}\text{C}$ ) in ATR-FTIR-Spektren von rekristallisiertem, synthetischem *n*-Triacontanal und mechanisch präparierten epikutikulären Wachskristallen von *N. alata*.

werden. Zwischen den Aufnahmen der Spektren bei 89 $^{\circ}\text{C}$  und 91 $^{\circ}\text{C}$  gingen beide Bandendoublets in Einzelbanden über, und zeigten somit den Übergang von einem orthorhombisch-kristallinen in einen amorphen Zustand des Wachses an. Das Auflösen der orthorhombisch-kristallinen Struktur fiel dabei mit der berechneten Schmelzmitte zusammen.

Gleichzeitig mit den für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden, zeigte auch die für die funktionelle Gruppe charakteristische Streckschwingungsbande ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) temperaturabhängige Veränderungen. Während die relative Bandenintensität über den gesamten Temperaturbereich relativ konstant blieb (Abb. 4.7a), verschob sich das Peakmaximum von ca. 1718  $\text{cm}^{-1}$  bei 23 $^{\circ}\text{C}$  nach ca. 1730  $\text{cm}^{-1}$  bei 95 $^{\circ}\text{C}$  (Abb. 4.7b). Nach einer leichten Verringerung der Wellenzahl bis ca. 77 $^{\circ}\text{C}$ , vollzog sich diese Verschiebung sprunghaft in einem engeren Temperaturbereich von 87-91 $^{\circ}\text{C}$  mit der Mitte (50% der Wellenzahländerung) bei 89 $^{\circ}\text{C}$ .



**Abb. 4.6** Überlagerung von ATR-FTIR-Spektren von rekristallisiertem, synthetischem *n*-Triacontanal bei Temperaturen von 23-95°C in Intervallen von 2°C. a) Absorptionsregion (1500-1400 cm<sup>-1</sup>) der CH<sub>2</sub>-Scher-schwingung. b) Absorptionsregion (800-680 cm<sup>-1</sup>) der CH<sub>2</sub>-Wiegeschwingung.



**Abb. 4.7** a) Relative Höhe der Absorptionsbanden der Carbonyl-Streckschwingungen ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) und der asymmetrischen CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ) in ATR-FTIR-Spektren von rekristallisiertem, synthetischem *n*-Triacontanal und epikutikulären Wachskristallen von *N. alata* in Abhängigkeit von der Temperatur (23-95°C). Alle Werte sind auf den entsprechenden Wert bei 23°C normiert. b) Wellenzahlen [cm<sup>-1</sup>] der Bandenmaxima der Carbonyl-Streckschwingungen ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) in ATR-FTIR-Spektren von rekristallisiertem, synthetischem *n*-Triacontanal und epikutikulären Wachskristallen von *N. alata* in Abhängigkeit von der Temperatur (23-95°C).

4.3.2 Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle von *N. alata*

Die epikutikulären Wachskristalle konnten mit der modifizierten Kryo-Methode mechanisch von der Gleitzonenoberfläche einer *N. alata* Kanne präpariert und auf den ZnSe-Kristall des IR-Spektroskops flächendeckend deponiert werden. Bei 23°C war das Spektrum durch drei Gruppen von Absorptionsbanden dominiert (Abb. 4.4b). Die zwei intensiven Banden mit Absorptionsmaxima bei ca. 2917 cm<sup>-1</sup> und ca. 2849 cm<sup>-1</sup> entsprachen den asymmetrischen ( $\nu_{as}$ ) und symmetrischen ( $\nu_s$ ) Streckschwingungen der Methylen-Gruppen. Die Bandendoublets mit mittlerer Intensität bei ca. 1472-1462 cm<sup>-1</sup> bzw. ca. 730-720 cm<sup>-1</sup> konnten den Scher- ( $\delta_{sciss}$ ) und Wiegeschwingungen ( $\delta_{rock}$ ) der Methylen-Gruppen zugeordnet werden. Obwohl die chemischen Analysen auf der einen Seite zeigten, dass die Wachskristalle von *N. alata* hauptsächlich aus Triacontanal bestehen, konnte im Gegensatz zum synthetischen Triacontanal (vgl. Abb. 4.4a) keine intensive Streckwingungsbande der Carbonyl-Gruppe im Wellenzahlbereich von 1760-1710 cm<sup>-1</sup> beobachtet werden. Hier war lediglich eine mehrgipfelige Absorptionsbande mit geringer Intensität vorhanden. Auf der anderen Seite war aus den chemischen Analysen bekannt, dass sich in den Wachskristallen geringfügige Beimengungen von Fettsäuren und Alkyl-Estern befinden, deren Carbonyl-Gruppen ebenfalls in diesem Wellenzahlbereich absorbieren können. Neben dem Fehlen einer intensiven Streckwingungsbande ( $\nu(C=O)$ ) konnte auch das für monomere Aldehyde charakteristische Bandendoppel der Fermi-Resonanz nicht beobachtet werden (Abb. 4.4b).

Um das Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle zu untersuchen, wurde die Probe kontinuierlich von 23°C auf 95°C erhitzt und in Intervallen von 2°C IR-Spektren aufgenommen. Dabei zeigten die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Schwingungsbanden die gleichen temperaturabhängigen Veränderungen, wie sie auch in den Spektren des synthetischen Triacontanal beobachtet wurden (Abb. 4.5). Die Bandenmaxima der asymmetrischen und symmetrischen Streckschwingungen verschoben sich von 2917 cm<sup>-1</sup> und 2849 cm<sup>-1</sup> bei 23°C nach 2922 cm<sup>-1</sup> und 2853 cm<sup>-1</sup> bei 95°C. An die Daten der asymmetrischen Streckschwingungen wurde eine sigmoidale Kurvengleichung angepasst und daraus der Schmelzbereich und die Schmelzmitte bestimmt. Im Vergleich zu synthetischem Triacontanal vollzog sich der Phasenübergang von fest nach flüssig bei den Wachskristallen von *N. alata* in einem breiteren Temperaturbereich von 75°C bis 91°C mit der Schmelzmitte bei 83°C (Abb. 4.5). Die Frequenzaufspaltungen der CH<sub>2</sub>-Scher- und CH<sub>2</sub>-Wiegeschwingungen bei 1472-1462 cm<sup>-1</sup> bzw. 730-720 cm<sup>-1</sup> zeigten mit zunehmender Temperatur ein ähnliches Verhalten, wie es auch bei synthetischem Triacontanal beobachtet werden konnte

(vgl. Abb. 4.6). Im Wachs der Kristalle von *N. alata* vollzog sich der Übergang zu Einzelbanden für  $\delta_{\text{sciss}}(\text{CH}_2)$  jedoch bei 79°C und für  $\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$  bei 85°C. Der Endpunkt des orthorhombisch-kristallinen Zustandes fiel damit ebenfalls in den Temperaturbereich des fest-flüssig Übergangs.

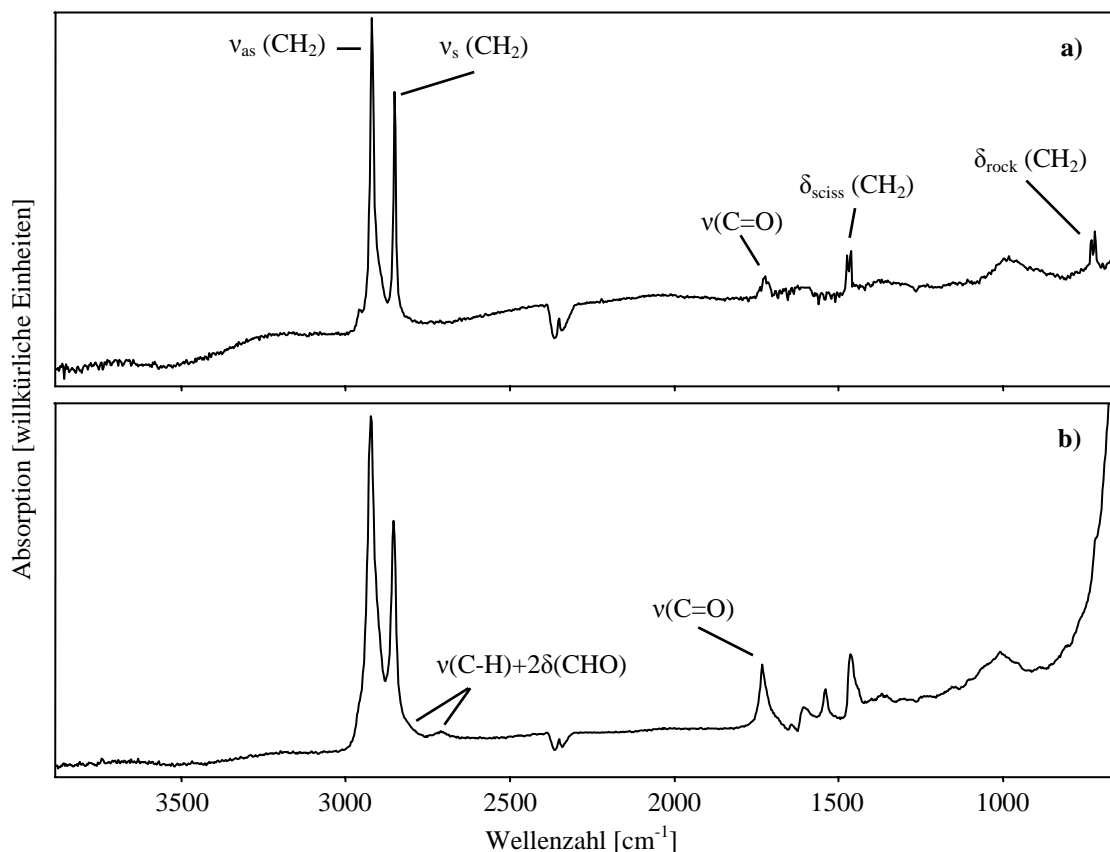
Mit zunehmender Temperatur zeigten sich zudem starke Veränderungen in den für monomere Aldehyde charakteristischen Wellenzahlbereichen. Ab einer Temperatur von 79°C wurde das Bandendoppel der Fermi-Resonanz bei 2900-2800  $\text{cm}^{-1}$  und 2775-2695  $\text{cm}^{-1}$  sichtbar und war bei 95°C schließlich deutlich zu erkennen (Abb. 4.4c). Zudem konnte ein starker Anstieg der Intensität der Carbonyl-Bande bei ca. 1719  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden (Abb. 4.7a). Im Vergleich zur Absorption bei 23°C, erhöhte sich die Intensität dieser Bande im Temperaturbereich von ca. 69-85°C um einen Faktor 5,6 (Abb. 4.7a). Gleichzeitig mit dem Anstieg der Intensität verschob sich die Lage der Bande ab 69°C von 1719  $\text{cm}^{-1}$  nach 1731  $\text{cm}^{-1}$  bei 91°C (Abb. 4.7b). Im Gegensatz zur Intensitätsänderung der Carbonyl-Bande, veränderte sich die Intensität der asymmetrischen Streckschwingungsbande jedoch nur um einen Faktor 1,6 (Abb. 4.7a). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Erhöhung der Carbonyl-Bande durch eine Intensitätssteigerung des Gesamtspektrums zustande kam.

Es sollte weiterhin überprüft werden, ob durch chemische Reaktionen während der thermischen Belastung zusätzlich Säuren oder Alkyl-Ester entstanden, die dann ebenfalls zu einer Erhöhung der Carbonyl-Bande geführt hätten. Dazu wurde der ZnSe-Kristall im Anschluss an die Messreihe ausgiebig in warmem Chloroform extrahiert und die resultierende Lösung gaschromatographisch und massenspektrometrisch analysiert. Das zuvor IR-spektroskopisch untersuchte Wachs enthielt 9% Fettsäuren und 3% Alkyl-Ester und zeigte damit im Vergleich zur chemischen Zusammensetzung der Wachse aus den Experimenten zur mechanischen Präparation (vgl. Kap. 3.3.3) keine erhöhten Anteile dieser Substanzklassen. Eine Erhöhung der Carbonyl-Bande durch oxidative Umsetzungen der Aldehyde oder andere Nebenreaktionen konnten somit ausgeschlossen werden.

In den epikutikulären Wachskristallen von *N. alata* ließen sich bei Temperaturen <69°C keine für monomere Aldehyde charakteristischen Absorptionsbanden erkennen. Diese traten erst nach einer Temperaturerhöhung und einem damit einhergehenden Schmelzen des Wachses auf.

4.3.3 Einfluss der Präparationsmethode auf die Form der Aldehyde in epikutikulären Wachskristallen von *N. alata*

In einem weiteren Experiment sollte getestet werden, ob die Anwesenheit von Wasser und die Temperatur ( $<-196^{\circ}\text{C}$ ) beim transferieren der epikutikulären Wachskristalle auf den ZnSe-Kristall einen Einfluss auf den Zustand des Waxes hatte. Dazu wurden Gewebescheiben aus der Gleitzzone von *N. alata* ausgeschnitten und ohne weitere Behandlung direkt auf den ZnSe-Kristall aufgebracht. Das resultierende Spektrum der nativen Wachskristalle bei  $23^{\circ}\text{C}$  (Abb. 4.8a) war weitgehend identisch mit dem der mit gefrorenem Wasser deponierten Wachskristalle (vgl. Abb. 4.4b). Die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden wiesen auf einen festen Zustand mit orthorhombischer Kristallstruktur hin. Im Wellenzahlbereich von  $1760\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$  war eine mehrgipfelige Absorptionsbande der verschiedenen C=O-Streckschwingungen mit geringer Intensität zu erkennen (Abb. 4.8a). Das für monomere charakteristische Banden-Doppel bei  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  und  $2775\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$  fehlte jedoch.



**Abb. 4.8** ATR-FTIR-Spektren ( $4000\text{-}670\text{ cm}^{-1}$ ) von nativen epikutikulären Wachskristallen auf intakten Gewebestreifen aus der Gleitzzone von *N. alata* bei a)  $23^{\circ}\text{C}$  und b)  $90^{\circ}\text{C}$ .

v<sub>as</sub>(CH<sub>2</sub>): asymmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung; v<sub>s</sub>(CH<sub>2</sub>): symmetrische CH<sub>2</sub>-Streckschwingung; v(C-H)+2δ(CHO): Resonanzschwingung der Carbonyl-C-H-Streck- mit dem 1. Oberton der H-C=O-Deformationsschwingung (Fermi-Resonanz); v(C=O): Carbonyl-Streckschwingung; δ<sub>sciss</sub>(CH<sub>2</sub>): CH<sub>2</sub>-Scherschwingung; δ<sub>rock</sub>(CH<sub>2</sub>): CH<sub>2</sub>-Wiegenschwingung.

Die Probe wurde dann kontinuierlich erhitzt und dabei in regelmäßigen Temperaturintervallen IR-Spektren aufgenommen. Während der Temperaturerhöhung konnten auf der einen Seite die für das Schmelzen des Wachses charakteristischen Veränderungen an den für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden beobachtet werden. Bei einer Temperatur von 90°C waren sowohl die Maxima von  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  und  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$  zu höheren Wellenzahlen verschoben als auch die Bandendupletts von  $\delta_{\text{sciss}}(\text{CH}_2)$  und  $\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$  zu Einzelbanden verschmolzen (Abb. 4.8b). Auf der anderen Seite war nun das für monomere Aldehyde typische Bandendoppel der Fermi-Resonanz deutlich zu erkennen und die Intensität der Carbonyl-Bande ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) war deutlich erhöht (Abb. 4.8b). Im Vergleich zum Spektrum bei 23°C war die Intensität dieser Bande um einen Faktor 6,1 erhöht. Die Intensität des gesamten Spektrums, gemessen an der Intensität von  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ , lag hingegen nur um das 1,8-fache höher. Das Spektrum der nativen Wachskristalle nach dem Schmelzen (Abb. 4.8b) glich somit weitgehend dem entsprechenden Spektrum der deponierten Wachskristalle nach dem Schmelzen (vgl. Abb. 4.4c).

Dieses Experiment zeigte, dass weder die Anwesenheit von Wasser noch die tiefe Temperatur während der Präparation einen Einfluss auf die Zustandsform der isolierten Wachskristalle vor der IR-spektroskopischen Untersuchung hatte. Zusammen mit den Ergebnissen des vorherigen Experiments konnte gezeigt werden, dass durch Wärmezufuhr zum einen die epikutikulären Wachskristalle von *N. alata* geschmolzen werden können und zum anderen dadurch monomere Aldehyde entstehen. Diese hingegen waren bei physiologischen Temperaturen in mechanisch präparierten Kristallen und in Kristallen auf nativen Gleitzonenoberflächen nicht nachweisbar.

#### 4.3.4 Reversibilität der Monomeren-Bildung

Die Entstehung monomerer Aldehyde in den epikutikulären Wachsen von *N. alata* zeigte eine starke Abhängigkeit von der Temperatur und ging dabei parallel dem Schmelzen des Wachses voraus. Es sollte daher getestet werden, ob die Bildung der Monomeren durch Abkühlen der Schmelze rückgängig gemacht werden kann. Dazu wurden epikutikuläre Wachskristalle mit gefrorenem Wasser von *N. alata* präpariert und auf den ZnSe-Kristall deponiert. Die Probe wurde dann kontinuierlich auf 90°C erhitzt, anschließend wieder auf 23°C abgekühlt und während des ganzen Vorgangs in Intervallen von 3°C IR-spektroskopisch analysiert. Während der Temperaturerhöhung verlagerten die Absorptionsbanden der asymmetrischen und symmetrischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen ihre Maxima zu höheren Wellen-

zahlen und die Bandendoublets der CH<sub>2</sub>-Scher- und Wiegeschwingungen gingen in Einzelbanden über. Gleichzeitig wurde das Bandendoppel der Fermi-Resonanz sichtbar und die Intensität der C=O-Streckschwingung erhöhte sich bis 81°C um einen Faktor 5,1, sank jedoch bis 90°C leicht auf 4,7 zurück (vgl. Abb. 4.7a). Die Spektren zeigten somit die für das Schmelzen des Waxes und die Bildung monomerer Aldehyde typischen Veränderungen (vgl. Kap. 4.3.2).

Im Verlauf des Abkühlens der Probe konnte, anhand der für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden, der Übergang zum festen Aggregatzustand mit orthorhombisch-kristalliner Struktur beobachtet werden. Die Lage des Absorptionsmaximums von  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  verschob sich ab 75°C bis 42°C von ca. 2922 cm<sup>-1</sup> nach 2917 cm<sup>-1</sup> (Abb. 4.9a). Ab 44°C bzw. 50°C zeigten die Absorptionsbanden von  $\delta_{\text{sciss}}(\text{CH}_2)$  bzw.  $\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$  die ursprüngliche Frequenzaufspaltung (Abb. 4.9c). Im Gegensatz dazu, konnte in der Intensität von  $\nu(\text{C}=\text{O})$  lediglich eine leichte Abnahme zwischen 68°C und 56°C beobachtet werden (Abb. 4.9a). Dies zeigte, dass das Vorhandensein monomerer Aldehyde nicht unmittelbar mit dem Aggregatzustand des Waxes zusammenhängt. Das Wachs wurde daraufhin auf dem ZnSe-Kristall belassen, für mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert und in unregelmäßigen Abständen erneut analysiert. Innerhalb von 184 Tagen nahm die Intensität von  $\nu(\text{C}=\text{O})$  kontinuierlich ab (Abb. 4.9b) und erreichte das 2,8 fache des Ausgangswertes vor dem Schmelzen. Im gleichen Zeitraum blieb die relative Intensität von  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  konstant (Abb. 4.9b), so dass die Abnahme von  $\nu(\text{C}=\text{O})$  eine Reduktion des Anteils monomerer Aldehyde anzeigte.

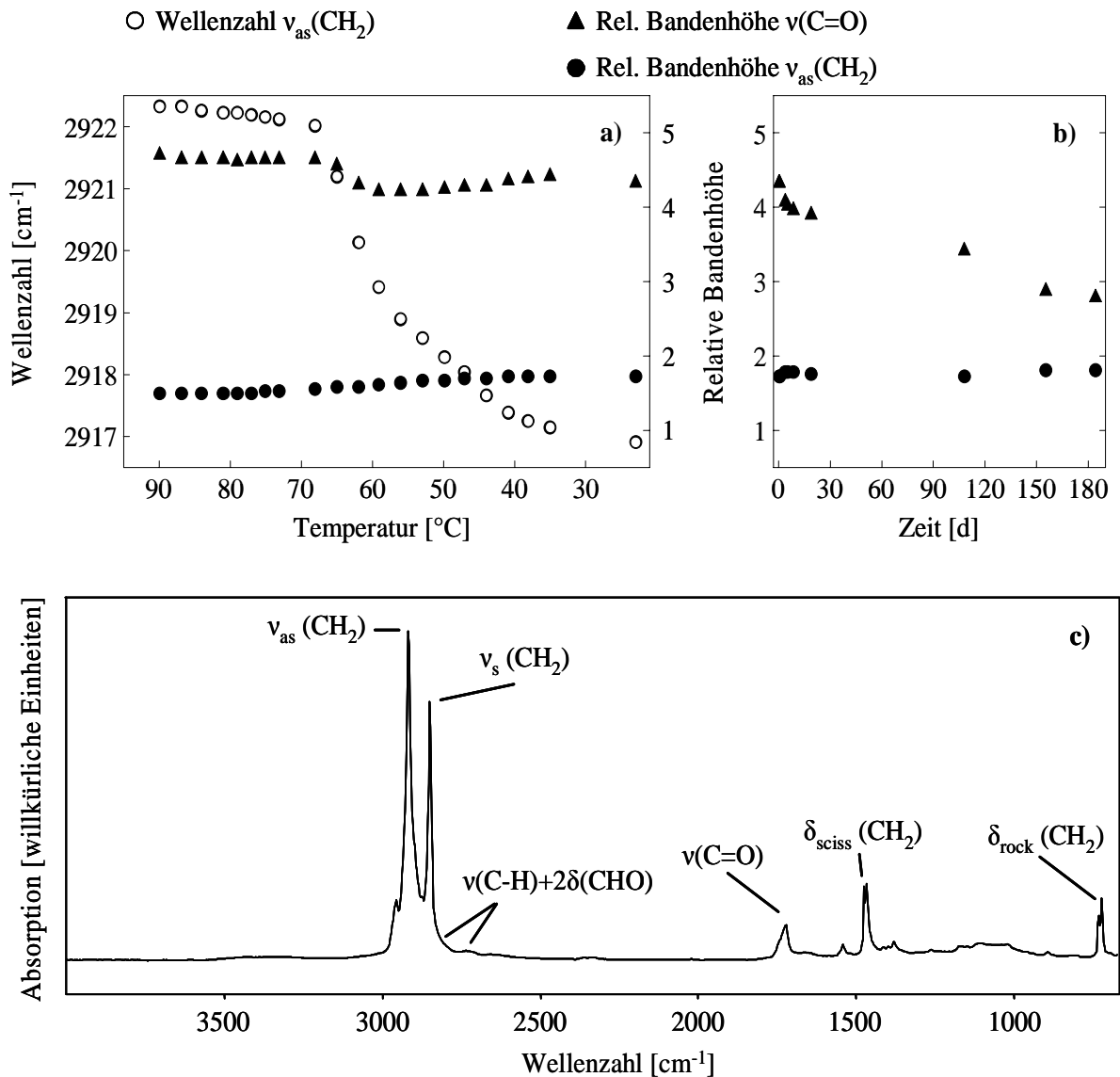
#### 4.3.5 Einfluss des Lösungsmittels

Die Extraktionsexperimente mit Chloroform (vgl. Kap. 3.3.3.3) zeigten, dass zum Lösen der epikutikulären Wachskristalle eine erhöhte Temperatur (ca. 40°C) erforderlich war. In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, in welcher Form die Aldehyde nach dem Lösen vorliegen. Die epikutikulären Wachskristalle der Gleitzonenoberfläche von *N. alata* wurden dafür zunächst mit der Kryo-Methode mechanisch präpariert, auf den ZnSe-Kristall deponiert und bei 23°C IR-spektroskopisch analysiert. Im Anschluss wurden die Wachse mit warmem Chloroform (ca. 40°C) vom Kristall extrahiert, erneut auf diesem aus der Lösung kristallisiert und bei 23°C analysiert.

Das Spektrum der Wachskristalle vor dem Lösen mit Chloroform (Abb. 4.10a) unterschied sich nicht von dem der deponierten Kristalle vor dem Erhitzen (vgl. Abb. 4.4b). Dabei lagen die Maxima der asymmetrischen und symmetrischen CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen bei ca.

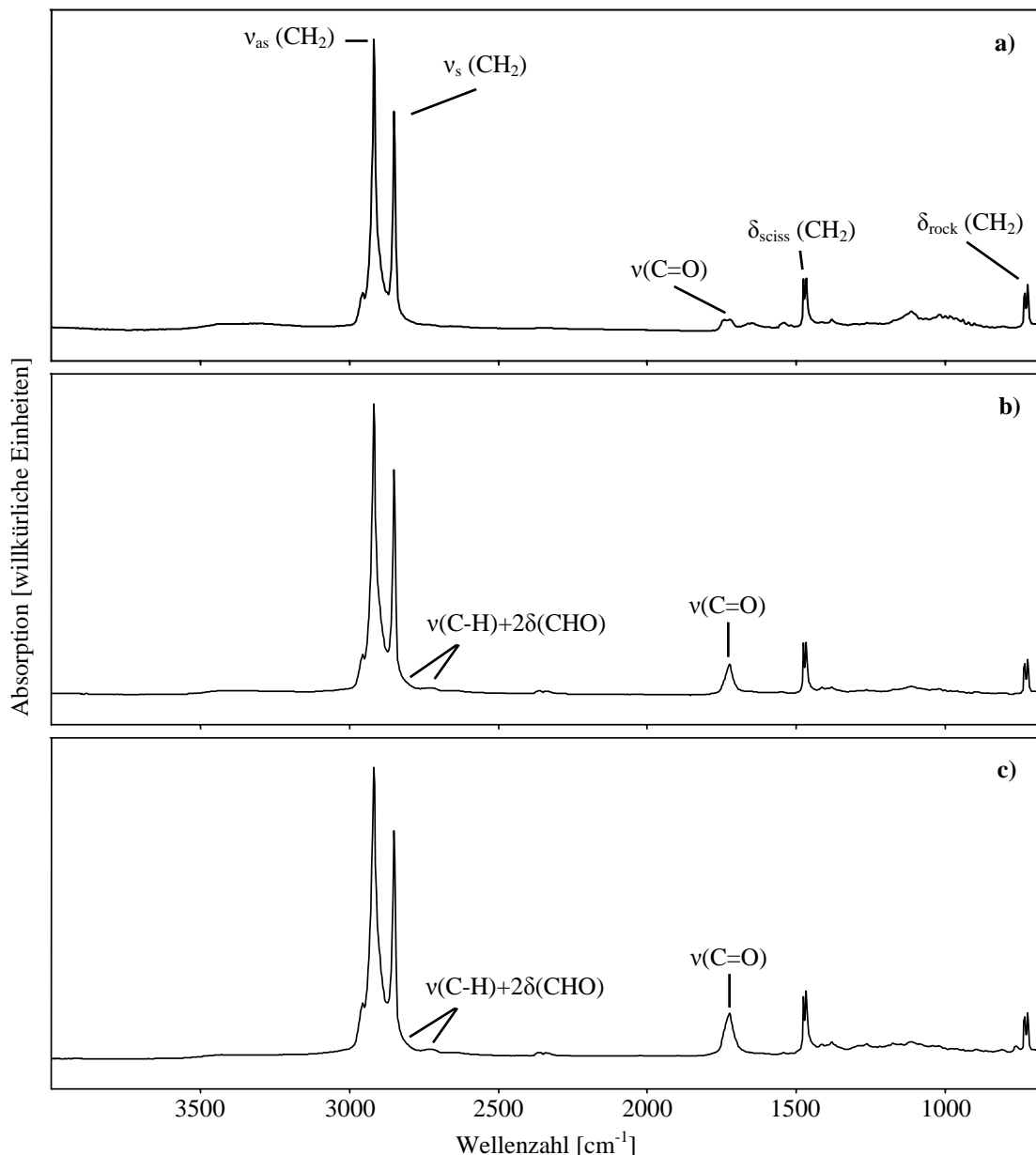


2917  $\text{cm}^{-1}$  und ca. 2849  $\text{cm}^{-1}$  und die  $\text{CH}_2$ -Scher- und Wiegeschwingungen zeigten Bandendoublets bei 1472-1462  $\text{cm}^{-1}$  bzw. ca. 730-720  $\text{cm}^{-1}$  (Abb. 4.10a). Die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden zeigten somit alle Merkmale eines Wachses in fester Phase mit orthorhombischer Kristallstruktur. Die für monomere Aldehyde charakteristischen Bandenausprägungen (Bandendoppel der Fermi-Resonanz und intensive Carbonyl-Bande) waren nicht zu erkennen (Abb. 4.10a).



**Abb. 4.9** ATR-FTIR-spektroskopische Eigenschaften epikutikulärer Wachskristalle von *N. alata* während und nach einem Abkühlen von 90 °C auf 23 °C. a) Wellenzahlen [ $\text{cm}^{-1}$ ] der Bandenmaxima der asymmetrischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ; linke Ordinate) und relative Bandenhöhen der Carbonyl-Streckschwingung ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) und der asymmetrischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Temperatur (90-23 °C). b) Relative Bandenhöhen der Carbonyl-Streckschwingung ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) und der asymmetrischen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung in Abhängigkeit von der Lagerungszeit bei Raumtemperatur. c) Spektrum der Kristalle (s.o.) unterhalb 44 °C.  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ : asymmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung;  $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ : symmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung;  $\nu(\text{C}-\text{H})+2\delta(\text{CHO})$ : Resonanzschwingung der Carbonyl-C-H-Streck- mit dem 1. Oberton der H-C=O-Deformationsschwingung (Fermi-Resonanz);  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : Carbonyl-Streckschwingung;  $\delta_{\text{sciss}}(\text{CH}_2)$ :  $\text{CH}_2$ -Scherschwingung;  $\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$ :  $\text{CH}_2$ -Wiegeschwingung.

Während die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Banden nach dem Lösen und Rekrystallisieren keine Veränderungen zeigten, konnten in den für monomere Aldehyde charakteristischen Wellenzahlbereichen deutliche Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4.10b). Zum einen war hier das durch die Fermi-Resonanz verursachte Bandendoppel bei  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$  und  $2775\text{-}2695\text{ cm}^{-1}$  mit geringer Intensität erkennbar und zum anderen war



**Abb. 4.10** ATR-FTIR-Spektren ( $4000\text{-}670\text{ cm}^{-1}$ ) von epikutikulären Wachskristallen von *N. alata* Gleitzonen bei  $23^\circ\text{C}$ . a) Nach mechanischer Präparation und Deponieren mit gefrorenem Wasser. b) Nach anschließendem Lösen derselben Kristalle (s.o.) in warmem Chloroform (ca.  $40^\circ\text{C}$ ) und Rekrystallisieren. c) Nach mechanischer Präparation mit gefrorenem Wasser, Ausschütteln des Wachses in einem Zweiphasensystem (Wasser/Chloroform; vgl. Kap. 3.2.3.1) bei ca.  $40^\circ\text{C}$  und anschließender Rekrystallisation.

$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ : asymmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung;  $\nu_s(\text{CH}_2)$ : symmetrische  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung;  $\nu(\text{C-H})+2\delta(\text{CHO})$ : Resonanzschwingung der Carbonyl-C-H-Streck- mit dem 1. Oberton der H-C=O-Deformationsschwingung (Fermi-Resonanz);  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : Carbonyl-Streckschwingung;  $\delta_{sciss}(\text{CH}_2)$ :  $\text{CH}_2$ -Scherschwingung;  $\delta_{rock}(\text{CH}_2)$ :  $\text{CH}_2$ -Wiegenschwingung.

die Absorption im Bereich der C=O-Streckschwingung um einen Faktor 5,5 erhöht. Somit konnte gezeigt werden, dass auch durch Lösen der Wachskristalle in warmem Chloroform monomere Aldehyde entstehen, die in nativen Kristallen nicht nachweisbar waren.

Während der Probenvorbereitung für die chemischen Analysen wurden die Wachskristalle in einem erwärmten Zweiphasensystem aus Wasser und Chloroform in Lösung gebracht (s. Kap. 3.2.3.1). Es sollte daher überprüft werden, ob die Anwesenheit von Wasser während des Lösungsvorganges einen Einfluss auf die Form der Aldehyde hat. Dazu wurden die epikutikulären Wachskristalle in gleicher Weise wie für die Probenvorbereitung präpariert und in Lösung gebracht, anschließend aber aus der Lösung auf dem ZnSe-Kristall kristallisiert und bei 23°C IR-spektroskopisch analysiert. Das resultierende Spektrum (Abb. 4.10c) war in allen Merkmalen der für die Kohlenwasserstoffkette und der für die funktionelle Gruppe charakteristischen Absorptionsbanden identisch mit dem Spektrum des direkt gelösten Wachses (vgl. Abb. 4.10b). Die Anwesenheit von Wasser hat somit keinen Effekt auf die Form der nach dem Lösen vorliegenden Aldehyde.

#### 4.3.6 Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle von *N. albomarginata* und *N. intermedia*

Die epikutikulären Wachskristalle von *N. albomarginata* und *N. intermedia* wurden mechanisch mit gefrorenem Wasser präpariert, auf den ZnSe-Kristall deponiert und in einem Temperaturbereich von 23-95°C in Intervallen von 2°C IR-spektroskopisch analysiert. Durch das kontinuierliche Erhitzen der Proben sollte anhand der Bandenlage von  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  der Schmelzbereich der Wachskristalle bestimmt und anhand der Intensität von  $\nu(\text{C}=\text{O})$  geprüft werden, ob monomere Aldehyde im Zuge des Schmelzens entstehen.

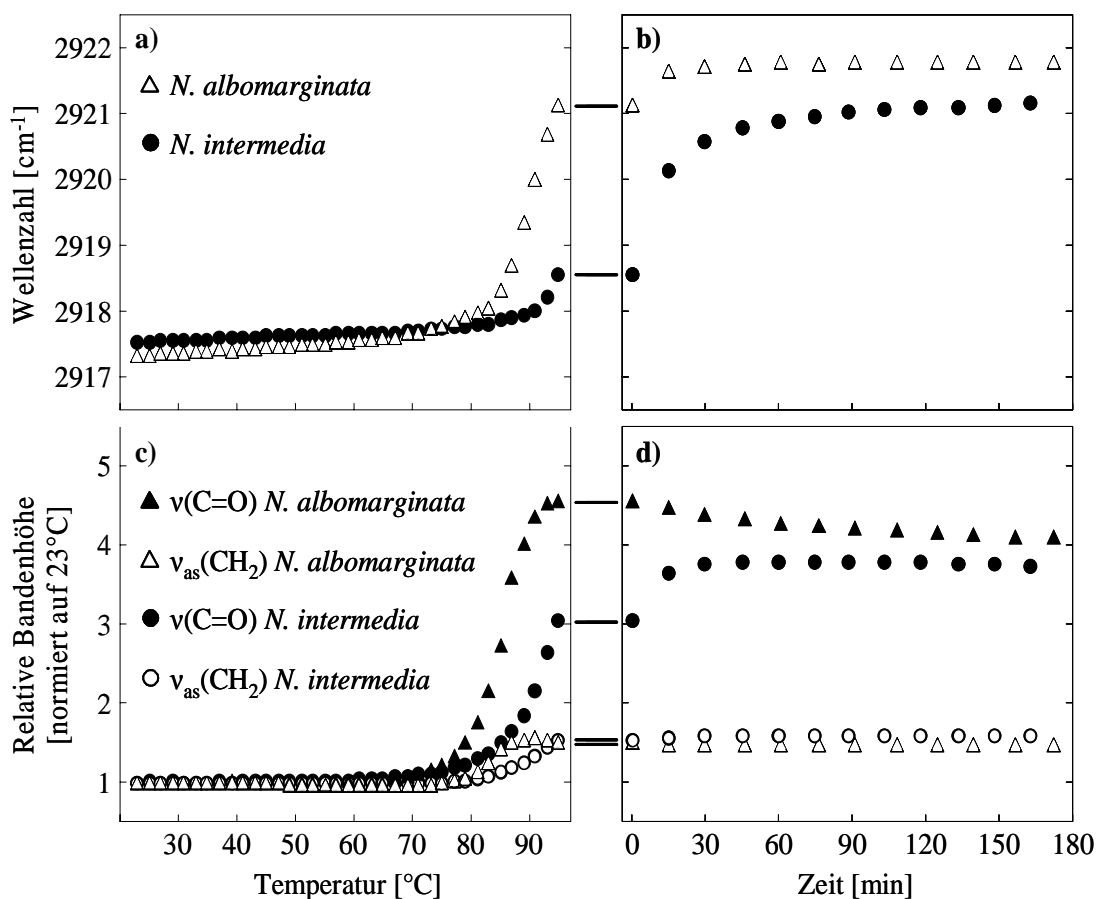
##### *N. albomarginata*

Bei 23°C glich das Spektrum des Wachses von *N. albomarginata* in den wesentlichen Merkmalen dem entsprechenden Spektrum des Wachses von *N. alata* (s. Abb. 4.4b). Die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden zeigten dabei einen festen Aggregatzustand mit orthorhombisch-kristalliner Struktur an. Ein für monomere Aldehyde charakteristisches Bandendoppel der Fermi-Resonanz war nicht erkennbar und im Bereich der C=O-Streckschwingung befand sich eine mehrgipfelige Bande mit geringer Intensität.

In Abhängigkeit von der Temperatur, begann sich das Maximum der asymmetrischen Streckschwingung ab ca. 80°C zu verlagern (Abb. 4.11a). Jedoch wurde auch bei der geräte-

spezifischen Höchsttemperatur von 95°C kein Endpunkt in der Verschiebung erreicht, sodass die Parameter der Schmelzkurve nicht durch eine Kurvenanpassung berechnet werden konnten. Der Endpunkt der Maximumverschiebung wurde erst erreicht, nachdem die Probe für ca. 30 min. bei 95°C gehalten wurde (Abb. 4.11b). Die für den orthorhombisch-kristallinen Ordnungszustand charakteristischen Bandendoublets gingen bei 83°C ( $\delta_{\text{sciss}}(\text{CH}_2)$ ) bzw. nach 15 min. bei 95°C ( $\delta_{\text{rock}}(\text{CH}_2)$ ) in Einzelbanden über und zeigten somit einen amorphen Zustand des Wachses an.

Im Vergleich dazu, war bei *N. albomarginata* ab ca. 77°C ein Anstieg in der Intensität der Absorptionsbande der C=O-Streckschwingung zu erkennen (Abb. 4.11c). Die Intensität erhöhte sich bis 95°C um das 4,6-fache und sank innerhalb 2,75 h bei 95°C leicht auf das 4,1-fache des Wertes bei 23°C ab (Abb. 4.11d). Die Intensität von  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$  nahm hingegen nur



**Abb. 4.11** a, b) Wellenzahlen [cm<sup>-1</sup>] der Bandenmaxima der asymmetrischen ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ) und symmetrischen ( $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ ) CH<sub>2</sub>-Streckschwingung in Abhängigkeit von a) der Temperatur (23–95°C) und b) der Zeit bei konstanter Temperatur (95°C) in ATR-FTIR-Spektren von mechanisch präparierten epikutikulären Wackskristallen von *N. albomarginata* und *N. intermedia*. c, d) Relative Höhe der Absorptionsbanden der Carbonyl-Streckschwingungen ( $\nu(\text{C}=\text{O})$ ) und der asymmetrischen CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ) in ATR-FTIR-Spektren von mechanisch präparierten epikutikulären Wackskristallen von *N. albomarginata* und *N. intermedia* in Abhängigkeit von c) der Temperatur (23–95°C) und d) der Zeit bei konstanter Temperatur (95°C). Alle Werte sind auf den entsprechenden Wert bei 23°C normiert.

leicht um einen Faktor 1,6 zu (Abb. 4.11c). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Erhöhung der Carbonyl-Bande durch eine Intensitätssteigerung des Gesamtspektrums zustande kam. Das Bandendoppel der Fermi-Resonanz war erstmals bei 85°C deutlich zu erkennen.

#### *N. intermedia*

Das Spektrum des Wachses von *N. intermedia* glich bei 23°C den entsprechenden Spektren der Wachse von *N. alata* (s. Abb. 4.4b) und *N. albomarginata*. Die für die Kohlenwasserstoffkette charakteristischen Absorptionsbanden zeigten dabei einen festen Aggregatzustand mit orthorhombisch-kristalliner Struktur an. Ein für monomere Aldehyde charakteristisches Bandendoppel der Fermi-Resonanz war ebenfalls nicht erkennbar und im Bereich der C=O-Streckschwingung befand sich eine mehrgipfelige Bande mit geringer Intensität.

Während der Temperaturerhöhung zeigten die Spektren der Wachskristalle von *N. intermedia* bis ca. 91°C keine Merkmale eines Schmelzens (Abb. 4.11a) oder einer Änderung des Ordnungszustandes. Die Verschiebung des Maximums der asymmetrischen Streckschwingung begann erst bei Temperaturen >91°C, erreichte aber auch nach 2,75 h bei 95°C keinen Endpunkt (Abb. 4.11b). Der Übergang der Bandendoublets zu Einzelbanden vollzog sich für die CH<sub>2</sub>-Scherschwingung bei 93°C und für die CH<sub>2</sub>-Wiegenschwingung nach 45 min. bei 95°C.

Im Vergleich zum Beginn des Schmelzens bei ca. 91°C, begann die Intensität von  $\nu(\text{C}=\text{O})$  bei ca. 83°C zu steigen (Abb. 4.11c). Eine maximale Erhöhung der Intensität um das 3,8-fache des Wertes bei 23°C wurde jedoch erst nach ca. 45 min. bei 95°C erreicht (Abb. 4.11d) und blieb dann über den Messzeitraum konstant. Die Banden der Fermi-Resonanz waren ab ca. 93°C zu erkennen.

Die Ergebnisse der FT-IR-spektroskopischen Untersuchungen in diesem Teil der vorliegenden Arbeit charakterisierten am Beispiel von synthetischem Triacontanal die Absorptionseigenschaften eines sehr langkettigen, aliphatischen Aldehyds in seiner monomeren Form bei unterschiedlichen Temperaturen. Die resultierenden Absorptionsbanden konnten zum einen dem aliphatischen Anteil und zum anderen der funktionellen Gruppe des Moleküls zugeordnet werden. Durch Wärmezufuhr konnten anschließend die Absorptionseigenschaften während des Übergangs von einer festen Phase mit orthorhombisch-kristalliner Struktur in eine flüssig-amorphe Phase beschrieben werden.

---

Triacontanal ist der Hauptbestandteil epikutikulärer Wachskristalle der Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten, die anschließend unter denselben Bedingungen untersucht wurden. Bei *N. alata* konnten weder in den Kristallen auf nativen Gleitzonenoberflächen noch in mechanisch präparierten Kristallen Aldehyde in monomerer Form nachgewiesen werden. Monomere bildeten sich erst durch Wärmezufuhr und dem damit einhergehendem Schmelzen des Wachses und waren nach Abkühlen dann unabhängig vom Aggregatzustand des Wachses vorhanden. Alternativ entstanden monomere Aldehyde durch Lösen des Wachses in Chloroform. Die Untersuchungen an *N. albomarginata* und *N. intermedia* zeigten, dass auch in deren Wachskristallen keine monomeren Aldehyde vorhanden waren und die zur Bildung der Monomeren und zum Schmelzen des Wachses benötigten Temperaturen stark zwischen den Arten variierten.

---

#### 4.4 Diskussion

Die Bildung oligomerer oder polymerer Strukturen durch kurzkettige Aldehyde, v.a. Formaldehyd, ist seit langem bekannt (Butlerov 1859) und war seither Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Auerbach und Barshall 1907; Staudinger 1920, 1936; Walker 1964). Oligomere Strukturen können dabei ringförmige Trimere (Trioxane) oder Tetramere sein (Chattaway und Kellett 1928), wohingegen lineare Strukturen in Form von Polyacetalen vorliegen können (Vogl 2000a). Auch für Aldehyde mit längeren Seitenketten ( $<C_9$ ) wurden derartige Strukturen beschrieben (Vogl 2000a). Polymere aus niederen Aldehyden und deren Derivate werden heute großtechnisch hergestellt und finden zahlreiche Anwendungen in der Kunststoffindustrie (Nagahara et al. 2000; Vogl 2000a).

Sehr langkettige Aldehyde ( $>C_{18}$ ) sind in kutikulären Pflanzenwachsen weit verbreitet und deren Existenz in oligomerer oder polymerer Form wurde schon mehrfach postuliert. Auf der einen Seite wurden oligomere Aldehyde in Form von Trialkyltrioxanen in den kutikulären Wachsen verschiedener Rosen-Arten beschrieben (Mladenova et al. 1976; 1980). Auf der anderen Seite lieferte sowohl die Extraktion mit heißem Petroleum als auch die Destillation von Zuckerrohrwachsen große Mengen freier Aldehyde und es wurde vermutet, dass diese aus oligomeren oder polymeren Strukturen freigesetzt wurden (Lamberton und Redcliffe 1960). Da Dodecanal in Anwesenheit von Wasser stabile Hemihydrate bilden kann (Klass et al. 1963), schlug Lamberton (1965) diese Struktur oder eine höher polymere Form dieses Typs auch für die Aldehyde aus Zuckerrohrwachsen vor. Aus Extraktionsexperimenten mit Chloroform bei unterschiedlichen Temperaturen schlossen Haas et al. (2001), dass sich diese polymeren Aldehyde in den epikutikulären Wachskristallen sowohl des Zuckerrohrs als auch verschiedener Reis-Varietäten befinden und die Ursache für die Unlöslichkeit der Kristalle in Chloroform bei Raumtemperatur sind.

Allen Untersuchungen war gemeinsam, dass die Form der Aldehyde erst nach der Einwirkung von Lösungsmitteln oder hohen Temperaturen, bzw. Kombinationen aus beidem, analysiert werden konnte. In den resultierenden Destillaten und Lösungen lagen große Anteile des resultierenden Materials in Form freier Aldehydmonomere vor und auf die ursprüngliche Struktur konnte nur indirekt über die Destillations- und Lösungseigenschaften geschlossen werden. Weiterhin konnte die Herkunft der Aldehyde bezüglich verschiedener kutikulärer Wachskompartimente nicht bestimmt werden.

In Kapitel 3 der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel der Gleitzonenoberfläche von *N. alata* erstmalig direkt gezeigt werden, dass Aldehyde die kristallbildende Substanzklasse epikutikulärer Wachskristalle sind. Die verwendete Methode erlaubte dabei eine selektive Präparation der epikutikulären Bestandteile unter Ausschluss organischer Lösungsmittel oder hoher Temperaturen. Diese Methode konnte modifiziert werden, um epikutikuläre Wachskristalle für die IR-spektroskopische Untersuchung zu präparieren. Die in diesem Teil der Arbeit verwendete ATR-Technik hat im Gegensatz zur klassischen Durchstrahl-Technik den Vorteil, dass die zu untersuchenden Substanzen nicht in Lösung oder Suspension gebracht, bei hohen Drücken gesintert oder aus der Schmelze bei hohen Temperaturen aufgetragen werden müssen. Derartige Vorbehandlungen können zu Zersetzungsprozessen und Störungen der molekularen Anordnung der Substanzmoleküle führen. Die Kombination der verwendeten Präparations- und Messtechnik erlaubte hingegen die Analyse der Wachse *in situ* (Dubis et al. 1999) bzw. in einem dieser Situation sehr nahen Zustand. Ausgehend davon, konnte der Einfluss der Temperatur auf die molekulare Anordnung und Form der Wachsmoleküle direkt beobachtet werden. Die speziell angefertigte Probenhalterung erlaubte ein kontrolliertes Erhitzen der Proben bei zeitgleicher Analyse der IR-spektroskopischen Eigenschaften. Dieser Aufbau eignete sich daher auch, sowohl das Phasenverhalten und den Ordnungszustand des Wachses (Merk et al. 1998), als auch eventuell auftretende chemische Veränderungen während der Temperaturerhöhung direkt zu verfolgen.

#### 4.4.1 IR-spektroskopische Eigenschaften von synthetischem *n*-Triacontanal

Die epikutikulären Wachskristalle der in dieser Arbeit untersuchten *Nepenthes*-Arten bestehen hauptsächlich aus Aldehyden und dabei insbesondere aus Triacontanal (Kap. 3). Triacontanal wurde daher als Referenzsubstanz verwendet, um die Absorptionseigenschaften eines sehr langkettigen, aliphatischen Aldehyds zu charakterisieren.

##### 4.4.1.1 nach Rekristallisation

Das Referenzspektrum von Triacontanal bei 23°C zeigte für aliphatische Kohlenwasserstoffketten charakteristische Absorptionsbanden, die sich auf verschiedene Schwingungsmodi der Methylen-Gruppen zurückführen ließen. Die zwei intensiven Banden mit Absorptionsmaxima bei ca. 2917 cm<sup>-1</sup> und ca. 2849 cm<sup>-1</sup> entsprachen dabei den asymmetrischen ( $\nu_{as}$ ) und symmetrischen ( $\nu_s$ ) CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen, während die Bandendoublets bei ca. 1472-



1462  $\text{cm}^{-1}$  bzw. ca. 730-720  $\text{cm}^{-1}$  durch Scher- ( $\delta_{\text{sciss}}$ ) bzw. Wiegeschwingungen ( $\delta_{\text{rock}}$ ) der Methylen-Gruppen entstanden (Chamel und Maréchal 1992; Ramirez et al. 1992; Mantsch und McElhaney 1991). Die Frequenzaufspaltungen der  $\text{CH}_2$ -Scher- und Wiegeschwingungen lassen sich auf intermolekulare Wechselwirkungen zwischen benachbarten Kohlenwasserstoffketten zurückführen, die nur dann auftreten, wenn die Molekülketten in einem orthorhombischen Kristallgitter angeordnet sind (Marsen 1961, 1962; Zerbi et al. 1989; Carrasco et al. 1995). Für Untersuchungen zur Kristallinität wurde jedoch meist das Verhalten der  $\text{CH}_2$ -Wiegeschwingung analysiert (Marsen 1961, 1962; Merk et al. 1998; Carreto et al. 2002).

In Bezug auf die funktionelle Gruppe, zeigte die Bande bei 1750-1700  $\text{cm}^{-1}$  eindeutig das Vorhandensein von freien Carbonyl-Gruppen an und tritt in Spektren von Fettsäuren, Estern, Ketonen und Aldehyden stets deutlich hervor. Das Bandendoppel im hohen Wellenzahlbereich bei 2900-2800  $\text{cm}^{-1}$  und 2775-2695  $\text{cm}^{-1}$  hingegen ist charakteristisch für Aldehyde. Es entsteht durch Resonanz (Fermi-Resonanz) der C-H-Streckschwingungsfrequenz der Aldehyd-Gruppe mit der H-C=O-Deformationsschwingung und kann folglich nur auftreten, wenn die Carbonyl-Gruppe in einer freien Form vorliegt (Günzler und Böck 1983, Srivastava et al. 2001). Das Fehlen von Absorptionsbanden in den Regionen von 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$  und 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  wies darauf hin, dass weder OH-Gruppen noch C-O-Einfachbindungen vorhanden waren und der Aldehyd z.B. nicht als Hydrat, Halbacetal oder Acetal vorlag (Pouchert 1970; Günzler und Böck 1983). Alle Absorptionsmerkmale wiesen damit darauf hin, dass das synthetische Triacontanal bei 23°C als Feststoff mit orthorhombischer Kristallstruktur und in monomerer Form vorlag.

#### 4.4.1.2 Phasenverhalten

Mit steigender Temperatur veränderten sich die Absorptionseigenschaften des aliphatischen Anteils des Aldehydmoleküls in charakteristischer Weise. Die Verschiebung der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsfrequenzen, zusammen mit dem Verschwinden der Bandendupletts der  $\text{CH}_2$ -Scher- und Wiegeschwingungen, zeigte dabei den Übergang zu einem flüssig-amorphen Zustand an (Mantsch und McElhaney 1991; Blume 1996; Marsen 1961, 1962). Die Auftragung der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsfrequenzen gegen die Temperatur lieferte die Schmelzkurve der Probe und wurde schon früher herangezogen, um das Phasenverhalten kutikulärer Wachse von Pflanzen (Merk et al. 1998) und Insekten (Patel et al. 2001) zu untersuchen. Über das Phasenverhalten sehr langkettiger Aldehyde ( $>\text{C}_{18}$ ) ist in der Literatur jedoch kaum etwas bekannt und die Schmelzpunkte von einzelnen Homologen sind nicht

zugänglich. Für Triacontanal konnte in dieser Arbeit ein enger Schmelzbereich von 4°C ermittelt werden. Die Schmelzmitte (90°C) lag dabei zwischen den Schmelzpunkten des Triacontanol (88°C; Lide 1992) und der Triacontansäure (93-95°C; Richter 1958).

Aus den gleich bleibenden Intensitäten der für die Aldehyd-Gruppe charakteristischen Absorptionsbanden konnte geschlossen werden, dass das Triacontanal auch in der Schmelze in monomerer Form vorlag.

#### 4.4.2 IR-spektroskopische Eigenschaften der epikutikulären Wachskristalle verschiedener *Nepenthes*-Arten

Ausgehend von den an synthetischem Triacontanal gewonnenen Ergebnissen, konnte die Form der Aldehyde in den epikutikulären Wachskristallen von *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia* bewertet werden. Die Wachskristalle wurden dazu mit gefrorenem Wasser mechanisch von den Gleitzonenoberflächen präpariert und auf den ZnSe-Kristall deponiert.

Bei 23°C zeigten die Spektren der deponierten Wachskristalle der drei untersuchten *Nepenthes*-Arten nahezu identische Absorptionseigenschaften. Entsprechend den in den chemischen Analysen ermittelten Zusammensetzungen (Kap. 3.3.3.1, 3.3.6.1) konnten die für aliphatische Kohlenwasserstoffketten typischen Absorptionsmerkmale gefunden werden. Anhand der Lage der Absorptionsmaxima der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen und an den beiden Bandendupletts waren die Wachse als Festsubstanzen mit orthorhombischer Kristallstruktur zu erkennen.

Im Gegensatz zum synthetischen Triacontanal fehlte jedoch stets das für freie Aldehyde charakteristische Bandendoppel durch Fermi-Resonanz und im Bereich der Carbonyl-Absorption (ca. 1740-1720 cm<sup>-1</sup>) war lediglich eine Bande mit geringer Intensität zu erkennen. Die Absorption in der Carbonyl-Region muss dabei, zumindest teilweise, auf das Vorhandensein geringer Anteile an Fettsäuren und Alkyl-Estern in den Wachskristallen zurückgeführt werden (Dubis et al. 1999; Safar et al. 1994; Chamel und Maréchal 1992; Ramirez et al. 1992). Der Beitrag von monomeren Aldehyden konnte somit nur sehr gering sein. Zusammen mit dem Fehlen des Bandendoppels konnte somit eindeutig ausgeschlossen werden, dass die epikutikulären Aldehyde nach dem deponieren mit gefrorenem Wasser in freier und monomerer Form vorliegen. Anhand der Kontrolle der nativen Gleitzonenoberflächen von *N. alata* konnte dabei beispielhaft gezeigt werden, dass die Präparation mit flüssigem Stickstoff keinen Einfluss auf die Form der Aldehyde in den epikutikulären Wachskristallen hatte.

Als zu Monomeren alternative Strukturen wurden hydratisierte bzw. oligomere oder polymere Formen der Aldehyde vorgeschlagen (Lamberton 1965). Gegen das Vorliegen der Aldehyde als Hydrate sprach jedoch die geringe Absorption im hohen Wellenzahlbereich von 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$ . Dieser Bereich ist typisch für O-H-Streckschwingungen. Bei Anwesenheit von z.B. Wasser, Fettsäuren oder Alkoholen tritt in ihm in der Regel eine breite und intensive Bande auf (Carreto et al. 2002; Dubis et al. 1999; Safar et al. 1994). In dieser Weise hätten größere Anteile hydratisierter Aldehyde hier zu einer deutlich höheren Absorption führen müssen. Aus diesem Grund erscheint auch das Vorhandensein von Halbacetalen als unwahrscheinlich, da auch dieses Additionsprodukt eine Hydroxyl-Gruppe trägt. Die vorhandene Intensität im O-H-Streckschwingungsbereich könnte vielmehr durch die Beimengungen an primären Alkoholen und Fettsäuren im Wachs der drei *Nepenthes*-Arten und durch geringfügige Wasserreste aus der Präparation erklärt werden.

Als Hinweis auf ein Vorliegen der Aldehyde in oligomerer oder polymerer Form könnte die breite und diffuse Absorption bei ca. 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$  angesehen werden. In diesem Bereich werden je nach untersuchtem System Absorptionsbanden von C-O-Einfachbindungen von Alkyl-Estern, Fettsäuren, Cutin und primären Alkoholen beschrieben (Dubis et al. 1999, Safar et al. 1994, Chamel und Maréchal 1992; Ramirez et al. 1992). Ebenfalls in diesem Bereich absorbieren bei verschiedenen Wellenzahlen mehrere Schwingungsmodi der C-O-Bindungen von Ethern und Acetalen (Günzler und Böck 1983). Allerdings wurden dabei stets intensivere und schärfere Banden beschrieben, als sie in den Spektren der *Nepenthes*-Wachskristalle gefunden wurden. Eine Überlagerung von C-O-Absorptionen verschiedener Wachskomponenten erscheint wahrscheinlich und eine Zuordnung zu bestimmten chemischen Strukturen ist daher unsicher. Ausgeschlossen werden konnte hingegen ein von Lamberton (1965) diskutiertes Dimer durch Aldolkondensation zweier Aldehydmoleküle. Durch Konjugation der Carbonyl-Gruppe mit einer  $\alpha,\beta$ -Olefinbindung hätte dabei eine intensive Absorptionsbande bei 1705-1685  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden müssen (Günzler und Böck 1983).

Die Befunde bisher zeigen, dass die Aldehyde in den epikutikulären Wachskristallen der drei untersuchten *Nepenthes*-Arten bei physiologischen Temperaturen nicht als Monomere vorliegen. Weiterhin ergeben sich starke Hinweise, hydratisierte oder dimere Formen auszuschließen und somit oligomere oder polymere Strukturen anzunehmen. Wird das Phasenverhalten der Wachskristalle verschiedener *Nepenthes*-Arten und des synthetischen Triacontanal miteinander verglichen, können auf Grund theoretischer Überlegungen Rückschlüsse auf den Polymerisationsgrad der Aldehyde gezogen werden.

---

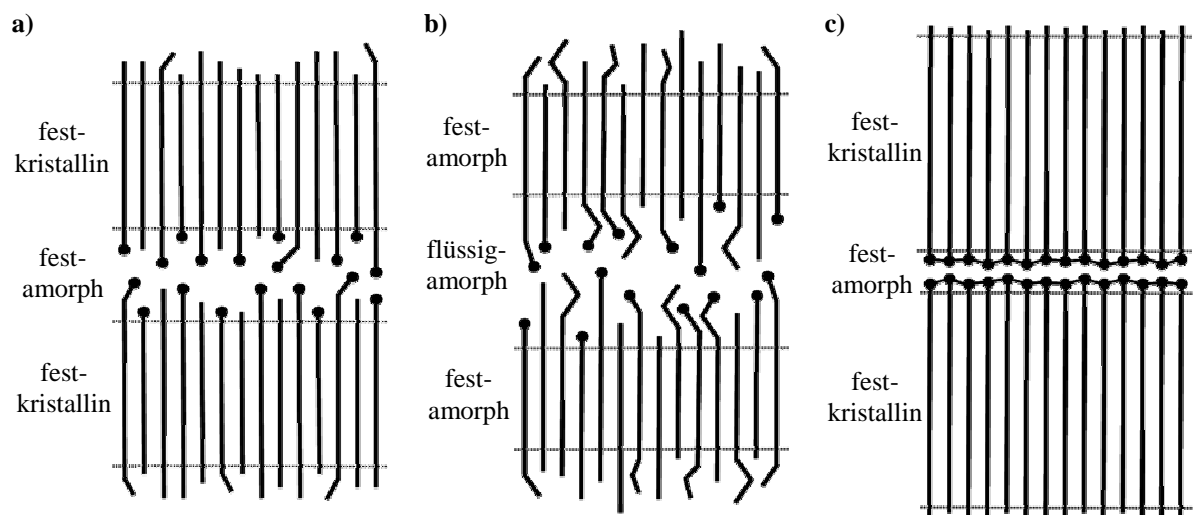
#### 4.4.3 Allgemeines Modell der molekularen Anordnung kutikulärer Wachskomponenten

Das Phasenverhalten kutikulärer Wachsmischungen wird weitgehend durch deren chemische Zusammensetzung und den daraus resultierenden intermolekularen Wechselwirkungen bestimmt. Auf Grund zahlreicher Infrarot- und Kernspinresonanz-spektroskopischer Untersuchungen konnte ein allgemeines Modell für die molekulare Anordnung kutikulärer Wachskomponenten erstellt werden (LeRoux 1969a, 1969b, 1969c; Basson und Reynhardt 1988a, 1988b, 1992; Reynhardt und Riederer 1991, 1994). Zur Vereinfachung der folgenden Betrachtungen werden dabei jedoch Effekte nicht-aliphatischer Komponenten und aliphatischer Komponenten mit intramolekularen Verzweigungspunkten oder intramolekular gelegenen funktionellen Gruppen weitgehend vernachlässigt, da diese in den *Nepenthes*-Wachsen nur in geringen Mengen gefunden wurden.

#### Festkörper

Nach diesem Modell existieren im festen Zustand sowohl amorphe als auch kristalline Domänen nebeneinander. In den kristallinen Domänen sind die Kohlenstoffgrundgerüste der Moleküle längsparallel ausgerichtet und in Schichten angeordnet (Abb. 4.12a). Dadurch ergibt sich eine räumlich dichte Packung der Moleküle (orthorhombische Kristallstruktur), die durch intermolekulare Wechselwirkungen in Form von van-der-Waals-Kräften gekennzeichnet ist. Der Volumenanteil dieser Domänen wird dabei durch die Verteilung der Kettenlängen der beteiligten Aliphaten bestimmt. D.h., setzt sich der aliphatische Anteil des Wachses aus Komponenten mit unterschiedlichen Kettenlängen zusammen, wird die dichte Packung an den Rändern der kristallinen Domänen gestört. Dadurch bilden sich fest-amorphe Domänen, in denen die überstehenden Moleküle eine höhere Beweglichkeit besitzen und die intermolekularen Wechselwirkungen geringer sind (Abb. 4.12a). In diese amorphen Domänen zwischen zwei Schichten ragen auch die endständig gelegenen Carboxyl- und Hydroxyl-Gruppen aliphatischer Säuren und primärer Alkohole. Diese Moleküle können neben den relativ schwachen van-der-Waals-Kräften zusätzlich relativ starke Wasserstoffbrücken ausbilden. Ähnliches gilt für die Carbonyl-Gruppen aliphatischer Aldehyde. Deren C=O-Bindung ist stark polarisiert, wodurch ebenfalls starke Anziehungskräfte in Form von Dipol-Dipol- Wechselwirkungen zwischen benachbarten Gruppen auftreten können. Auf Grund des amphiphilen Charakters kann zudem angenommen werden, dass sich Moleküle benachbarter Schichten im Wechsel Kopf an Kopf bzw. Schwanz an Schwanz orientieren. Weiterhin wurde vermutet, dass sich kristalline Domänen unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung

bilden können (Schreiber et al. 1997). Substanzen von ähnlicher Polarität und Kettenlänge würden sich dabei in eigenen kristallinen Domänen anreichern und von anderen Domänen durch amorphe Zonen getrennt sein. In den amorphen Zonen sind dabei neben den überstehenden Molekülen auch Moleküle angereichert, die sich auf Grund ihrer Geometrie oder anderer Eigenschaften nicht in kristallinen Gitterstrukturen anordnen lassen.



**Abb 4.12** Allgemeines Schema zur molekularen Anordnung kutikulärer Wachskomponenten a) in Festkörpern bei Temperaturen unterhalb des Schmelzbereiches und in b) während Phasenübergängen bei Temperaturen wenig unterhalb des Schmelzpunktes sowie c) in nativen epikutikulären Wachs-kristallen von *Nepenthes spec.* Erweiterte Endpunkte stellen funktionelle Gruppen dar. Benachbarte Carbonyl-Gruppen von Aldehyden sind in c) durch kovalente Bindungen zu Polyacetalen verknüpft.

### Phasenübergang

Wird die Temperatur des Wachses erhöht, beginnt der Schmelzvorgang in den fest-amorphen Domänen. Dabei nehmen intramolekulare Konformationsänderungen (trans-gauche) der Kettenenden zu und dieser Bereich geht in eine flüssig-amorphe Phase über. Dies lässt sich im IR-Spektrum anhand der beginnenden Maximumverschiebung der  $\text{CH}_2$ -Streck-schwingungen verfolgen. Gleichzeitig nimmt die Beweglichkeit der Molekülketten in den kristallinen Domänen zu. Hierbei können die Molekülketten eingeschränkt um ihre Längsachse rotieren und entlang dieser verschoben werden. Dabei werden die Kettenenden weiter in die flüssig-amorphe Phase vorgeschoben und vergrößern deren Volumenanteil (Hastie und Roberts 1994). Die kristallinen Domänen beginnen daher von der Oberfläche her zu schmelzen. Wird die Temperatur weiter erhöht, kann nun die feste, orthorhombisch-kristalline Domäne in eine fest-amorphe Phase übergehen. In dieser Phase können die Moleküle nun frei um ihre Längsachse rotieren und leichter entlang ihrer Längsachse verschoben werden. Dieser fest-fest Übergang kann IR-spektroskopisch anhand des Ver-

schwindens der CH<sub>2</sub>-Wiege- und Scherschwingungsbandendupletts erkannt werden. Gleichzeitig vergrößert sich der Volumenanteil der flüssig-amorphen Phase durch weitere Verschiebungen der Moleküle entlang ihrer Längsachsen und durch Zunahmen an Konformationsänderungen in diesen Molekülbereichen (Abb. 4.12b). Stehen bei einer bestimmten Temperatur die Volumenanteile der flüssig- und fest-amorphen Phasen im Gleichgewicht, ist der Schmelzpunkt erreicht. Schließlich werden bei weiter steigenden Temperaturen die van-der-Waals-Kräfte zwischen den Molekülen immer schwächer, wodurch immer größere Anteile der fest-amorphen in eine flüssig-amorphe Phase übergehen. Der Schmelzvorgang ist abgeschlossen, wenn sich das gesamte Volumen in der flüssig-amorphen Phase befindet.

Aus diesem Modell lassen sich Vorhersagen für das Schmelzverhalten von Mischungen aliphatischer Wachskomponenten treffen.

- (1) Reinsubstanzen schmelzen in einem engen Temperaturbereich, da sich alle Moleküle in der gleichen Umgebung mit gleichen Bindungsenergien zwischen benachbarten Molekülen befinden. Mischungen zeigen einen breiten Schmelzbereich, der von den Schmelzpunkten der Einzelkomponenten und Mischphasen bestimmt wird und in der Regel unterhalb der Schmelzpunkte der Einzelkomponenten liegt (Schmelzpunktdepression).
- (2) Der Schmelzbereich einer Wachsmischung sollte umso höher liegen, je größer die Kettenlänge und je enger die Kettenlängenverteilung der beteiligten Aliphaten ist. Dadurch vergrößert sich der Volumenanteil der fest-kristallinen Bereiche und somit der intermolekulare Zusammenhalt.
- (3) Der Schmelzbereich einer Wachsmischung sollte mit zunehmendem Anteil an Aldehyden, Alkoholen oder Säuren steigen. Diese Substanzen können neben den relativ schwachen van-der-Waals-Kräften zusätzliche Wechselwirkungen über stark polarisierte Bindungen oder Wasserstoffbrücken eingehen und zeigen einen meist erheblich höheren Schmelzpunkt als Alkane vergleichbarer Kettenlänge (Casado und Heredia 2001; Reynhardt 1997; Schreiber et al. 1997).

#### 4.4.4 Auswirkungen polymerer Aldehyde auf das Phasenverhalten der epikutikulären Wachskristalle verschiedener *Nepenthes*-Arten

Mischungen kutikulärer Wachse zeigen eine hohe Variabilität sowohl in den Temperaturen für die Lage und Breite der Schmelzbereiche als auch für die Temperaturen der Schmelzmitten. Bei Untersuchungen an kutikulären Wachsen von 33 Pflanzenarten aus unterschiedlichen systematischen Einheiten konnten Schmelzbereiche mit unteren Grenzen von 41-77°C

und oberen Grenzen von 88-96°C mit Schmelzmitten von 58°C bis maximal 90°C beobachtet werden (Merck 1998). Werte für die oberen Grenzen der Schmelzbereiche >75°C wurden dabei jedoch nur in Einzelfällen gefunden und 75% aller untersuchten Wachse zeigten Schmelzmitten  $\leq$  80°C.

Der Schmelzbereich (75-91°C) und die Schmelzmitte (83°C) der epikutikulären Wachs-kristalle von *N. alata* lag somit am oberen Ende der beobachteten Variationsbreite. Die chemischen Analysen zeigten, dass die Kristalle insbesondere aus Molekülen sehr ähnlicher Kettenlänge und Polarität bestehen. Entsprechend dem vorgestellten Modell könnte daher geschlossen werden, dass unterhalb des Schmelzbereiches der Wachs-kristalle zahlreiche Domänen vorhanden sind, in denen sich die Moleküle in einer hochgeordneten fest-kristallinen Phase befinden und starke intermolekulare Kräfte dem Schmelzen entgegen stehen. Das Auftreten der Bandendupletts der CH<sub>2</sub>- Scherschwingungen in den IR-Spektren zeigte dabei bis 85°C eindeutig eine räumliche Anordnung der Moleküle in einem orthorhombischen Kristallgitter an. Die IR-Spektren der Kristalle wiesen weiterhin nahezu keine Absorptionen freier Carbonyl-Gruppen von Aldehyden auf. Diese Befunde können auf ein Vorliegen der Aldehyde in Form von linearen Polyacetalen hindeuten. Da bei *N. alata* 60% des Materials aus Aldehyden annähernd einheitlich hoher Kettenlänge bestand, könnten zahlreiche Carbonyl-Gruppen in großer räumlicher Nähe angeordnet sein. Dadurch könnte die Aktivierungsenergie für die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen benachbarten Molekülen erniedrigt sein (Abb. 4.12c). In ähnlicher Weise ist die sterisch günstige Anordnung von Reaktanten allgemein ein wichtiger Faktor z.B. auch bei enzymatisch katalysierten Reaktionen. Die beobachtete räumliche Anordnung der Moleküle lässt sich zudem kaum mit oligomeren Strukturen in Form von Trioxanen vereinbaren, da die Ausrichtung der aliphatischen Seitenketten in verschiedene Raumrichtungen die Ausbildung eines orthorhombischen Kristallgitters sterisch verhindern würde. Daneben erscheint es wahrscheinlich, dass die Triebkraft für eine lineare Polymerisation in Form von Polyacetalen, in Analogie zu den Befunden an niederen Aldehyd-Homologen (Vogl 2000a), durch Enthalpieeffekte sowohl kristallisierter Polymerrückgrade als auch orthorhombisch-kristallin angeordneter Seitenketten erhöht wird. Das Auftreten dieser Effekte bei der Bildung von Trioxanen erscheint ebenfalls auf Grund deren Molekülgeometrie als unwahrscheinlich.

Kovalente Bindungen zwischen benachbarten Molekülen des Kristallgitters sollten nach dem beschriebenen Modell die Bewegungsfreiheit der Moleküle entlang ihrer Längsachsen einschränken und so den Übergang in eine flüssig-amorphe Phase erschweren. D.h., um diese polymer-kristallinen Domänen zu schmelzen, müssten daher zwei verschiedene Prozesse

parallel verlaufen. Zum einen müssten die Polymerbindungen durch Energiezufuhr gespalten werden. Dadurch würde den Molekülen zum anderen erlaubt, die aufgenommene Wärmeenergie in kinetische Energie umzusetzen und so den kristallinen Verband durch Diffusion zu verlassen. Im Einklang damit steht die Beobachtung, dass die Entstehung der Monomeren dem Schmelzen parallel voraus geht. Dies konnte in den IR-Spektren an Hand der Zunahme der relativen Bandenhöhe der Carbonyl-Absorption, im Vergleich zur relativen Bandenhöhe der CH<sub>2</sub>-Streckschwingung beobachtet werden.

Die absolute Absorption hängt unter der Verwendung der ATR-Technik sowohl stark vom optischen Kontakt der Probe zum ZnSe-Kristall als auch von der ausgeleuchteten Fläche ab und ist positiv mit diesen beiden Parametern korreliert. Die Wachskristalle bilden im nativen Zustand jedoch ein dreidimensionales Netzwerk (vgl. Kap. 3.3.1, 3.3.4), das möglicherweise eine nur geringe Kontaktfläche zum ZnSe-Kristall ausbildet. Das Schmelzen zu einem nahezu zweidimensionalen Flüssigkeitsfilm könnte somit die Absorptionsintensitäten beeinflussen. Die Intensität der asymmetrischen Streckschwingungsbande erhöhte sich während des Schmelzens jedoch kaum, sodass der Anstieg der Carbonyl-Absorption auf eine Zunahme freier Aldehyde zurückgeführt werden kann. Zusammen mit der erfolgten chemischen Analyse konnte daher bestätigt werden, dass eine thermische Zersetzung des Polymers zu Aldehyd-Monomeren und keine weiteren chemischen Umwandlungen stattfanden.

Die epikutikulären Wachskristalle von *N. alata* bestanden jedoch zu 40% auch aus anderen Molekülen als Aldehyden. Diese könnten nach dem beschriebenen Modell verteilt zwischen den Aldehydmolekülen in das Kristallgitter eingefügt sein und würden damit die Größe der zusammenhängenden polymer-kristallinen Domänen verringern. Damit würde die zum Schmelzen benötigte Energie erniedrigt. In umgekehrter Weise, sollte die räumliche Ausdehnung dieser Domänen und die Länge zusammenhängender Polymerketten mit der Reinheit des Materials zunehmen. Die steigende Anzahl der Polymerbindungen, gemeinsam mit der homogeneren Packung der Moleküle, sollte dann die zum Schmelzen benötigte Energie, d.h. die Temperaturen des Schmelzbereichs erhöhen. Im Einklang mit dieser Hypothese standen das Phasenverhalten der Wachskristalle von *N. albomarginata* und *N. intermedia*, die sich zu 78% bzw. 81% aus Aldehyden zusammensetzten. Wurde die Temperatur dieser Wachse kontinuierlich erhöht, zeigten sich deutliche Anzeichen für das Schmelzen bei 80°C (*N. albomarginata*) bzw. 91°C (*N. intermedia*), und somit bei deutlich höheren Temperaturen als bei *N. alata* (60% Aldehyde; Beginn des Schmelzbereiches: 75°C). Die Lagen der Absorptionsmaxima der CH<sub>2</sub>-Streckschwingungen wiesen jedoch darauf hin, dass beide Wachse auch bei 95°C noch nicht vollständig geschmolzen waren. Im Vergleich zum Schmelzbereich (88-



91°C) des reinen ( $\geq 96\%$ ), jedoch monomeren Triacontanal wurde deutlich, dass neben der für das Überwinden der nicht-kovalenten Bindungskräfte benötigten Energie, zusätzliche Energie für die Depolymerisation aufgebracht werden musste.

Das Auftreten von Bandendupletts der CH<sub>2</sub>-Wiegechwingungen in den IR-Spektren der Wachse von *N. albomarginata* und *N. intermedia* bei der gerätespezifischen Höchsttemperatur von 95°C zeigte zudem, dass sich auch bei dieser relativ hohen Temperatur noch nennenswerte Volumenanteile in einer fest-kristallinen Phase befanden. Ein vollständiger Übergang in eine flüssig-amorphe Phase vollzog sich jedoch im Laufe der Zeit, obwohl die Temperaturen nicht weiter erhöht wurden. Der Phasenübergang war dabei ebenfalls von einem parallelen, jedoch stets früher stattfindenden Anstieg der Carbonyl-Absorptionen begleitet. Dies bestätigte einerseits erneut den kausalen Zusammenhang zwischen der Depolymerisation der Aldehyde und der daraus resultierenden höheren Mobilität der Moleküle, durch die erst der Übergang in eine flüssige Phase ermöglicht wird. Andererseits deuteten die beobachteten Zeitverzögerungen im Falle von *N. albomarginata* und *N. intermedia* darauf hin, dass der Prozess der Depolymerisation unter kinetischer Kontrolle steht, während das Schmelzen ein thermodynamisch kontrollierter Prozess ist. Die Polymerisation und Depolymerisation von Aldehyden stellt eine Gleichgewichtsreaktion dar, die u.a. durch Temperaturerhöhung in Richtung der Monomere getrieben wird (Vogl 2000a, 2000b). Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung könnte dabei jedoch, auf Grund des höheren Polymerisationsgrades, den limitierenden Schritt bei *N. albomarginata* und *N. intermedia* dargestellt haben. Damit im Einklang standen weiterhin die Befunde der Extraktionsexperimente mit warmem Chloroform (s. Kap. 3.3.3.3). Das Kristallmaterial konnte erst nach wiederholter Energiezufuhr mobilisiert werden, und die IR-spektroskopische Analyse einer Lösung mechanisch präparierter Kristalle zeigte, dass hierbei monomere Aldehyde entstanden. Die Gradienten in den chemischen Zusammensetzungen aufeinander folgender Extraktionsschritte wiesen darauf hin, dass mit dem letzten Schritt ausschließlich Komponenten der polymer-kristallinen Domänen gewonnen wurde.

#### 4.4.5 Polymerisation von Aldehyden in den epikutikulären Wachskristallen von *N. alata*

Für die Bildung der Polymere auf der Pflanzenoberfläche müssen neben der hohen räumlichen Anordnung der Moleküle und der Temperatur zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen. Dies wurde deutlich, nachdem die epikutikulären Wachskristalle von *N. alata* nach dem Schmelzen wieder abgekühlt und anschließend bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Mit sinkender Temperatur sollte die Gleichgewichtslage wieder auf die Seite des Polymers verschoben werden. Dafür sprach die beobachtete, leichte Abnahme der Carbonyl-Absorption während des Abkühlens zwischen 68°C und 56°C (vgl. Abb. 4.9a). Die Polymerisation kam jedoch annähernd zum Stillstand, nachdem das Wachs in einen festen Aggregatzustand übergegangen und die Mobilität der Moleküle somit stark reduziert war. Obwohl die IR-Spektren dabei alle Merkmale eines hohen räumlichen Ordnungszustandes der Moleküle aufwiesen, erfolgte auch über einen relativ langen Zeitraum (184 Tage) keine vollständige Polymerisation.

Nach dem beschriebenen Modell zur molekularen Anordnung kutikulärer Wachsmoleküle (vgl. Kap. 4.4.3) könnte daher vermutet werden, dass sich die Bestandteile der Wachsmischung in der Schmelze durch Diffusion homogen verteilen. Während des anschließenden Abkühlens, aber noch in einer flüssig-amorphen Phase, könnten sich relativ geringe Anteile der noch mobilen Aldehydmoleküle auf Grund ihrer Polarität wieder in eigenen Domänen angereichert haben. Sie wären dadurch erneut in eine für die Ausbildung kovalenter Bindungen günstige räumliche Position geraten. Mit weiter sinkender Temperatur unter den Schmelzbereich hätte dann die Mobilität der Moleküle stark abgenommen und sich die Ausdehnung der polymer-kristallinen Domänen verlangsamt. Die geringe Polymerisationsrate bei Raumtemperatur könnte daher auf eine sehr niedrige Diffusionsgeschwindigkeit der verbliebenen Aldehyd-Monomeren im Festkörper zurückgeführt werden.

Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass sich die Ausbildung der epikutikulären Kristallschicht aus polymeren Aldehyden auf der Gleitzone von *N. alata* innerhalb von 10-20 Tagen und somit in einem wesentlich kürzeren Zeitraum vollzieht (Eichner 2003). Die Entwicklung der Kannen beginnt dabei als schlauchförmige Anlage am distalen Ende des verlängerten Blattstieles und benötigt ca. 43 Tage bis zum voll ausgereiften und funktionsfähigen Organ. Die späteren Kanneninnenwände entstehen dabei nach ca. 18 Tagen unter Ausbildung eines Hohlraums in der Kannenanlage, der sich während des anschließenden Größenwachstums der Kanne (ca. 25 Tage) stark erweitert. Eichner (2003) zeigte, dass bereits in einem frühen Stadium nach der Bildung der Kanneninnenwände (nach ca. 22 Tagen der Gesamtentwicklungsdauer), epikutikuläre Wachse in Form eines dünnen Films (ca. 7 µg/cm<sup>2</sup>) vorhanden sind. Dieser Wachsfilm bestand hauptsächlich (63%) aus primären Alkoholen, während Aldehyde nur in Spuren gefunden werden konnten. Das Auftreten epikutikulärer Kristalle begann ca. 7-10 Tage später und war mit einer massiven Zunahme der Wachsmenge auf ca. 33 µg/cm<sup>2</sup> bei voll entwickelten Kannen verbunden. Die Steigerung der Wachsbekleidung konnte dabei hauptsächlich auf die Akkumulation von Aldehyden, insbesondere von

---

Triacontanal, im epikutikulären Kompartiment zurückgeführt werden (Eichner 2003). Es muss also davon ausgegangen werden, dass sich die Aldehydmoleküle in der Phase der Kristallentstehung durch eine vergleichsweise hohe Mobilität innerhalb des intrakutikulären Kompartiments auszeichnen. Daraus ließe sich eine Hypothese zur Bildung epikutikulärer Wachskristalle aus polymeren Aldehyden ableiten: Innerhalb der Kutinmatrix könnte die Ausbildung großvolumiger Domänen aus angereicherten Aldehyden durch die Beimengungen anderer Wachskomponenten (>70% des intrakutikulären Wachses) und v.a. durch die Kutinmatrix selbst behindert sein. Die meisten Aldehydmoleküle würden frei als Monomere in der sie umgebenden Wachsmischung diffundieren. Durch die gesteigerte Biosyntheserate und den vermehrten Transport in die Kutikula könnte ein Konzentrationsgradient entstehen, wobei die Konzentration der Aldehyde an der Oberfläche der Kutinmatrix einen Schwellenwert für die Sättigung im intrakutikulären Kompartiment erreicht. An der Oberfläche der Kutinmatrix könnte gleichzeitig die räumliche Limitierung des Domänenwachstums durch die Kutinmatrix entfallen und das Wachstum von größeren Aldehyddomänen wäre begünstigt. Zusammen mit der hohen Konzentration und der Selbstanordnung in räumlich dichten Packungen, könnte parallel dazu der Polymerisationsprozess einsetzen. Die polymer gebundenen Moleküle würden dabei der intrakutikulären Mischung entzogen, jedoch ständig durch neu produziertes Material ersetzt. Das Wachstum der polymer-kristallinen Domänen wäre dabei nur durch die Verfügbarkeit an Aldehydmolekülen limitiert. Bei einer kurzzeitig geringeren Verfügbarkeit durch Schwankungen in der Biosynthese oder des Transports der Aldehyde, könnten dann zwischengelagerte Domänen aus Molekülen mit verschiedener, aber ähnlicher Polarität und Kettenlänge eingebaut werden. Nach weiterem Wachstum, würde die Gesamtheit der miteinander verbundenen Domänen schließlich als epikutikuläre Struktur rasterelektronenmikroskopisch erkennbar werden.

Zusammenfassend ergaben die Befunde dieses Kapitels der vorliegenden Arbeit, dass die epikutikulären Wachskristalle der Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten vorwiegend aus polymeren Aldehyden bestehen und diese vermutlich in Form von Polyacetalen vorliegen. Die ATR-FTIR-Spektroskopie erlaubte dabei eine Analyse der beteiligten Komponenten *in situ*. In Kombination mit der mechanischen Präparationsmethode konnten zudem erstmalig das Phasenverhalten und die molekulare Anordnung isolierter Wachskristalle analysiert werden. Dieser Ansatz kann zukünftig genutzt werden, die chemische Struktur und molekulare Anordnung, sowie die daraus resultierenden physikalischen Eigenschaften der epikutikulären Wachskristalle weiterer Pflanzenarten vergleichend zu untersuchen. So könnte

---

---

z.B. überprüft werden, ob die Aldehyde in den kutikulären Wachsen von Reis und Zuckerrohr ebenfalls in polymerer Form vorliegen, ob es sich dabei um die gleichen chemischen Strukturen wie bei *Nepenthes* handelt, und ob sich diese ebenfalls in den epikutikulären Kristallen befinden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Hypothese beschrieb die Bildung von Kristallen aus polymeren Aldehyden als physikalisch-chemischen Prozess aus spontaner Phasentrennung und Selbstorganisation der hochkonzentrierten Moleküle mit anschließender Polymerisation. Durch Untersuchungen an Pflanzenarten mit variierenden Anteilen an Aldehyden könnte diese Hypothese überprüft und gegebenenfalls ein Schwellenwert für die Konzentration der Aldehyde bestimmt werden. Nach einer mechanischen Entfernung des epikutikulären Materials mit verschiedenen Klebstoffen (vgl. Kap. 3) könnte die ATR-Technik zudem zur selektiven Analyse der intrakutikulären Wachse genutzt werden. Dabei sollte geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß sich polymer-kristalline Domänen bereits in diesem Kompartiment bilden. Dadurch könnten möglicherweise Rückschlüsse auf die Mobilität der Wachskomponenten gezogen und somit die Hypothese zu deren freien Diffusion bewertet werden. Der vorgestellte methodische Ansatz würde zudem erlauben, die Wachskomponenten in den beiden kutikulären Kompartimenten bei diversen Pflanzenarten zu untersuchen, und somit Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen und daraus resultierenden molekularen Anordnungen zu ziehen. Die dahinter stehende zentrale Frage wäre, welche physikalischen Eigenschaften daraus resultieren und wie diese, zusammen mit den chemischen Eigenschaften, mit deren unterschiedlichen ökologischen Funktionen in Beziehung stehen.

#### 4.4.6 Ökologische Funktion und Biosynthese epikutikulärer Wachskomponenten der Gleitzone von *Nepenthes*

Epikutikuläre Wachse waren auf Grund ihrer besonderen Position als äußerste Grenzschicht der Pflanze zu ihrer Umwelt Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Ihnen werden allgemein wichtige ökologische Funktionen im Transpirationsschutz, als Signale in zahlreichen Wechselwirkungen mit phytopathogenen Mikroorganismen und mit Herbivoren, als Strahlungs- und Kontaminationsschutz und als chemische sowie mechanische Barrieren zugeschrieben. Die Grundlagen, um diese verschiedenen Funktionen erfüllen zu können, liegen in den physikalisch-chemischen Eigenschaften und daher in der chemischen Zusammensetzung und molekularen Anordnung der beteiligten Komponenten. In vielen Fällen konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob bei der Analyse der epikutikulären Wachse

---

ultimate oder proximate Ursachen einer bestimmten Ausprägung betrachtet wurden, d.h. ob die Zusammensetzung evolutionär an die zugeschriebene Funktion angepasst war oder diese sekundär übernommen werden konnte.

Die charakteristischen Fangorgane von *Nepenthes* hingegen stellen einen hochgradig evolutionär angepassten Merkmalskomplex an die karnivore Lebensweise dieser Pflanzengattung dar. Die besondere Form der zu kannenförmigen Gebilden umgewandelten Blattspreiten, die Fähigkeit damit tierische Organismen anzulocken, zu fangen, zurückzuhalten, zu zersetzen und die resultierenden Nährstoffe schließlich aufzunehmen, können dabei als Anpassung an die Standortfaktoren der natürlichen Habitate angesehen werden. Für den Fang und die Zurückhaltung der Beute in der Kanne sind die besonderen Oberflächeneigenschaften einer definierten Zone der Kanneninnenwände maßgeblich von Bedeutung. In dieser Gleitzone verhindern auf der einen Seite charakteristisch umgewandelte Schließzellen, dass sich Insekten mit Hilfe von Krallen in der Epidermis einhaken können. Auf der anderen Seite ist der Besatz dieser Zone mit epikutikulären Wachskristallen ein zentrales Element im Beutefangmechanismus von *Nepenthes*. Die Kristalle lassen sich auf der gesamten Pflanzenoberfläche ausschließlich in diesem beschränkten Bereich direkt unterhalb der Kannenöffnung finden. Die Lokalisation an dieser strategisch bedeutsamen Stelle weist dabei auf die definierte ökologische Funktion im Beutefangmechanismus hin. In der vorliegenden Arbeit und in einer in enger Kooperation erstellten Diplomarbeit (Eichner 2003) konnte die chemische Zusammensetzung und molekulare Struktur der epikutikulären Wachskristalle von verschiedenen *Nepenthes*-Arten erstmals direkt bestimmt und vergleichend untersucht werden. Die dabei festgestellten Ähnlichkeiten innerhalb der Gattung *Nepenthes* einerseits, und die Besonderheiten gegenüber kutikulären Wachsen anderer Pflanzentaxa andererseits, weisen zusätzlich auf evolutionäre Anpassungen auch auf biosynthetischer Ebene hin.

Basierend auf zahlreichen vergleichenden Studien zur Zusammensetzung kutikulärer Wachse wurde ein allgemeines Modell zur Biosynthese dieser sehr langkettigen aliphatischen Komponenten vorgeschlagen (Übersicht in Kunst und Samuels 2003): Die Biosynthese kutikulärer Wachse hat ihren Ausgang in der allgemeinen *de novo* Fettsäuresynthese im Stroma der epidermalen Plastiden. Die resultierenden langkettigen, geradzahligen und gesättigten Fettsäuren ( $\leq C_{18}$ ) sind der Ausgangspunkt für die spezifischen Schritte der Wachsbiosynthese (Abb. 4.13). Außerhalb der Plastiden werden diese Vorläufer durch membrangebundene Fettsäure-Elongasen in mehreren Zyklen um  $C_2$ -Einheiten verlängert, wobei die beteiligten enzymatischen Reaktionen denen der *de novo* Synthese ähneln. Es wird vermutet, dass an der Verlängerung der Acyl-Ketten mehrere Elongasen in Form von Multienzymkomplexen mit

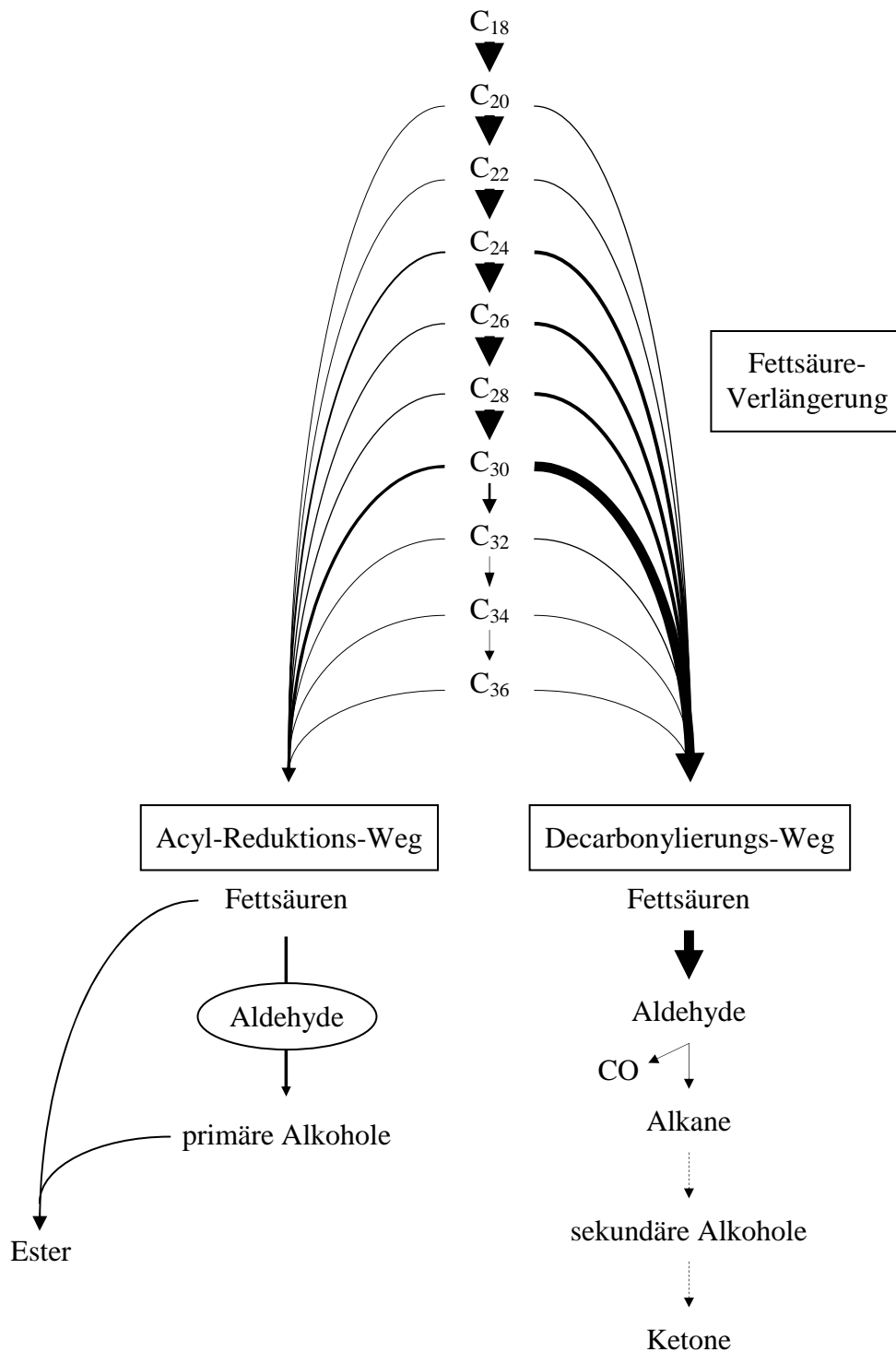
unterschiedlicher Substratspezifität beteiligt sind. Aus den Verlängerungssequenzen resultieren dann sehr langkettige Fettsäuren ( $\geq C_{20}$ ), die wiederum als Substrat für weiterführende Reaktionen zu den verschiedenen Substanzklassen dienen. Nach bisherigen Erkenntnissen lassen sich zwei prinzipielle Biosynthesewege unterscheiden, die zur Bildung von einerseits primären Alkoholen und Alkyl-Estern und andererseits von Aldehyden, Alkanen, sekundären Alkoholen und Ketonen führen (Abb. 4.13).

Im ersten Weg, dem Acyl-Reduktionsweg, werden die Fettsäuren durch Acyl-Reduktasen zu primären Alkoholen reduziert (Abb. 4.13). Als Zwischenstufe werden dabei Aldehyde gebildet, die jedoch am Enzym gebunden bleiben und nicht in freier Form auftreten. Im letzten Schritt werden dann primäre Alkohole und Fettsäuren durch Acyl-CoA:Alkohol-Acyltransferasen zu Alkyl-Ester umgesetzt. Im zweiten Weg, dem Decarboxylierungs-Weg, werden die Fettsäuren durch Acyl-CoA-Reduktase zunächst zu Aldehyden reduziert (Abb. 4.13). Die beteiligten Reduktasen sind dabei nicht identisch mit denen aus dem Acyl-Reduktions-Weg und entlassen die Aldehyde in freier Form. In einem weiteren Schritt katalysieren Aldehyd-Decarboxylasen, unter Abspaltung von Kohlenmonoxid, die Reaktion zu ungeradzahligen Alkanen. Aus diesen entstehen durch Hydroxylierung und anschließender Oxidation sekundäre Alkohole bzw. Ketone.

Trotz weitgehender Fortschritte in molekularbiologischen und biochemischen Analysemethoden, sind die Kenntnisse, z.B. über die Reaktionsmechanismen oder Substratspezifitäten einzelner an der Biosynthese kutikulärer Wachse beteiligter Genprodukte, fragmentarisch und oft nur indirekt erschlossen worden.

Die für den Beutefang grundlegenden Wachskristalle auf den Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten bestehen hauptsächlich aus Aldehyden, dabei v. a. aus dem  $C_{30}$ -Homologen. Die besondere ökologische Funktion dieser Strukturen wird dabei von wenigen Komponenten getragen, die ansonsten weit verbreitete Oberflächensubstanzen bei vielen Pflanzenarten darstellen. Die Bildung der Kristalle erwies sich als spontane Phasentrennung, deren Grundvoraussetzung lediglich die Akkumulation einer einzelnen Komponente über einen bestimmten Schwellenwert ist. Die Evolution der rutschigen Oberflächen erforderte daher lediglich die gesteigerte Biosynthese von Triacontanal, wahrscheinlich durch die Hochregulation weniger, bereits vorhandener Genprodukte. Nach dem beschriebenen Modell für die Biosynthese wären dies einerseits die Enzyme zur Fettsäure-Verlängerung bis  $C_{30}$ . Andererseits müsste eine entsprechende Acyl-CoA-Reduktase im Decarboxylierungs-Weg ausreichende Umsatzraten zeigen. Dabei könnte die Akkumulation von Triacontanal durch die Herunter-

regulierung der entsprechenden Enzyme an den Verzweigungspunkten zum Acyl-Reduktions-Weg und der Aldehyd-Decarboxylase im Decarboxylierungs-Weg unterstützt werden.



**Abb. 4.13** Hypothetischer Biosyntheseweg für aliphatische Komponenten kutikulärer Wachse von *Nepenthes*. Ausgangspunkt sind Fettsäuren ( $\leq C_{18}$ ) der *de novo* Biosynthese in den epidermalen Plastiden. Nach Kettenverlängerung werden die sehr langkettigen Fettsäuren ( $\geq C_{20}$ ) über zwei Biosynthese-Wege zu verschiedenen Substanzklassen umgesetzt, wobei Aldehyde im Acyl-Reduktions-Weg nicht in freier Form auftreten. Die Dicke der Pfeile weist auf den relativen Umsatz über bestimmte Verzweigungspunkte hin. Sekundäre Alkohole und Ketone können in *Nepenthes*-Wachsen nicht gefunden werden. Verändert nach Kunst und Samuels 2003.

Die Gattung *Nepenthes* könnte ein geeignetes System zur Untersuchung der Wachsbiosynthese darstellen. Zum einen zeigen die meisten der bisher untersuchten Arten eine sehr hohe Produktspezifität, d.h. eine relativ einheitliche Zusammensetzung der epikutikulären Wachskristalle. Auf der anderen Seite ist die der Kristallbildung zugrunde liegende Biosyntheseleistung auf einen klar abgegrenzten Bereich beschränkt, sodass vergleichende Untersuchungen an demselben Organ durchgeführt werden könnten.

Neben zahlreichen Fragen zur Biosynthese, stellt der anschließende Transport der Wachskomponenten aus der Zelle in die Kutikula eine immer noch rätselhafte Erscheinung dar. Auf der einen Seite stellen kutikuläre Wachse hoch hydrophobe Verbindungen dar, die auf der anderen Seite die hydrophilen Umgebungen des Apoplasten und der Zellwand passieren müssen. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die eine geeignete Umgebung für den Transport zur Verfügung stellen könnten (Übersicht in Kunst und Samuels 2003). So werden z.B. Proteine mit hydrophoben Taschen vorgeschlagen, die die Wachskomponenten an der Zellmembran übernehmen und durch die Zellwand transportieren. Andererseits wird vorgeschlagen, dass Komponenten der Zellwand kleinräumig hydrophobe Domänen bilden, die eine physikalische Weiterleitung der Wachskomponenten erlauben könnten. Bisher stehen jedoch nur wenige experimentelle Techniken zur Untersuchung dieser Transportmechanismen zur Verfügung. Eichner (2003) konnte zeigen, dass sich bei *N. alata* innerhalb kurzer Zeit (10-20 Tage) die Transportleistung individueller Epidermiszellen der Gleitzzone, hauptsächlich für eine einzelne Komponente (Triacontanal), um einen Faktor 53 erhöht. Auf Grund dieser hohen zeitlichen und räumlichen sowie chemischen Spezifität des Transports, könnte wiederum die Gattung *Nepenthes* ein geeignetes Objekt für die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen darstellen.

#### 4.4.7 Mechanismus rutschiger epikutikulärer Wachskristalle in *Nepenthes*-Kannen

Im Laufe der Evolution entwickelten Insekten eine Vielzahl von Strukturen, die ihnen die Anhaftung und Fortbewegung auf unterschiedlichen Substraten erlauben. Einerseits finden sich an den Endgliedern der meisten Insektentarsen stark sclerotisierte und somit harte Krallen, die das Einhaken an Oberflächenrauigkeiten ähnlicher Dimension ermöglichen. Der Anhaftung an glatten Substraten dienen andererseits Haftorgane, an denen entweder weiche Polster oder Strukturen mit setosen oder haarigen Oberflächen beteiligt sind (Zusammenfassung bei Beutel und Gorb 2001). Beide Typen von Haftorganen benutzen flexible Materialien, um die Kontaktfläche zum Substrat zu optimieren (Gorb 2001). Zudem kann der

---

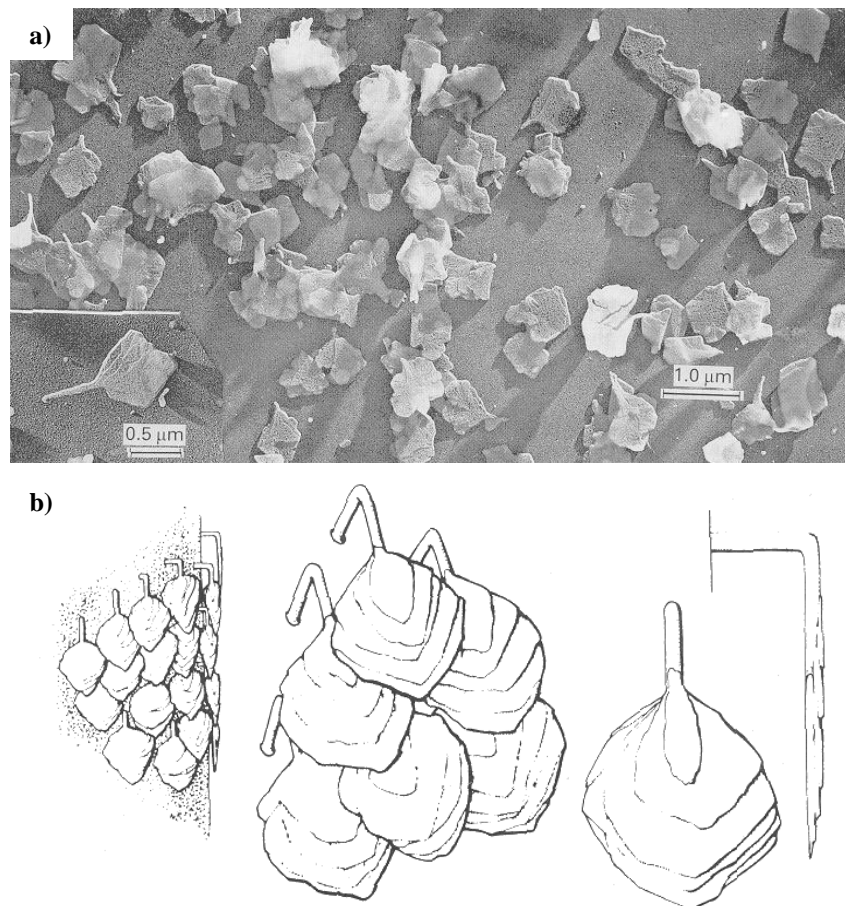


Kontakt durch oberflächenaktive Ausscheidungen an den Insektenfüßen weiter verbessert werden. Derartige Ausscheidungen vermitteln die Kräfte zwischen Insektenfuß und Substrat durch molekulare Adhäsion und die Oberflächenspannung eines dünnen Flüssigkeitsfilms (Eisner and Aneshansley 2000; Federle et al. 2001).

Dem gegenüber können Pflanzenoberflächen, die mit epikutikulären Wachskristallen bedeckt sind, extrem rutschig für laufende Insekten sein (Juniper 1995; Juniper et al. 1989; Eigenbrode et al. 1996). Die Gleitzonen von *Nepenthes*-Kannen spielen eine herausragende Rolle im Fang von Beuteinsekten und waren die ersten Beispiele, in denen epikutikulären Wachskristallen eine bestimmte ökologische Funktion zugeordnet werden konnte (Knoll 1914). In den letzten Jahren wurden verschiedene Aspekte rutschiger Wachskristalle im Zusammenhang symbiotischer Wechselwirkungen zwischen Ameisen und Pflanzen (Federle et al. 1997, 2000) und direkter (Stork 1980a; Brennan und Weinbaum 2001) oder indirekter (Eigenbrode et al. 1996, 1999) Verteidigung gegen Herbivore untersucht. Jedoch ist es eine offene Frage, wie die Kristalle die Pflanzenoberfläche rutschig für Insekten machen. Die Wechselwirkungen zwischen den Haftorganen der Insekten und den unterschiedlichen Pflanzenoberflächen hängen stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der beteiligten Materialien ab. Über die Eigenschaften z.B. von Haftsekreten bei Insekten, ist bisher sehr wenig bekannt (Attagalle et al. 2000; Vötsch et al. 2002).

Für die Pflanzenseite der Wechselwirkung schlug Knoll (1914) für *Nepenthes* vor, dass die epikutikulären Kristalle leicht von der Pflanzenoberfläche abbrechen. Insekten versuchten, nachdem sie auf *Nepenthes*-Oberflächen gelaufen waren, ihre Füße zu reinigen, was darauf hindeutete, dass die Kristalle unter der Gewichtskraft der Insekten abgebrochen waren und die Haftorgane verschmutzten. Diese Interpretation wurde später durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 4.14a) von Kohlenstoffreplika der *Nepenthes*-Wachsplättchen gestützt (Juniper und Burras 1962; Juniper et al. 1989). Diese Befunde zusammen genommen führten zu einem Modell, das die Kristalle als extrem rutschig beschrieb: Die parallele Orientierung der Wachsplättchen zur Kannenoberfläche, ähnlich zu Dachziegeln (Abb. 4.14b), würde einen perfekten Kontakt zwischen Insektenfuß und Kristall erlauben. Da die Kristalle durch dünne Haken an der darunter liegenden Kutikulaoberfläche befestigt sind, würden sie leicht brechen, und so der Kontakt von beidem, Fuß und Kristall, von der Kannenoberfläche verloren gehen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde über die inneren Oberflächen von *Nepenthes*-Kannen sind mit dieser Hypothese jedoch nicht vereinbar. Werden alle Daten der unterschiedlichen Analysen (REM, GC-MS, FT-IR) zusammengefasst, können die Eigenschaften der



**Abb. 4.14** a) Transmissionselektronenmikroskopische-Aufnahme von Kohlenstoffreplika epikutikulärer Wachskristalle einer *Nepenthes*-Gleitzone und b) deren künstlerische Interpretation. a) nach Juniper und Burras 1962, b) nach Juniper et al. 1989.

epikutikulären Wachskristalle auf den Gleitzonenoberflächen von *Nepenthes*-Kannen im Kontext ihrer ökologischen Funktion neu beurteilt werden: (1) Die schmalen Seiten der Kristalle sind zum Lumen der Kanne hin ausgerichtet. (2) Die Kristalle bilden keine einzelne, isolierte Aggregate, sondern ein Netzwerk aus sich teilweise durchdringenden Plättchen. (3) Auch nach der Trennung vom darunter liegenden Gewebe, zeigt das Netzwerk eine hohe strukturelle Integrität. (4) Die Plättchen bestehen aus polymeren Aldehyden, durch die sie chemisch und thermisch und möglicherweise auch mechanisch verstärkt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass die Kristalle im Kräftebereich den ein Haftorgan eines Insekts auf sie ausübt (wenn auch nicht im Kräftebereich der Klebstoffbehandlung) mechanisch stabil sind.

Andere hypothetische Mechanismen, möglicherweise in Kombination, würden dann die Rutschigkeit der inneren Oberflächen von *Nepenthes*-Kannen verursachen. (i) Die Orientierung der Kristalle, die nur kleine Flächen in Richtung der Insektenfüße aufweisen, könnte die Anzahl der Kontaktpunkte zwischen den Oberflächen der Haftorgane und der Oberfläche

der Pflanze begrenzen. Dadurch würden sich auch die Haft- und Reibungskräfte verringern, die zwischen den beteiligten Oberflächen übertragen werden können. (ii) Die erniedrigte Oberflächenenergie des Substrats könnte einerseits die Benetzbarkeit durch hydrophile Haftflüssigkeiten herabsetzen und somit Rutschigkeit verursachen. (iii) Andererseits wäre jedoch auch möglich, dass eine hydrophobe Haftflüssigkeit durch kapillare Adsorption von den Kontaktpunkten in die Hohlräume des Kristallnetzwerkes gezogen und somit eine Flüssigkeits-Adhesion verhindert wird (Eigenbrode 2004). (iv) Haftflüssigkeiten könnten die epikutikulären Kristalle anlösen und der resultierende, relativ dicke Flüssigkeitsfilm ähnlich einer Gleitschicht wirken (Eigenbrode 2004). Unterschreiten die insgesamt resultierenden Haft- und Reibungskräfte einen für die entsprechende Gewichtskraft des Insektes kritischen Schwellenwert, rutscht das Insekt ab.

In jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, dass die Haftfähigkeit von Insekten auf unterschiedlichen Oberflächen eine messbare Größe ist (Eigenbrode und Kabalo 1999; Eigenbrode et al. 1999; Federle et al. 2000; Scherge und Gorb 2001) und die Funktionsweise von Haftorganen bei Ameisen wurde näher beschrieben (Federle et al. 2001). Um jedoch den Einfluss möglicher Mechanismen während der Wechselwirkung von verschiedenen Pflanzenoberflächen mit den Haftorganen von Insekten beurteilen zu können, müssen in weitergehenden Untersuchungen deren physikalische und mechanische Eigenschaften charakterisiert werden.

Für die Pflanzenseite könnten die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden zur Charakterisierung kristalltragender Oberflächen die Grundlage für derartige mechanistischen Untersuchungen zur Verfügung stellen. Zum einen können nun rutschige Oberflächen verschiedener Pflanzentaxa selektiv beprobt und verschiedene Zusammensetzungen und Formen epikutikulärer Wachskristalle vergleichend untersucht werden. Zum anderen eröffnet die beschriebene Beprobungsstrategie die Möglichkeit, weitere physikalische Eigenschaften der Kristalle zu bestimmen. Es konnten Vorversuche durchgeführt werden, die darauf hindeuten, dass die mechanische Stabilität der Kristalle durch eine Kombination des verwendeten Klebstoffes (*Gummi arabicum*) mit einer geeigneten Technik zur Messung geringer Kräfte (Dehnungsmessstreifen) bestimmt werden kann. Für diesen Zweck konnten erste Prototypen von Kraftmessern gebaut und erste Tests durchgeführt werden. Sollte die Weiterentwicklung dieser Technik erfolgreich verlaufen, könnte geprüft werden, inwieweit die chemische Zusammensetzung und molekulare Anordnung der beteiligten Komponenten in epikutikulären Wachskristallen auf verschiedenen Pflanzenoberflächen mit deren mechanischen Kapazität in Verbindung steht. In gleicher Weise werden zurzeit Methoden entwickelt, die einerseits eine

---

detaillierte Charakterisierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften von Haftsekreten bei Insekten erlauben, und andererseits die Messung der durch sie übertragenen Kräfte auf unterschiedliche Oberflächen ermöglichen (Federle, persönliche Mitteilung).

Eine Kombination der Erkenntnisse aus den unterschiedlichen methodischen Ansätzen würde dann eine Überprüfung der Hypothesen zur Entstehung rutschiger Pflanzenoberflächen in verschiedenen ökologischen Zusammenhängen ermöglichen. Durch den Vergleich verschiedener Pflanzenarten könnte bewertet werden, inwieweit die epikutikulären Wachskristalle auf den Gleitzonen verschiedener *Nepenthes*-Arten eine besondere Stellung bezüglich ihrer Form, chemischen Zusammensetzung und der daraus resultierenden physikalischen Eigenschaften einnehmen.

---

---

## 5 Zusammenfassung

Pflanzen der Gattung *Nepenthes* decken einen erheblichen Anteil ihres Nährstoffbedarfs durch den Fang und die Verdauung tierischer Beute, insbesondere von Insekten. Als Fangorgane dienen hochgradig umgewandelte Blattspreiten in Form kannenartiger Fallgruben. Die Innenseiten dieser Kannen sind in einer breiten Zone dicht mit epikutikulären Wachskristallen besetzt. Es war seit langem bekannt, dass die Oberflächen dieser so genannten Gleitzone extrem rutschig für die meisten Insekten sind und eine zentrale Rolle beim Fang und der Zurückhaltung der Beute in der Kanne spielen. Frühere Untersuchungen beschrieben die Kristalle dabei als extrem fragil, wodurch diese unter der mechanischen Belastung eines Insekts leicht abbrechen und somit der Kontakt zur Pflanzenoberfläche verloren geht. Um diese Hypothese zu überprüfen und den Mechanismus der Rutschigkeit verstehen zu können, hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, sowohl die strukturellen als auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Wachskristalle in den Kannen von *N. alata*, *N. albomarginata* und *N. intermedia* vergleichend zu charakterisieren.

Diese Eigenschaften können jedoch nur dann bewertet werden, wenn die chemische Zusammensetzung der Wachskristalle verlässlich bestimmt werden kann. Im Allgemeinen stellen kutikuläre Wachse komplexe Mischungen zyklischer und aliphatischer Substanzen mit verschiedenen funktionellen Gruppen dar. Um die gaschromatographische Trennung und massenspektrometrische Analyse der Komponenten zu erleichtern, werden hydroxyl-haltige Verbindungen häufig durch eine Derivatisierung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) in die entsprechenden Trimethylsilyl-Ether bzw. -Ester überführt. Dabei können jedoch auch unerwünschten Nebenreaktionen carbonyl-haltiger Verbindungen auftreten, die eine quantitative Analyse der ursprünglichen Komponenten erschweren.

Im ersten Teil dieser Arbeit ergab die Überprüfung der Derivatisierungsreaktion, dass aliphatische Aldehyde mit BSTFA zu *cis-trans* isomeren Alkenyl-Trimethylsilyl-Ethern und Alkenyl-Acetamid-Addukten reagierten. Weiterhin bildeten sich aus Aldehyden und primären Alkoholen unter den gegebenen Bedingungen, *cis-trans* isomere Alkenyl-Alkyl-Ether. Es konnte gezeigt werden, dass eine verlässliche und quantitative Bestimmung der ursprünglich vorhandenen Aldehyd- und Alkoholmengen nur unter einer Quantifizierung der in den resultierenden Nebenprodukten gebundenen Mengen möglich war.

Im zweiten Teil dieser Arbeit zeigten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an den Gleitzoneoberflächen von drei *Nepenthes*-Arten, dass die epikutikulären Wachskristalle ein Netzwerk aus glattrandigen Plättchen bilden und senkrecht aus den Oberflächen

---

---

herausstehen. Es wurden Methoden etabliert, die eine mechanische Präparation der Wachs-kristalle von den Gleitzonenoberflächen erlaubten. Dabei zeigten die Kristalle eine hohe strukturelle Integrität. Die Beprobungsstrategien erwiesen sich als selektiv für die epikutikulären Wachse und somit für die Schnittstelle der Pflanze-Insekten-Wechselwirkung. Die anschließenden chemischen Analysen zeigten deutliche Gradienten zwischen den Zusammen-setzungen der epikutikulären und intrakutikulären Wachskompartimente. Die epikutikulären Kristalle bestanden aus Mischungen aliphatischer Komponenten und waren von sehr lang-kettigen Aldehyden dominiert. Triacontanal war in allen Fällen die Hauptkomponente und weitgehend für die Kristallbildung verantwortlich. Diese Ergebnisse quantifizierten erstmalig direkt die Zusammensetzung epikutikulärer Wachs-kristalle und bestätigten die für deren Bildung ursprüngliche Hypothese einer spontanen Phasentrennung eines hochkonzentrierten Bestandteils. Die schlechte Löslichkeit der Kristalle von verschiedenen *Nepenthes*-Arten in Chloroform wies zudem darauf hin, dass sie polymere Formen der Aldehyde beinhalteten.

Diese Vermutung konnte im dritten Teil dieser Arbeit durch ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Die Kombination dieser Analysetechnik mit einer der mechanischen Beprobungsstrategien zeigte, dass weder isolierte Kristalle, noch Kristalle auf nativen Oberflächen, monomere Aldehyde beinhalteten. Diese konnten jedoch durch Temperaturerhöhung oder Lösen in Chloroform unter erhöhter Temperatur freigesetzt werden. Auf Grund charakteristischer Absorptionseigenschaften, der molekularen Anordnung sowie dem Phasenverhalten der beteiligten Komponenten konnte geschlossen werden, dass die Aldehyde in nativen Kristallen in Form von Polyacetalen vorliegen. Dies lässt vermuten, dass die epikutikulären Wachs-kristalle dadurch nicht nur thermisch und chemisch, sondern auch mechanisch verstärkt werden.

Werden alle Daten zusammengefasst, können die strukturellen sowie physikalisch-chemischen Eigenschaften der epikutikulären Wachs-kristalle auf den Gleitzonenoberflächen verschiedener *Nepenthes*-Arten im Kontext ihrer ökologischen Funktion neu beurteilt werden. Auf diesen Ergebnissen basierend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Kristalle im Kräftebereich, den ein Haftorgan eines Insektes auf sie ausübt, mechanisch stabil sind und somit andere Mechanismen die Rutschigkeit verursachen.

---

---

## 6 Summary

Plants in the genus *Nepenthes* obtain a substantial nutrient supply by trapping and digesting animal prey, especially insects. The trapping organs are highly modified leaf blades forming pitcher-like pitfalls. A broad zone of the inner surface of these traps is densely covered with epicuticular wax crystals. It was long known that these surfaces are extremely slippery for most insects and play a pivotal role in trapping and retaining of pray in the pitcher. Earlier investigations described the crystals as extremely fragile, breaking easily under the mechanical load of an insect and hence preventing contact to the plant surface. To test this hypothesis and to understand the mechanism of slipperiness, this work aimed to comparatively characterize the structural as well as the physico-chemical properties of the wax crystals in the pitchers of *N. alata*, *N. albomarginata* and *N. intermedia*.

However, these properties can only be judged if the chemical composition of the crystals can be determined reliably. Cuticular waxes commonly represent complex mixtures of cyclic and aliphatic substances with different functional groups. To facilitate the gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of the components, hydroxyl-containing compounds are often transformed into the corresponding trimethylsilyl ethers or esters by derivatization with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). During this reaction however, also undesired side products of carbonyl-containing compounds may occur, impeding a quantitative analysis of the original compounds.

In the first part of this work the examination of the derivatization reaction showed that aliphatic aldehydes reacted with BSTFA to *cis-trans* isomeric alkenyltrimethylsilyl ethers and alkenylacetamide adducts. Furthermore, aldehydes formed *cis-trans* isomeric alkenylalkyl ethers with primary alcohols under the given conditions. It was shown that reliable and quantitative determinations of the original aldehyde and alcohol contents were only possible by quantification also of their amounts present in side products.

In the second part of this work scanning electron microscopic studies on the inner surfaces of the pitchers revealed the crystals to form a network of entire platelets protruding perpendicularly from the surfaces. Methods for the mechanical preparation of the wax crystals were established in which the crystals showed a high structural integrity. The sampling strategies proved to be highly selective for the epicuticular wax material and hence, for the interface of the plant-insect interaction. The following chemical analyses revealed distinct gradients between the compositions of the epicuticular and intracuticular compartments. The epicuticular crystals consisted of a mixture of aliphatic components that was dominated by very

---

---

long-chain aldehydes. In all cases, triacontanal was the major constituent and largely responsible for crystal formation. These results for the first time directly quantified the composition of epicuticular wax crystals and confirmed the original hypothesis that described crystal formation as a spontaneous phase separation of one highly concentrated constituent. The low solubility of the crystals from different *Nepenthes* species indicated moreover, that they contained polymeric forms of the aldehydes.

This assumption could be verified by ATR-FTIR spectroscopic studies. The combination of this analytical technique with one of the mechanical sampling strategies showed that neither isolated crystals nor those crystals on native surfaces contained monomeric aldehydes. These however could be released by heating or dissolving the crystals in chloroform at elevated temperatures. From the characteristic absorption properties, the molecular arrangement as well as the phase behaviour of the involved components it was concluded that the aldehydes in native crystals existed as polyacetals. From this the epicuticular wax crystals are assumed not only to be reinforced thermally and chemically but also mechanically.

Combining all data, the structural and physico-chemical properties of the epicuticular wax crystals on the slippery surfaces of different *Nepenthes* species can be newly judged with regard to their ecological function. Based on these results, it is hypothesized that the crystals are mechanically stable in the force range applied by an insect attachment device and therefore other mechanisms cause the slipperiness.

---



---

## 7 Literaturverzeichnis

- An C-I, Fukusaki E, Kobayashi A (2002a) Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* 214: 661-667
- An C-I, Takekawa S, Okazawa A, Fukusaki E, Kobayashi A (2002b) Degradation of a peptide in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* 215: 472-477
- Attagalle AB, Aneshansley DJ, Meinwald J, Eisner T (2000) Defence by foot adhesion in a chrysomelid beetle (*Hemisphaerota cyanea*): characterisation of the adhesive oil. *Zoology* 103: 1-6
- Auerbach F, Barshall H (1907) Studien über Formaldehyde: Die Festen Polymeren des Formaldehydes. Springer, Berlin
- Baker EA (1982) Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE (Hrsg.) *The plant cuticle*. Academic Press, London, S. 139-166
- Barthlott W, Neinhuis C (1997) Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202: 1-8
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 237-260
- Basson I, Reynhardt EC (1988a) An investigation of the structures and molecular dynamics of natural waxes. 1. Beeswax. *J. Phys. D* 21: 1421-1428
- Basson I, Reynhardt EC (1988b) An investigation of the structures and molecular dynamics of natural waxes. 2. Carnauba wax. *J. Phys. D* 21: 1429-1433
- Basson I, Reynhardt EC (1992) The structure and melting of paraffinic Fischer-Tropsch waxes. *Chem. Phys. Letters* 198: 367-372
- Beutel RG, Gorb SN (2001) Ultrastructure of attachment specializations of hexapodes (Arthropoda): evolutionary patterns inferred from a revised ordinal phylogeny. *J Zool Syst Evol Research* 39: 177-207
- Bianchi G (1995) Plant Waxes. In: Hamilton RJ (Hrsg.): *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. Oily Press, Dundee, West Ferry, S. 177-222
- Blau K, Halket JM (1993) *Handbook of Derivatives for Chromatography*. 2. Ausg., Wiley, West Sussex
- Blume A (1996) Properties of lipid vesicles: FT-IR spectroscopy and fluorescence probe studies. *Current Opinion in Colloids & Interface Science* 1: 64-77
- Brennan EB, Weinbaum SA (2001) Effect of epicuticular wax on adhesion of psyllids to glaucous juvenile and glossy adult leaves of *Eucalyptus globulus* Labillardière. *Aust J Entomol* 40: 270-277
- Brownbridge P (1983) Silyl Enol Ethers in Synthesis - Part II. *Synthesis* 1: 85-104
-

- 
- Butlerov AM (1859) Über einige Derivate des Jodmethylens. *Annalen der Chemie* 111: 242-252
- Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD (1983) Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol. Plant* 58: 445-450
- Carrasco F, Pages P, Saurina J, Colom X (1995) Estudio mediante FT i.r. y DSC de los cambios de cristalinidad del polietileno de alta densidad inducidos por condiciones climáticas drásticas. *Afinidad* 52: 231-237
- Carreto L, Almeida AR, Fernandes AC, Vaz WLC (2002) Thermotropic Mesomorphism of a Model System for the Plant Epicuticular Wax Layer. *Biophysical Journal* 82: 530-540
- Carver TLW, Thomas BJ, Ingerson-Morris SM, Roderick HW (1990) The role of the abaxial leaf surface waxes of *Lolium spp.* in resistance to *Erysiphe graminis*. *Plant Pathol.* 39: 573-583
- Casado CG, Heredia A (2001) Self-Association of Plant Wax Components: A Thermodynamic Analysis. *Biomacromolecules* 2: 407-409
- Chamel A, Maréchal Y (1992) Characterization of isolated plant cuticles using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *C R Acad Sci [III]* 315: 347-354
- Christiansen K, Mahadevan V, Viswanathan CV, Holman RT (1969) Mass spectrometry of long-chain aliphatic aldehydes, dimethyl acetals and alk-1-enyl ethers. *Lipids* 4(6): 421-427
- Clark JB, Lister GR (1975) Photosynthetic action spectra of trees 2. The relationship of cuticle structure to the visible and uv spectral properties of needles from four coniferous species. *Plant Physiology* 55: 407-413
- Danser BH (1928) The Nepenthaceae of the Netherlands Indies. *Bull. Jard. Bot. Buitenzorg* 3(9): 249-260
- Darwin C (1875) *Insectivorous plants*. John Murray, London
- DeBary A (1871) Über die Wachsüberzüge der Epidermis. *Botanische Zeitschrift* 29: 128-139, 145-154, 161-176, 566-571, 573-585, 605-619
- Deising H, Nicholson RL, Haug M, Howard RJ, Mendgen K (1992) Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *Plant Cell* 4: 1101-1111
- Dubis EN, Dubis AT, Morzycki JW (1999) Comparative analysis of plant cuticular waxes using HATR FT-IR reflection technique. *Journal of Molecular Structure* 511-512: 173-179
- Edwards D, Abbott GD, Raven JA (1996) Cuticles of early land plants: a paleoecophysiological evaluation. In Kerstiens G (Hrsg.) *Plant cuticles: an integrated functional approach*. BIOS Scientific Publishers. Oxford, S. 1-26
- Edwards PB (1982) Do waxes on juvenile *Eucalyptus* leaves provide protection from grazing insects. *Aust. J. Ecol.* 7: 347-352
-

- 
- Eichner A (2003) Zusammensetzung, Struktur und Bildung der Kutikularwachse in Blattfallen der Gattung *Nepenthes* (Nepenthaceae). Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Eigenbrode SD (2004) The effects of plant epicuticular waxy blooms on attachment and effectiveness of predatory insects. *Arthropod Structure & Development* (im Druck)
- Eigenbrode SD, Castagnola T, Roux M-B, Steljes L (1996) Mobility of three generalist predators is greater on cabbage with glossy leaf wax than on cabbage with a wax bloom. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 81: 335-343.
- Eigenbrode SD, Espelie KE (1995) Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 171-194
- Eigenbrode SD, Kabalo NN (1999) Effects of *Brassica oleracea* waxblooms on predation and attachment by *Hippodamia convergens*. *Entomol Exp Appl* 91: 125-130
- Eigenbrode SD, Kabalo NN, Stoner KA (1999) Predation, behaviour, and attachment by *Chrysoperla ploribunda* larvae on *Brassica oleracea* with different surface waxblooms. *Entomol Exp Appl* 90: 225-235
- Eigenbrode SD, Moodie S, Castagnola T (1995) Predators mediate host plant resistance to a phytophagous pest in cabbage with glossy leaf wax. *Entomol. Exp. Appl.* 77: 335-342
- Eisner T, Aneshansley DJ (2000) Defence by foot adhesion in a beetle (*Hemisphaerota cyanea*). *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6568-6573
- Ende M, Luftmann H (1984) Unerwartete Reaktionsprodukte von *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) mit Aldehyden. *Tetrahedron* 40(24): 5167-5170
- Ensikat HJ, Neinhuis C, Barthlott W (2000) Direct access to plant epicuticular wax crystals by a new mechanical isolation method. *Int. J. Plant Sci.* 161(1): 143-148
- Federle W, Brainerd EL, McMahon TA, Hölldobler B (2001) Biomechanics of the movable pretarsal adhesive organ in ants and bees. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6215-6220
- Federle W, Maschwitz U, Fiala B, Riederer M, Hölldobler B (1997) Slippery ant-plants and skilfull climbers: selection and protection of specific ant partners by epicuticular wax blooms in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Oecologia* 112: 217-224
- Federle W, Rohrseitz K, Hölldobler B (2000) Attachment forces of ants measured with a centrifuge: better `wax-runners` have poorer attachment to a smooth surface. *J Exp Biol* 203: 505-512
- Fiala B, Maschwitz U, Tho YP, Helbig AJ (1989) Studies of a South East Asian ant-plant association: protection of *Macaranga* trees by *Crematogaster borneensis*. *Oecologia* 79: 463-470
- Fringeli UP (1992) In Situ Infrared Attenuated Total Reflectance (IR ATR) Spectroscopy: A Complementary Analytical Tool for Drug Design and Drug Delivery. *Chimica* 46: 200-214
-

- 
- Gaume L, Gorb SN, Rowe N (2002) Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytol* 156: 479-489
- Gilpin JA, Mc Lafferty FW (1957) Mass Spectrometric Analysis: Aliphatic Aldehydes. *Analytical Chemistry* 29: 990-994
- Gohlke RS (1959) Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography. *Analytical Chemistry* 31(4): 535-541
- Gorb SN (2001) Attachment Devices of the Insect Cuticle. Kluwer, Dordrecht
- Günzler H, Böck H (1983) IR-Spektroskopie: Eine Einführung. VCH, Weinheim
- Haas K, Brune T, Rücker E (2001) Epicuticular Wax Crystalloids in Rice and Sugar Cane Leaves are Reinforced by Polymeric Aldehydes. *Journal of Applied Botany* 75: 178-187
- Hallam ND, Chambers TC (1970) The leaf waxes of the genus *Eucalyptus* L'Heritier. *Australien Journal of Botany* 18: 335-386
- Hammer PE, Evensen KB (1994) Differences between rose cultivars in susceptibility to infection by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 84: 1305-1312
- Harley R (1991) The greasy pole syndrome. In: Huxley CR, Cutler DF (Hrsg.) Ant-plant interactions. Oxford Univ. Press, Oxford, S. 430-433
- Harrison AG (1970) The high-resolution mass spectra of aliphatic aldehydes. *Organic Mass Spectrometry* 3: 549-555
- Hastie GP, Roberts KJ (1994) Investigation of inter- and intra-molecular packing in the solid state for crystals of normal alkanes and homologous mixtures using FT-IR spectroscopy. *Journal of Materials Science* 29: 1915-1919
- Hedge Y, Kolattukudy PE (1997) Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 51: 75-84
- Heredia A (2003) Biophysical and biomechanical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1620: 1-7
- Holloway PJ (1969) Chemistry of leaf waxes in relation to wetting. *J. Sci. Fd Agric.* 20: 124-128
- Holloway PJ (1970) Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pestic. Sci.* 1: 156-163
- Holloway PJ (1982) Structure and histochemistry of plant cuticular membranes: An overview. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE (Hrsg.) *The Plant Cuticle*. Academic Press, London, UK, S. 1-32
- Holloway PJ (1984) Surface lipids of plants and animals. In: Mangold HK, Zweig G, Sherma J (Hrsg.) *Handbook of chromatography, Lipids vol 1*. CRC Press, Boca Raton, S 347-380
- Holloway PJ, Jeffree CE, Baker EA (1976) Structural determination of secondary alcohols from plant epicuticular waxes. *Phytochemistry* 15: 1768-1770
-

- 
- Holthuis U, Boyle C (1989) The influence of structural leaf epidermis morphology of summer barley upon spore deposition and infection by *Erysiphe graminis f. sp. Hordei*. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 96: 494-507
- Inyang EN, Butt TM, Beckett A, Archer S (1999) The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. Mycological Research 103: 419-426
- Iwahashi M, Yamaguchi Y, Ogura Y, Suzuki M (1990) Dynamical structures of normal alkanes, alcohols, and fatty acids in the liquid state as determined by viscosity, self-diffusion coefficient, infrared spectra, and <sup>13</sup>C NMR spin-lattice relaxation time measurements. Bull Chem Soc Jpn 63: 2154-2158
- James AT, Martin AJP (1952) Gas-liquid partition chromatography - the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. Biochem. J. 50(5): 679-690
- Jebb M, Cheek M (1997) A skeletal revision of *Nepenthes* (Nepenthaceae). Blumea 42: 1-106
- Jeffree CE (1986) The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In: Juniper BE, Southwood SR (Hrsg.) Insects and the plant surface. Edward Arnold, London, S. 23-63
- Jeffree CE, Baker EA, Holloway PJ (1976) Origins of the fine structure of plant epicuticular waxes. In: Dickinson CH, Preece TF (Hrsg.) Microbiology of aerial plant surfaces. Academic Press, London, S. 199-158
- Jeffree CE, Johnson RPC, Jarvis PG (1971) Epicuticular wax in the stomatal antechamber of Sitka spruce and its effects on the diffusion of water vapor and carbon dioxide. Planta 98: 1-10
- Jetter R, Riederer M (1994) Epicuticular crystals of nonacosan-10-ol: In-vitro reconstitution and factors influencing crystal habits. Planta 195: 257-270
- Jetter R, Riederer M (1995) In vitro reconstitution of epicuticular wax crystals: formation of tubular aggregates by long-chain secondary alcohols. Bot. Acta 108: 111-120
- Jetter R, Schäffer S (2001) Chemical Composition of the *Prunus laurocerasus* Leaf Surface. Dynamic Changes of the Epicuticular Wax Film during Leaf Development. Plant Physiology 126: 1-13
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M (2000) Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. Plant, Cell and Environment 23: 619-628
- Juniper BE (1995) Waxes on plant surfaces and their interactions with insects. In: Hamilton RJ (Hrsg.) Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions. The Oily Press, Dundee, S. 157-174
- Juniper BE, Burras JK (1962) How pitcher plants trap insects. New Scientist 13: 75-77
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM (1989) The Carnivorous Plants. Academic Press, London.
-

- 
- Kerner von Marilaun A (1878) *Flowers and their unbidden guests*. Kegan Paul Co, London
- Klass DL, Jenson WN, Blair JS, Martinek TW (1963) Aldehyde Hemihydrates. *J. Org. Chem.* 28: 3029-3034
- Knapp DR (1979) *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Wiley, New York
- Knoll F (1914) Über die Ursache des Ausgleitens der Insektenbeine an wachsbedeckten Pflanzenteilen. *Jahrb. Wiss. Bot.* 54: 448-497
- Kopka I, Rathke MW (1981) Acylation of Ketone Silyl Enol Ethers with Acetyl Tetrafluoroborate. A Synthesis of 1,3-Diketones. *Journal of Organic Chemistry*: 46(19): 3771-3773
- Kováts E sz. (1965) Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System. *Adv. Chromatogr.* 1: 229-247
- Kunst L, Samuels AL (2003) Biosynthesis and secretion of plant cuticular waxes. *Progress in Lipid Research* 42: 51-80
- Kurata S (1976) *Nepenthes* of Mt. Kinabalu. Sabah National Park Trustees Kota Kinabalu, Sabah
- Lamberton JA (1965) The long-chain aldehydes of sugar-cane wax. *Aust. J. Chem.* 18: 911-913
- Lamberton JA, Redcliffe AH (1960) The chemistry of sugar-cane wax. *Aust. J. Chem.* 13: 261-268
- Le Roux JH (1969a) Fischer-Tropsch waxes. 1. An infra-red method for the determination of crystallinity. *J. Appl. Chem.* 19: 39-42
- Le Roux JH (1969b) Fischer-Tropsch waxes. 2. Crystallinity and physical properties. *J. Appl. Chem.* 19: 86-88
- Le Roux JH (1969c) Fischer-Tropsch waxes. 3. Indications of molecular order in molten wax. *J. Appl. Chem.* 19: 209-212
- Lide DR (Hrsg.) (1992) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 73. Ausg. CRC Press, Boca Raton
- Little JL (1999) Artifacts in Trimethylsilyl Derivatization Reactions and Ways to Avoid Them. *J. Chromatogr. A* 844: 1-22
- Lloyd FE (1942) *The carnivorous plants*. Chronica Botanica Co., Waltham, MA, USA
- Lösch R (1990) Kannenpflanzen: Insektenfressende Standortspezialisten und biogeographische Indikatoren. *Biologie in unserer Zeit* 20(1): 26-32
- Maccoll A, Mruzek MN (1986) Low-energy, Low-temperature Mass Spectra. Part 5 - Alkanals. *Organic Mass Spectrometry* 21: 251-258
- Mantsch HH, McElhaney RN (1991) Phospholipid phase transition in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 57: 213-226
-

- 
- Marga F, Pasacreta TC, Hasenstein KH (2001) Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsium horridulum*. *Planta* 213: 841-848
- Markstädter C (1994) Untersuchungen zur jahreszeitlichen Entwicklung der kutikulären Wachse von *Fagus sylvatica* L.. Dissertation Universität Kaiserslautern im Fachbereich Biologie, LB Physiologische Ökologie
- Markstädter C, Federle W, Jetter R, Riederer M, Hölldobler B (2000) Chemical composition of the slippery epicuticular wax blooms on *Macaranga* (Euphorbiaceae) ant-plants. *Chemoecology* 10: 33-40
- Marsen H (1961) Infrarotspektroskopische Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Kristallinität von Kohlenwasserstoff-Wachsen. *Fette Seifen Anstrichmittel* 63: 42-48
- Marsen H (1962) Infrarotspektroskopische Untersuchungen zur Temperatur-Abhängigkeit der Kristallinität von Esterwachsen. *Fette Seifen Anstrichmittel* 64: 41-44
- Martin JT (1964) Role of cuticle in the defense against plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2: 81-100
- Martin JT, Juniper BE (1970) *The Cuticles of plants*. Edward Arnold, London
- McDaniel CA, Howard RW (1985) Mass spectral determination of aldehydes, ketones, and carboxylic acids using 1,1-dimethylhydrazine. *J. Chem. Ecol.* 11: 303-310
- Mcfarlane JM (1893) Observations on pitcher insectivorous plants, part. II. *Annals of Botany* 7: 401-458
- McLafferty FW, Tureček F (1993) *Interpretation von Massenspektren*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Meimberg H, Wistuba A, Dittrich P, Heubl G (2001) Molecular Phylogenie of Nepenthaceae Based on Cladistic Analysis of Plastid trnK Intron Sequence Data. *Plant Biology* 3: 164-175
- Merbach MA, Merbach DJ, Maschwitz U, Booth WE, Fiala B, Zizka G (2002) Mass march of termites into the deadly trap. *Nature* 415: 36-37
- Mercure EW, Kunoh H, Nicholson RL (1994) Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 45: 407-420
- Merk S (1998) FTIR-spektroskopische Untersuchungen zum Phasenverhalten und zur Kristallinität pflanzlicher Wachse. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Merk S, Blume A, Riederer M (1998) Phase behaviour and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* 204: 44-53
- Meyerson S, Fenselau C, Young JL, Landis WR, Selke E, Leitch LC (1970) Reactions of aliphatic aldehydes under electron-impact. *Organic Mass Spectrometry* 3: 689-707
-

- 
- Mladenova K, Stoianova-Ivanova B, Anguelova Y (1980) Interrelationship between long-chain aldehydes and trialkyltrioxanes in plant waxes. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* LXII (3) maggio: 133-135
- Mladenova K, Stoianova-Ivanova B, Daskalov RM (1976) Trialkyltrioxanes in flower wax of some decorative roses. *Phytochemistry* 15: 419-420
- Mohl H (1847) Untersuchung der Frage: Bildet die Cellulose die Grundlage sämtlicher vegetabilischen Membranen? *Bot. Ztg.* 5: 497-505
- Nagahara H, Kagawa K, Hamanaka K, Yoshida K, Iwaisako T, Masamoto J (2000) Acetal Copolymer from the Copolymerisation of Trioxane and Ethylene Oxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39: 2275-2280
- Naß R, Markstädter C, Hauke V, Riederer M (1998) Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Plant Cuticular Waxes Containing Long-chain Aldehydes. *Phytochemical Analysis* 9: 112-118
- Nicholson RL, Kunoh H, Shiraishi T, Yamada T (1993) Initiation of the infection process by *Erysiphe graminis*: Conversion of the conidial surface from hydrophobicity to hydrophilicity and influence of the conidial exudate on the hydrophobicity of the barley leaf surface. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 43: 307-318
- Owen TP Jr, Lennon KA, Santo MJ, Anderson AN (1999) Pathways for nutrient transport in the pitcher of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Ann Bot* 84: 459-466
- Owen TP Jr., Lennon KA (1999) Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *American Journal of Botany* 86(10): 1382-1390
- Patel S, Nelson DR, Gibbs AG (2001) Chemical and physical analyses of wax ester properties. *Journal of Insect Science* 1.4.: 1-7
- Petracek PD, Bucovac MJ (1995) Rheological Properties of Enzymatically Isolated Tomato Fruit Cuticle. *Plant Physiol.* 109: 675-679
- Phillipou G (1977) Genesis of the trimethylsilyl cation in the electron-impact mass spectra of *t*-butyldimethylsilyl derivatives. *Org. Mass Spectrom.* 12: 261
- Pierce AE (1968) *Silylation of Organic Compounds*. Pierce, Rockford, IL.
- Podila GK, Rogers LM, Kolattukudy PE (1993) Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol.* 103: 267-272
- Poole CF, Zlatkis A (1979) Trialkylsilyl Ether Derivatives (Other Than TMS) for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 17: 115-123
- Pouchert CJ (1970) *The Aldrich Library of infrared spectra*. Aldrich Chemical Company INC.
- Ramirez FJ, Luque P, Heredia A, Bukovac MJ (1992) Fourier transform IR study of enzymatically isolated tomato fruit cuticular membrane. *Biopolymers* 32: 1425-1429
-



- 
- Rasmussen JK (1977) *O*-Silylated Enolates - Versatile Intermediates for Organic Synthesis. *Synthesis-Stuttgart* 2: 91-110
- Reynhardt EC (1997) The role of hydrogen bonding in the cuticular wax of *Hordeum vulgare* L. *Eur Biophys J* 26: 195-201
- Reynhardt EC, Riederer M (1991) Structure and molecular dynamics of the cuticular wax from leaves of *Citrus aurantium* L. *J. Phys. D* 24: 478-486
- Reynhardt EC, Riederer M (1994) Structures and molecular dynamics of plant waxes. II. Cuticular waxes from leaves of *Fagus sylvatica* L. and *Hordeum vulgare* L. *Eur Biophys J* 23: 59-70
- Richter F (Hrsg.) (1958) *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*. Springer, Berlin
- Riederer M (1991) Die Kutikula als Barriere zwischen terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre. Die Bedeutung der Wachsstruktur für die Permeabilität der Kutikula. *Naturwissenschaften* 78: 201-208
- Riederer M, Markstädter C (1996) Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. In: Kerstiens G (Hrsg.) *Plant Cuticles*. BIOS Scientific Publishers, Oxford. S. 189-200
- Riederer M, Schönherr J (1986) Thermodynamic analysis of nonelectrolyte sorption in plant cuticles: The effects of concentration and temperature on sorption of 4-nitrophenol. *Planta* 169: 69-80
- Riederer M, Schreiber L (1995) Waxes - the transport barriers of plant cuticles. In: Hamilton RJ (Hrsg.) *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. The Oily Press, Dundee, S. 130-156
- Safar M, Bertrand D, Robert P, Devaux MF, Genot C (1994) Characterization of Edible Oils, Butters and Margarines by Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance. *JAOCs* 71(4): 371-377
- Scherge M, Gorb SN (2001) *Biological micro- and nanotribology*. Springer, Berlin
- Schmidt P (2000) *Zusammensetzung und Funktion kutikulärer Lipide in Nepenthes-Kannen*. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Schönherr J, Riederer M (1989) Foliar penetration and accumulation of organic chemicals in plant cuticles. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 108: 1-70
- Schreiber L, Schönherr J (1992) Analysis of foliar uptake of pesticides in barley leaves: Role of epicuticular waxes and compartmentation. *Sci.* 36: 213-221
- Schreiber L, Schorn K, Heimburg T (1997) <sup>2</sup>H NMR study of cuticular wax isolated from *Hordeum vulgare* L. leaves: identification of amorphous and crystalline wax phases. *Eur Biophys J* 26: 371-380
-

- 
- Schulze W, Schulze ED, Pate JS, Gillison AN (1997) The nitrogen supply from soils and insects during growth of the pitcher plants *Nepenthes mirabilis*, *Cephalotus follicularis* and *Darlingtonia californica*. *Oecologia* 112: 464-471
- Schwab M, Noga G, Barthlott W (1995) The significance of epicuticular waxes for defense of pathogens as shown for *Botrytis cinerea* infection in Kohlrabi and pea plants. *Gartenbauwissensch* 60: 102-109
- Seibl J (1970) *Massenspektrometrie*. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt
- Srivastava PK, Rai DK, Rai SB (2001) Overtone spectroscopy of some benzaldehyde derivatives. *Pramana - Journal of Physics* 56(6): 823-830
- Staudinger H (1920) Über Polymerisation. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 53A: 1073-1085
- Staudinger H (1936) The formation of high polymers of unsaturated substances. *Trans Faraday Soc* 32: 97-121
- Stoner KA (1990) Glossy leaf wax and plant-resistance to insects in *Brassica oleracea* under natural infestation. *Environ Entomol* 19: 730-739
- Stork NE (1980a) Experimental analysis of adhesion of *Chrysolina polita* (Chrysomelidae: Coleoptera) on a variety of surfaces. *J. Exp. Biol.* 88: 91-107
- Stork NE (1980b) Role of wax blooms in preventing attachment to brassicas by the mustard beetle, *Phaedon cochleariae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 28: 100-107
- Tirpak RE, Rathke MW (1982) Acylation of Ketone Silyl Enol Ethers with Acid Chlorides. Synthesis of 1,3-Diketones. *Journal of Organic Chemistry* 47: 5009-5102
- Vogh JW (1971) Isolation and analysis of carbonyl compounds as oximes. *Anal. Chem.* 43: 1618-1623
- Vogl O (2000a) Addition Polymers of Aldehydes. *Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry* 38: 2293-2299
- Vogl O (2000b) Haloacetaldehyde Polymers and Macromolecular Asymmetry. *Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry* 38: 2623-2634
- Vötsch W, Nicholson G, Müller R, Stierhof Y-D, Gorb S, Schwarz U (2002) Chemical composition of the attachment pad secretion of the locust *Locusta migratoria*. *Insect Biochem Molec Biol* 32: 1605-1613
- Walker JF (1964) *Formaldehyde*. 3. Ausg. Reinhold, New York
- Walton TJ (1990) Waxes, cutin and suberin. In: Harwood JL, Boyer J (Hrsg.) *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 4. Academic Press, London, S. 106-158
- Wiedermann P, Neinhuis C (1998) Biomechanics of isolated plant cuticles. *Bot Acta* 111: 28-34
-

Wilkinson RE, Roberts JJ (1996) Wheat leaf epicuticular characteristics as rust inhibitors. *J. Environ. Sci. Health B Pestic.* 31: 591-598

Zerbi G, Gallino G, Del Fanti N, Bains L (1989) Structural depth profiling in polyethylene films by multiple internal reflection infra-red spectroscopy. *Polymer* 30: 2324-2327

---

**Abkürzungen**

---

amu	atomic mass unit (Atomare Masseneinheit)
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (attenuated total reflectance)
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
F' <sub>1</sub> , F' <sub>2</sub> , F' <sub>3</sub>	Fragmente der Aldehyd-Seite in Massenspektren von Alkenyl-Alkyl-Ethern
F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub>	Fragmente der Alkohol-Seite in Massenspektren von Alkenyl-Alkyl-Ethern
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot (-Spektroskopie)
GC	Gaschromatographie
IR	Infrarot
m/z	Masse-Ladungsverhältnis von Ionen
M <sup>+</sup>	Molekülion
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MTBSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N-tert.</i> -butyldimethylsilyltrifluoracetamid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
<i>t</i> -BDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoracetamid
TMS	Trimethylsilyl
ZnSe	Zinkselenid
δ <sub>rock</sub> (CH <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub> -Wiegeschwingung
δ <sub>sciss</sub> (CH <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub> -Scherschwingung
ν(C=O)	Carbonyl-Streckschwingung
ν(C-H)+2δ(CHO)	Resonanzschwingung der Carbonyl-C-H-Streck- mit dem 1. Oberton der H-C=O-Deformationsschwingung (Fermi-Resonanz)
ν <sub>as</sub> (CH <sub>2</sub> )	asymmetrische CH <sub>2</sub> -Streckschwingung
ν <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> )	symmetrische CH <sub>2</sub> -Streckschwingung

---

---

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Jetter für die Vergabe des sehr interessanten Themas und für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während der gesamten Bearbeitung. Ich danke ihm insbesondere für die stets konstruktive Kritik und lehrreichen Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. Markus Riederer bedanke ich mich sehr für die hervorragende instrumentelle Ausstattung sowie für das freie und kollegiale Arbeitsklima an seinem Lehrstuhl.

Bei Frau Anna Eichner möchte ich mich ganz herzlich für die jahrelange Zusammenarbeit und ihren tatkräftigen Einsatz für das gesamte Projekt bedanken.

Herrn PD Dr. Walter Federle und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfe beim Bau von Kraftmessern und für fruchtbare Diskussionen. Herrn PD Dr. Werner Baumgartner (Institut für Anatomie II) danke ich für die Arbeiten am Atomkraftmikroskop.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Botanik II für ihre stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Frau Bianka Pink für die unermüdliche Hilfe bei allen technischen und organisatorischen Fragen des Laboralltages, Frau Wilma Kreßmann für das mühevollen Scannen zahlloser REM-Bilder, Frau Stefanie Schäffer für die Einführung in die Präparationstechniken und IR-Spektroskopie sowie bei Frau Corina Vermeer für das zur Verfügungstellen von Standards und ihrer Kaffeemaschine.

Den Mitarbeiter des Botanischen Gartens der Universität Würzburg, insbesondere Herrn Greiner und Herrn Thiele, danke ich für die Kultivierung und das ‚Füttern‘ der Versuchspflanzen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für Elektronenmikroskopie der Universität Würzburg danke ich für die Einführung in die Rasterelektronenmikroskopie und ihre große Hilfsbereitschaft.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Teilprojektes A4 des Sonderforschungsbereiches 567 „Mechanismen der interspezifischen Interaktion von Organismen“ durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Mein liebevollster Dank gilt meiner Freundin Karin für ihre endlose Unterstützung und Geduld. In gleicher Weise danke ich auch meinen Eltern, die alles ermöglichten.

---

**Publikationsliste**

Riedel M, Eichner A, Jetter R (2003) Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* 218: 87-97

**Beiträge zu Tagungsbänden**

Riedel M, Eichner A, Jetter R (2002) Selective sampling and analysis of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* pitchers. Short lecture, 19<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Hamburg.

Riedel M, Eichner A, Jetter R (2002) Selective sampling and analysis of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* pitchers. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Vereinigung für Angewandte Botanik, Freiburg i. Br.

---

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Jörg Michael Riedel  
Geburtsdatum: 18.05.1972  
Geburtsort: Freiburg i. Br.  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

1979 - 1983 Adolf-Reichwein-Grundschule Freiburg i. Br.  
1983 - 1992 Staudinger-Gesamtschule Freiburg i. Br.  
Abschluss: Abitur  
1992 - 1993 Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz (Rettungsdienst)  
1993 - 2000 Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.  
Hauptfach: Zoologie (Ökologie/Evolutionsbiologie/Morphologie)  
Nebenfächer: Zoologie (Tierphysiologie/Verhaltensbiologie)  
Mikrobiologie  
Bodenkunde  
Diplomarbeitsthema: „Chemische Analyse der kutikularen Kohlenwasserstoffe und des Tergaldrüsensekrets und die Auslösung des männlichen Kopulationsverhaltens bei *Aleochara bilineata* Gyll. (Coleoptera, Staphylinidae)“  
seit 16.01.2001 Promotionsstudium im Fach Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl für Botanik II

---

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den .....

---