

**Instrumentell-analytische Techniken zur  
Charakterisierung von Naturstoffen aus  
Rucola (*Eruca sativa* Mill.) und  
Rohkaffee (*Coffea arabica*)**

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

vorgelegt von  
**Bernhard Weckerle**  
aus  
**Augsburg**

**Würzburg 2001**

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....  
2. Gutachter: .....  
der Dissertation

1. Prüfer: .....  
2. Prüfer: .....  
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: .....  
Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

*Der Mensch hat dreierlei Wege, klug zu handeln:  
Erstens durch Nachdenken, das ist der edelste,  
Zweitens durch Nachahmen, das ist der leichteste und  
Drittens durch Erfahrung, das ist der bitterste.*

Konfuzius, chinesischer Philosoph (551-479 v. Chr.)



## Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand von August 1999 bis Oktober 2001 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. P. Schreier, für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und seine rege Anteilnahme an meinen Projekten sowie seinem mir entgegengebrachten Vertrauen und die mir bei meinen Arbeiten gewährten Freiräume.

Für die engagierte Unterstützung bei der Entwicklung und Durchführung der Arbeiten mittels CD-Spektroskopie bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. H.-U. Humpf (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg). Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Tóth (Institut für Organische und Analytische Chemie, Universität Budapest, Ungarn), der mir bei der Aufnahme der NMR-Spektren sowie bei deren Interpretation mit seinen Anregungen und Hinweisen hilfreich zur Seite stand. Herrn Dr. K. Baumann (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) möchte ich danken für die Unterstützung bei Fragen der statistischen Datenauswertung, Frau Dr. Lange (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) für die Durchführung der Messungen hochaufgelöster Massenspektren.

Für die motivierte Mitarbeit an unterschiedlichen Teilprojekten im Rahmen von Fortgeschrittenen-Praktika danke ich Frau B. Kindermann, Frau K. Schäfer, Frau D. Kemmer, Frau K. Michel, und Herrn S. Lunkenbein.

Herrn Prof. Dr. O. Vitzthum (Bremen) sei gedankt für die Anregungen zu den Arbeiten an glykosidisch gebundenen Aromastoffvorläufern in Rohkaffee. Dank gilt auch der Firma Illycaffee s.p.a. (Trieste, Italia) für die finanzielle Unterstützung von Teilbereichen dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Großmutter sowie besonders auch bei Sabine für ihre vielfältige Unterstützung im Verlaufe meines Studiums sowie meiner Promotionsarbeit herzlich danken.



**Inhalt****Verzeichnis der Abkürzungen** \_\_\_\_\_ **XIII**

<b>A</b>	<b><i>Einleitung und Fragestellungen</i></b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Untersuchungen an Rucola</b>	<b>5</b>
1.1	Rucola: Mitglied der Pflanzenfamilie <i>Brassicaceae</i>	5
<b>1.2</b>	<b>Analytik von schwefelhaltigen Aromastoffen in Rucolablättern</b>	<b>7</b>
1.2.1.	Übersicht: Schwefelverbindungen als Aromastoffe	7
1.2.2	Instrumentell-analytische Grundlagen	11
1.2.2.1	Selektive Detektion flüchtiger schwefelhaltiger Verbindungen	11
1.2.2.2	Analytik chiraler schwefelhaltiger Verbindungen	14
1.2.3	Schwefelhaltige Aromastoffe in Rucola – Ergebnisse der Analytik mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Schwefelchemilumineszenzdetektion (HRGC-MS/SCD)	20
1.2.4	Analytik von 3-Sulfanyl-1-hexanol	25
1.2.4.1	Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration von 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanolen mittels ECCD (Modellstudie)	25
1.2.4.1.1	Strategie und Synthese enantiomerenreiner Referenzen	25
1.2.4.1.2	Auswahl eines Chromophors und dessen Umsetzung mit den enantiomerenreinen Verbindungen (Ein-Schritt-Derivatisierung)	27
1.2.4.1.3	Ergebnisse der CD-Spektroskopie	29
1.2.4.2	Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 3-Sulfanyl-1-hexanol mittels Multidimensionaler Gaschromatographie–Massenspektrometrie (MDGC-MS)	35
1.2.5	Isolierung und Identifizierung der unbekanntem schwefelhaltigen Aromakomponente <b>S24</b> aus Rucolablättern	36
1.2.5.1	Analytik der unbekanntem Verbindung <b>S24</b> mittels „on-column“-Injektion	36
1.2.5.2	Isolierung der unbekanntem Verbindung <b>S24</b>	37
1.2.5.3	Strukturaufklärung der unbekanntem Verbindung <b>S24</b>	38
<b>1.3</b>	<b>Analytik von glykosidisch gebundenen Flavonoiden</b>	<b>40</b>
1.3.1	Allgemeines zu (glykosidisch gebundenen) Flavonoiden	40
1.3.2	Instrumentell-analytische Grundlagen	44
1.3.3	Isolierung und Charakterisierung glykosidisch gebundener Flavonoide aus Rucola	48
1.3.3.1	Herstellung eines Rohextraktes	48

1.3.3.2	Analytik des Rohextraktes mittels Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photo-Diodenarray Detektion (HPLC-DAD)	48
1.3.3.3	Fraktionierung und Reinigung mittels „reversed phase“- Chromatographie	50
1.3.3.4	Bestimmung des Zuckeranteils mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)	51
1.3.3.5	Charakterisierung der Glykoside mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) und Infrarotspektroskopie	51
1.3.3.6	Charakterisierung der intakten Glykoside mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR)	55
<b>2</b>	<b>Untersuchungen an Rohkaffee</b>	<b>60</b>
<b>2.1</b>	<b>Die Kaffeepflanze</b>	<b>60</b>
<b>2.2</b>	<b>Analytik von gebundenen Aromastoffen</b>	<b>62</b>
2.2.1	An Zuckereinheiten gebundene Aromastoffe	62
2.2.2	Instrumentell-analytische Grundlagen	62
2.2.3	Isolierung von Zucker-gebundenen Aromavorstufen aus Rohkaffee	68
2.2.3.1	Aglykon-Analytik mittels Simultaner Destillation-Extraktion (SDE)	68
2.2.3.2	Herstellung eines Rohextraktes	70
2.2.3.3	Enzymatische Hydrolyse	71
2.2.3.4	Vorfraktionierung des Rohextraktes mittels „Countercurrent Chromatographie“ (MLCCC) und diskontinuierlicher Kieselgel-Säulenchromatographie (LC-RP18)	73
2.2.3.5	Entwicklung geeigneter Bedingungen zur Analyse von Aromastoffprekursoren mittels (HPLC-) Tandemmassenspektrometrie anhand von synthetisiertem Linalyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	77
2.2.4	Isolierung und Identifizierung von zwei glykosidisch gebundenen Linalool-Prekursoren	80
2.2.4.1	Fraktionierung und Reinigung mittels „reversed phase“-Chromatographie	80
2.2.4.2	Enantiomerenanalytik von glykosidisch gebundenem Linalool mittels Multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS)	82
2.2.4.3	Charakterisierung der intakten Glykoside mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)	83
2.2.4.4	Charakterisierung der intakten Glykoside mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR)	86
2.2.5	Isolierung und Identifizierung von Prekursoren von 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure	92
2.2.5.1	Fraktionierung und Reinigung mittels „reversed-phase“-Chromatographie	92
2.2.5.2	Charakterisierung der intakten Ester mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)	95
2.2.5.3	Charakterisierung der intakten Ester mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR)	98



<b>2.3</b>	<b>Untersuchungen zur Herkunft von Rohkaffee mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) von Coffein</b>	<b>104</b>
2.3.1	Herkunftsanalytik mittels Isotopenverhältnisbestimmung	104
2.3.2	Instrumentell-analytische Grundlagen	113
2.3.3	Biosynthese von Coffein	116
2.3.4	Herkunftsanalytik von Rohkaffee	120
2.3.5	Coffein aus Rohkaffee	121
2.3.5.1	Isolierung und Kontrolle potentieller Isotopendiskriminierung	121
2.3.5.2	Ergebnisse von $\delta^{13}\text{C}$ -Messungen	122
2.3.5.3	Ergebnisse von $\delta^2\text{H}$ -Messungen	124
2.3.5.4	Ergebnisse von $\delta^{18}\text{O}$ -Messungen	127
2.3.5.5	Statistische Auswertung der Ergebnisse der Isotopenverhältnismessungen zur Authentizitätsbeurteilung	129
<b>C</b>	<b><i>Experimentalteil</i></b>	<b>135</b>
<b>1</b>	<b>Material</b>	<b>135</b>
<b>1.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>135</b>
<b>1.2</b>	<b>Untersuchungsmaterial</b>	<b>136</b>
1.2.1	Rucola	136
1.2.2	Rohkaffee	136
<b>1.3</b>	<b>Enzympräparate</b>	<b>138</b>
<b>1.4</b>	<b>Pufferlösungen</b>	<b>138</b>
<b>1.5</b>	<b>Adsorptionsmaterial</b>	<b>138</b>
<b>1.6</b>	<b>Dünnschichtchromatographie</b>	<b>139</b>
<b>1.7</b>	<b>Gase</b>	<b>139</b>
<b>2</b>	<b>Geräte</b>	<b>140</b>
<b>2.1</b>	<b>Kapillargaschromatographie (HRGC)</b>	<b>140</b>
2.1.1	HRGC mit Massenspektrometrischer Detektion	140
2.1.2	HRGC mit paralleler Detektion durch Massenspektrometrie und Chemilumineszenzdetektion (HRGC-MS/SCD)	141
2.1.3	Multidimensionale Gaschromatographie – Massenspektrometrie (MDGC-MS)	141
<b>2.2</b>	<b>Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)</b>	<b>142</b>
2.2.1	HPLC mit paralleler Detektion durch Ultraviolett-Detektor und Electric Light Scattering Detektor (HPLC-UV/ELSD)	142
2.2.2	HPLC mit Photo-Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD)	143
2.2.3	Präparative HPLC (HPLC präp.)	144
2.2.4	HPLC mit ESI-Interface und Detektion durch Tandemmassenspektrometer (HPLC-ESI-MS/MS)	145

<b>2.3</b>	<b>Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)</b>	<b>146</b>
<b>2.4</b>	<b>Hochauflösende Massenspektrometrie</b>	<b>147</b>
<b>2.5</b>	<b>Multi-Layer Coil Countercurrent Chromatographie (MLCCC)</b>	<b>148</b>
<b>2.6</b>	<b>Kernresonanzspektroskopie (NMR)</b>	<b>148</b>
<b>2.7</b>	<b>Circulardichroismus (CD)</b>	<b>148</b>
<b>2.8</b>	<b>3D-Computerberechnungen</b>	<b>149</b>
<b>2.9</b>	<b>Statistische Berechnungen</b>	<b>149</b>
<b>2.10</b>	<b>Sonstige Geräte</b>	<b>149</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>150</b>
<b>3.1</b>	<b>Methoden zur Untersuchung von Rucola</b>	<b>150</b>
3.1.1	Untersuchungen über schwefelhaltige Aromastoffe in Rucolablättern	150
3.1.1.1	Herstellung von Aromaextrakten aus Rucolablättern	150
3.1.1.2	Darstellung der enantiomerenreinen 2- und 3-Sulfanyl-1-hexanole	151
3.1.1.3	Darstellung der aktivierten Chromophoren	154
3.1.1.4	Darstellung der bichromophoren Derivate	154
3.1.1.5	Isolierung von <b>S24</b> aus dem Aromaextrakt von Rucolablättern	157
3.1.1.6	Synthese von [1,3]-Thiazinan-2-thion	158
3.1.2	Untersuchungen über glykosidisch gebundene Flavonoide in Rucolablättern	159
3.1.2.1	Herstellung eines Rohextraktes	159
3.1.2.2	Reinigung des Rohextraktes an RP-18 Material	159
3.1.2.3	Umsetzung der isolierten Verbindungen <b>Ruc1</b> , <b>Ruc2</b> und <b>Ruc3</b> zur Identifizierung des Zuckeranteils mittels HRGC-MS	160
3.1.2.4	Elementaranalyse der drei glykosilierten Flavonoide <b>Ruc1</b> , <b>Ruc2</b> und <b>Ruc3</b>	161
<b>3.2</b>	<b>Methoden zur Untersuchung von Rohkaffee</b>	<b>161</b>
3.2.1	Gebundene Aromastoffe in Rohkaffee	161
3.2.1.1	Zweistufige Simultane Destillation-Extraktion (SDE)	161
3.2.1.2	Herstellung eines Glykosidrohextraktes	162
3.2.1.3	Enzymatische Umsetzungen zur Freisetzung von Aromastoffen	163
3.2.1.4	Präparative Multilayer Coil Countercurrent Chromatographie (MLCCC)	163
3.2.1.5	Präparative diskontinuierliche Fraktionierung an Kieselgel	164
3.2.1.6	Darstellung von Linalool- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid	165
3.2.1.7	Präparative Reinigungsschritte mittels reversed phase Chromatographie	166
3.2.1.7.1	Gemeinsamer Reinigungsschritt für alle gesuchten Prekursoren	166
3.2.1.7.2	Reinigung der Linalool-Prekursoren	166
3.2.1.7.3	Reinigung der Prekursoren von 3-Methylbutansäure	168
3.2.1.7.4	Reinigung des Prekursors von 3-Methyl-2-butensäure	169
3.2.1.7.5	Elementaranalyse der Aromastoff-Prekursoren <b>AK1</b> , <b>AK2</b> , <b>AK3</b> , <b>AK4</b> und <b>AK5</b>	170
3.2.2	Untersuchungen zur Herkunftsanalytik von Rohkaffee	170
3.2.2.1	Isolierung von Coffein aus Rohkaffee	170
3.2.2.2	Kontrolle potentieller Isotopendiskriminierung	170

Inhalt		XI
3.2.2.3	Reinheitskontrolle des isolierten Coffeins und Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff	171
<b>D</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>173</b>
<b>E</b>	<b>Summary</b>	<b>179</b>
<b>F</b>	<b>Literatur</b>	<b>185</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>213</b>
1	Veröffentlichungen	213
2	Posterbeiträge	215
3	Vorträge	216
	<b>Lebenslauf</b>	<b>217</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>219</b>



---

**Verzeichnis der Abkürzungen**

A	Ampere
<i>A</i>	Amplitude von Split-CD Kurven
AED	Atom-Emissions Detektor
analyt.	analytische(r)
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
API	atmospheric pressure ionization
bzw.	beziehungsweise
CART	Classification and Regression Trees
CCC	Countercurrent Chromatographie
CD	Circulardichroismus
CE	Cotton Effect
CN	Reversed phase mit Nitrilgruppen
COSY	Correlated spectroscopy NMR
DAD	Photo-Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DIOL	Reversed phase mit Diolgruppen
$d_f$	Filmdicke bei HRGC-Kapillarsäulen
EA	Elementar Analysator
ECCD	exciton-coupled circular dichroism
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELSD	Electric Light Scattering Detector
ESI	Elektrospray-Ionisation
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Fließmittel (HPLC, DC)
FPD	Flammen-Photometrischer Detektor
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLCpräp	Hochleistungsflüssigchromatographie im präparativen Maßstab

---

HRGC-MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie
Hz	Hertz
I.D.	Innendurchmesser
IRMS	Isotopenverhältnismassenspektrometrie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
l	Liter
LC-RP18	Präparative Säulenchromatographie mit RP18 Material unter Normaldruck
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
MDGC	Multidimensionale Gaschromatographie
min	Minute
M	Molekülion / Molekülionenpeak
MCSS	Moving Column Switching System (elektr. Vorrichtung der MDGC)
MLCCC	Multilayer Coil Countercurrent Chromatography
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
NH <sub>4</sub> OAc	Ammoniumacetat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Pa	Pascal
PP	Phosphatpuffer
ppm	chemische Verschiebung in Hertz
präp.	präparativ(er)
RHP	Rohapect®
RI	Brechungsindex
R <sub>i</sub>	linearer Retentionsindex (Kovats-Index)
RIC	reconstructed ion chromatogram
RP	Reversed phase
RP-8	Reversed phase mit C <sub>8</sub> -Alkylresten
RP-18	Reversed phase mit C <sub>18</sub> -Alkylresten
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
Sdp	Siedepunkt
SCD	Schwefel-Chemilumineszenz Detektor
SDE	Simultane Destillation Extraktion
sog.	sogenannte(s,r)
t	Zeit (bzw. Zeitpunkt bei Lösungsmittel- oder Temperaturgradienten)
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor

---

TIC	Total Ion Chromatogram
TOCSY	Total correlation spectroscopy
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent
W	Watt





## A Einleitung und Fragestellungen

„Lebensmittel im Sinne dieses Gesetzes sind Stoffe, die dazu bestimmt sind, in unverändertem, zubereitetem oder verarbeitetem Zustand von Menschen verzehrt zu werden; ausgenommen sind Stoffe, die überwiegend dazu bestimmt sind, zu anderen Zwecken als zur Ernährung oder zum Genuss verzehrt zu werden“ (§1, Abs. 1, LMBG). Der Definition des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes gemäß dienen Lebensmittel also in erster Linie der Ernährung und dem Genuss. Um sie hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe entsprechend beurteilen zu können, werden instrumentelle Techniken der modernen Lebensmittel- bzw. Naturstoffanalytik zur Isolierung, Trennung und Strukturaufklärung sowie letztlich auch zur biologischen Bewertung eingesetzt (Schreier *et al.*, 1998).

Stofflich bezieht sich die Zweckbestimmung „zum Genuss“ auf chemische Verbindungen, die für Geruch und Geschmack verantwortlich sind, d.h. Sinneseindrücke, die zusammen mit Tast-, Textur- und Temperaturempfindungen den sog. „Flavour“ beim Verzehr von Lebensmitteln ausmachen. Unter Aromastoffen versteht man im Übrigen nur die flüchtigen Anteile (Aroma), die von den Geruchsrezeptoren entweder direkt durch die Nase oder über den Rachenraum beim Essen und Trinken wahrgenommen werden (Ohloff, 1990). Aromastoffe finden sich praktisch in allen chemischen Stoffklassen; sie liegen in Lebensmitteln in Konzentrationsbereichen vor, die von einigen Milligramm (pro Kilogramm bzw. Liter) bis Sub-Nanogramm (pro Kilo bzw. Liter) reichen. Etwa 7000 Aromastoffe kennt man heute (Nijssen *et al.*, 1999), wobei aber nur rund 1000 von industriellem Interesse sind (VO EG Nr. 2232-96 des europäischen Parlaments und des Rates vom 28.10.1996).

Aufgrund der seit etwa 30 Jahren laufenden Arbeiten auf dem Gebiet der Aromaforschung (Teranishi *et al.*, 1999) weiß man heute, dass das Vorkommen geringster Anteile eines Aromastoffes oft mit hoher sensorischer Wirkung verknüpft ist (Maarse und Van der Heij, 1994; Leland *et al.*, 2001). Zu den Spurenkomponenten, bei denen sich gehäuft attraktive Geruchsqualitäten mit intensiven Geruchseindrücken finden, gehören insbesondere Schwefelverbindungen (Engel, 1999). So überrascht es nicht, dass eine der aktuellen Forschungsstrategien auf dem Gebiet der Aromastoffe auf die weitere Suche nach unbekanntem schwefelhaltigen chemischen Verbindungen in Lebensmitteln ausgerichtet ist (Mussinan und Keelan, 1994).

Eine weitere, in den letzten Jahren insbesondere auch in unserer Gruppe forcierte Arbeitsrichtung betrifft die Erforschung sog. „gebundener“ Aromastoffe. Seit den Pionierarbeiten insbe-

sondere von Williams in Australien (Williams *et al.*, 1982; Strauss *et al.*, 1984) ist bekannt, dass Aromastoffe in pflanzlichen Geweben nicht nur frei, sondern auch – und dies meist in beachtlichen Mengen – an Kohlenhydrate gebunden vorkommen. Diese Konjugate sind selbst geruchlos, stellen aber insofern wertvolle Aromastoffvorläufer dar als aus ihnen hydrolytisch – säure- oder enzymkatalysiert – Aromastoffe freigesetzt werden können (Schreier, 1997). Der auf diesem Gebiet erarbeitete Kenntnisstand (Winterhalter *et al.*, 1999) umfasst eine Vielzahl von Pflanzenfamilien. Trotz dieser umfangreichen Information, die sich meist auf glykosidisch gebundene und nur sporadisch auf Zuckerester bezieht (Winterhalter *et al.*, 1997a; Bonnländer *et al.*, 1998), bestehen überraschenderweise noch Lücken, wie z.B. hinsichtlich Kaffee.

Als eine dritte, eng mit der Aromastoffforschung in Zusammenhang stehende, aktuelle Arbeitsrichtung ist die Bearbeitung von Fragen der sog. „Authentizität“ zu sehen. Je nach Fragestellung kann dieser Begriff umfassen: (i) geographische Herkunft, (ii) genotypische Herkunft und (iii) Bezeichnung der Quelle einer Substanz (z.B. Biogenese oder chemische Synthese). Im Aromenbereich spielt die letztgenannte Bedeutung eine wesentliche Rolle, bestehen doch beachtliche Preisunterschiede zwischen chemisch-synthetisch (d.h. „naturidentischen“) und natürlich oder enzymkatalysiert gewonnenen (d.h. „natürlichen“) Aromastoffen; die Relationen schwanken von 1:10 bis 1:1000 (Berger, 1995; Krings und Berger, 1998). Aber auch in anderen Lebensmittelbereichen sind derzeit verstärkt Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Authentizitätskontrolle festzustellen. Als einschlägiges Beispiel mag hier der infolge der BSE-Krise bedeutsam gewordene Nachweis der Herkunft von Rindfleisch dienen (Ashurst und Dennis, 1996; Dennis, 1998; Suhaj und Kovac, 2000).

Für den oben genannten Bereich der Ernährung standen analytisch über Jahre klassische Analysen von Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Mineralstoffen und Vitaminen sowie deren Veränderungen bei Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln im Vordergrund des Interesses der Lebensmittelchemie. Diese Arbeitsrichtung ist, beeinflusst durch industrielle Entwicklungen in den USA und Japan, seit einiger Zeit durch das Gebiet der sog. „Bioaktivität“ ergänzt worden (Goldberg, 1994; Walker, 2000).

Die in Lebensmitteln enthaltenen Stoffe mit gesundheitsfördernder Wirkung werden als bioaktive Substanzen bezeichnet, wobei der Begriff „Bioaktivität“ im engeren Sinne eine präventive Wirkung in Bezug auf Krankheiten (z.B. antikanzerogen, antithrombotisch, immunmodulatorisch) und den Schutz vor Umweltgiften (z.B. antimikrobiell, antioxidativ) umfasst (Walker, 2000). Hierzu zählen die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe wie Carotinoide, Phytosterole,

Saponine, Glucosinolate, Flavonoide, Phytoestrogene, Protease-Inhibitoren, Terpene und Sulfide; insgesamt handelt es sich dabei um 5000-10000 verschiedene Verbindungen. Mit einer gemischten Kost werden täglich etwa 1,5 g solcher Pflanzenstoffe aufgenommen (Leitzmann und Watzl, 1995).

In jüngster Zeit haben die in pflanzlichen Lebensmitteln weit verbreiteten Flavonoide besonderes Interesse erweckt. Bisher wurden über 4000 solcher Verbindungen in Pflanzen aus den verschiedensten Familien beschrieben. Flavonoide in freier und glykosidisch gebundener Form stellen heute den Ausgangspunkt für diverse wissenschaftliche Forschungsrichtungen dar (Harborne und Williams, 2000). Eine essentielle Grundlage für diese Untersuchungen stellt die Isolierung und Charakterisierung von (glykosidisch gebundenen) Flavonoiden aus den entsprechenden pflanzlichen Geweben dar.

Wirft man einen Blick auf die in diesem einleitenden Abschnitt kurz erläuterten lebensmittelchemischen Arbeitsrichtungen und fragt in diesem Zusammenhang nach den instrumentell-analytischen Voraussetzungen bzw. nach dem aktuellen Kenntnisstand in den genannten Gebieten, so lässt sich folgendes feststellen:

- Die zur Aromastoffanalytik erforderlichen Methoden sind etabliert. Der bislang erarbeitete, umfangreiche Kenntnisstand erfordert Fokussierung auf attraktive Komponenten des Spurenbereichs, wobei man sich einig ist, dass für schwefelhaltige Verbindungen noch Forschungsbedarf besteht (Mussinan und Keelan, 1994; Engel, 1999).
- Die Forschungsaktivität auf dem Gebiet gebundener Aromastoffe hat ihren Höhepunkt überschritten. Die insbesondere auch durch unsere Gruppe erarbeiteten Informationen (Schwab, 1989; Krammer *et al.*, 1991; Pabst *et al.*, 1991a; Wintoch *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1994; Winterhalter und Schreier, 1994) lassen nur wenig Raum für Neubearbeitungen; Lücken bestehen noch für Kaffee.
- Authentizitätsbestimmungen von Aromastoffen anhand von Enantiodifferenzierung - sie sind auf chirale Aromastoffe beschränkt – hat man etabliert und derzeit auf praktisch alle relevanten Komponenten ausgedehnt (Mosandl, 1998). Massenspektrometrische Erfassung der Diskriminierung stabiler Isotope ist dagegen lediglich hinsichtlich der Bestimmung des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von Naturstoffen gut eingeführt (Koziet *et al.*, 1992; Martin, 1995). Messungen von  $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnissen mittels Massenspektrometrie sind bezüglich Reinsubstanzen, d.h. via Elementaranalysator in

einigen Bereichen gängig (Schmidt *et al.*, 1999), die Erfassung von Messdaten im Rahmen gaschromatographisch-massenspektrometrischer Isotopenverhältnismessung (HRGC-IRMS) steht dagegen erst am Anfang (Ruff, 2001; Hör, 2001).

- Die umfangreiche Literatur zum Thema „Bioaktivität“ von Flavonoiden – als Beispiele seien die einschlägigen Übersichten von Harborne und Williams (2000), Czczot (2000), Cos *et al.* (2000) und Wang (2000) genannt – berücksichtigt nur sporadisch wichtige Beurteilungskriterien wie z.B. Bioverfügbarkeit oder Metabolismus. Nahezu vernachlässigt wird – sieht man von einigen Beispielen wie z.B. Tee ab (Tijburg *et al.*, 2000; Wiseman *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) – der analytische Aspekt des strukturspezifischen Nachweises wertgebender Einzelsubstanzen in natürlichen Matrices sowie nach deren Metabolisierung im tierischen bzw. humanen Stoffwechsel. Schließlich ist trotz der Vielzahl der bislang bekannten Verbindungen immer noch von einer hohen Dunkelziffer an unbekanntem Flavonoidstrukturen in den verschiedenen pflanzlichen Geweben auszugehen.

Auf der Grundlage dieser aktuellen Situation war es für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit folgerichtig, unsere analytischen Forschungsaktivitäten auszurichten auf die

- (a) Erfassung weiterer Schwefelverbindungen;
- (b) Erweiterung des Kenntnisstandes bei Flavonoiden;
- (c) Bearbeitung von Aromastoff-Zuckerkonjugaten in bislang nicht berücksichtigter Rohware;
- (d) Aktivierung von Authentizitätsbestimmungen maßgeblicher Lebensmittelhaltstoffe.

Für die Untersuchungen wurden einerseits Rucola (*Eruca sativa* Mill.), der aufgrund seines Glucosinolat- (McGregor *et al.*, 1983; Adhikari *et al.*, 1989) und Glykosid-Anteils (Rahman *et al.*, 1969) als attraktive Quelle zur Bearbeitung der Themengebiete (a) und (b) erschien, und andererseits Rohkaffee (*Coffea arabica*) ausgewählt, eine hinsichtlich des Vorkommens von gebundenen Aromastoffen [vgl. (c)] bisher vernachlässigte Rohware, deren Herkunftsbestimmung [vgl. (d)] aufgrund regional sehr unterschiedlicher Qualitäten von hohem wirtschaftlichen Interesse ist (Kaffee-Text, dt. Kaffeeverband, 2/90).

## **B Ergebnisse und Diskussion**

### **1 Untersuchungen an Rucola**

Auf der Grundlage der einleitend dargestellten Situation wählten wir für unsere Untersuchungen hinsichtlich der Erfassung weiterer Schwefelverbindungen und der Erweiterung des Kenntnisstandes bei Flavonoiden Rucola aus, der als Brassicaceae-Gewächs für beide Stoffklassen eine vielversprechende Rohware darstellte.

#### **1.1 Rucola: Mitglied der Pflanzenfamilie *Brassicaceae***

Die Pflanzenfamilie *Brassicaceae* besteht aus ca. 3500 Spezies, 350 Arten und wird unterteilt in 4-19 Zweige. Die bei uns im Handel befindlichen, als Rucola oder Rauke (engl. rocket) angebotenen Salatsorten werden im wesentlichen in Deutschland und Italien aus Samen von *Diplotaxis tenuifolia* und *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* Mill. (kurz *Eruca sativa* Mill.) gezüchtet. Abbildung 1 zeigt die Stellung dieser beiden Arten innerhalb der *Brassicaceae*-Gewächse an (Warwick und Black, 1993; Warwick, 1994).

Die beiden Rucola-Arten *Diplotaxis tenuifolia* und *Eruca sativa* Mill. lassen sich morphologisch gut unterscheiden. Während erstere 10-15 cm lange, schmale Blätter mit starker Zähnung aufweist, sind die Blätter von *Eruca sativa* Mill. kleiner (7-10 cm lang), auch die Zähnung ist wesentlich geringer ausgeprägt und eher rundlich. Die Arten *Diplotaxis* und *Eruca* des Sub-Zweiges *Brassicinae* bevorzugen mediterranes Klima (Mittelmeerländer, aber auch Asien), außerhalb dieses Gebietes wird vor allem *Eruca vesicaria* kultiviert. Dabei ist es vom Genus abhängig, ob die Pflanze ein-, zwei- oder mehrjährig angebaut wird (Vaughan, 1970; Gómez-Campo, 1994).

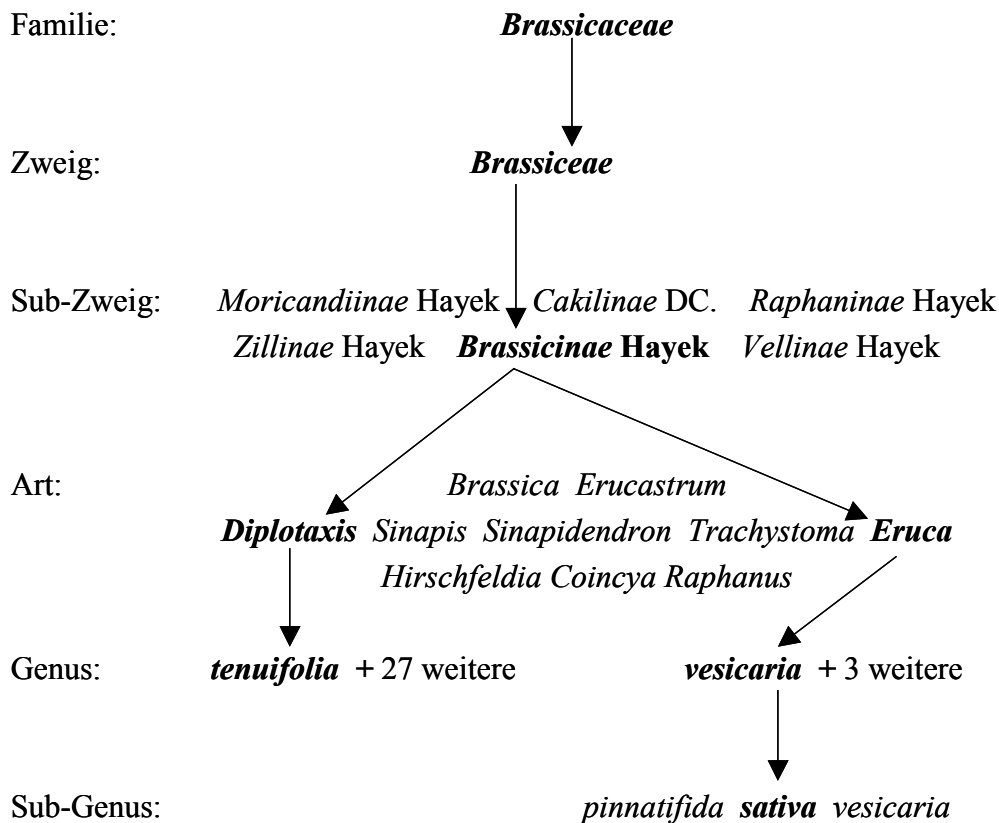


Abb. 1: Stellung von *Diplotaxis tenuifolia* und *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* Mill. innerhalb der *Brassicaceae* (nach Warwick, 1994).

Während die in Asien, Nordamerika, Iran, Afghanistan und Pakistan angebauten Pflanzen von *Eruca sativa* fast ausschließlich zur Erzeugung von Jambaöl und als Senf-Ersatz genutzt werden, erfreuen sich im mitteleuropäischen Raum die Blätter einer Nutzung als Salat oder würzige Beigabe zu gekochten Lebensmitteln (Bianco, 1994).

Am Rande sei vermerkt, dass die Verwendung von Rucolasamen als Aphrodisiacum beschrieben worden ist; der Anbau der Pflanze war zeitweise aus diesem Grund in Klöstern sogar verboten (Fernald, 1993). Von der angeblich aphrodisierenden Wirkung des Rucola wusste zudem bereits Vergil zu berichten: „et venerum revocans eruca morantem“ (Rucola weckt die sexuelle Begierde im Schläfrigen).

## 1.2 Analytik von schwefelhaltigen Aromastoffen in Rucolablättern

Vor der nachfolgenden Beschreibung der selektiven Analytik von Schwefelkomponenten in Rucola wird zunächst zum besseren Verständnis auf die Bedeutung von Schwefelverbindungen als wirksame Aromakomponenten eingegangen. Anschließend wird ein Einblick in themenrelevante analytische Grundlagen gegeben, d.h. die sensitive und selektive Erfassung schwefelhaltiger Verbindungen und die Analytik chiraler Schwefelkomponenten.

### 1.2.1. Übersicht: Schwefelverbindungen als Aromastoffe

Die meisten schwefelhaltigen Aromastoffe besitzen starke und häufig charakteristische sensorische Eigenschaften, die sowohl angenehm als auch unangenehm sein können. Vergleicht man strukturell verwandte Sauerstoff- und Schwefelverbindungen, wie z.B. Alkohole, Thiole, Wasser und Schwefelwasserstoff, so besitzen nur die schwefelhaltigen Substanzen einen charakteristischen Geruch, während die sauerstoffhaltigen Verbindungen nahezu geruchlos sind. Man geht davon aus, dass die Unterschiede auf die Beteiligung der d-Orbital-Elektronen an den chemischen Bindungen beim Schwefel zurückzuführen sind. Außerdem scheint die Intensität des Aromas vom Oxidationszustand des gebundenen Schwefelatoms abzuhängen. Je höher die Oxidationsstufe ist, desto schwächer wird der Geruchseindruck. Es gibt eine Vielzahl von Schwefelverbindungen, die ihren Beitrag zum Geruch eines Nahrungsmittels leisten, wie z.B. Thiole, Sulfide, Sulfoxide, Thiophene und Isothiocyanate (Shankaranarayana *et al.*, 1982; Fenwick *et al.*, 1983; Widder, 1998).

Nur etwa 10 % aller bekannten Aromastoffe sind schwefelhaltig und liegen in der Regel in deutlich niedrigeren Konzentrationen vor als die nicht schwefelhaltigen Aromastoffe. Trotzdem sind die schwefelhaltigen Aromakomponenten oft entscheidend am sensorischen Eindruck beteiligt, wobei sie meist für den Gesamtaromaeindruck verantwortlich sind, sich in wenigen Fällen aber auch durch eine charakteristische Note auszeichnen (Boelens und van Gemert, 1993). Zu diesen „character impact compounds“ gehören aus der Gruppe der schwefelhaltigen Verbindungen u.a. Methional (Brotkruste; Kirchoff und Schieberle, 2001), 1-para-Menthen-8-thiol (Grapefruit; Demole *et al.*, 1982), 2-Isobutylthiazol (Tomaten; Buttery *et al.*, 1987) und 2-Methyl-4-propyl-1,3-oxathian (Passionsfrucht; Winter *et al.*, 1976).

Schwefelhaltige Aromastoffe weisen im Allgemeinen wesentlich niedrigere Geruchsschwellenwerte auf als nicht schwefelhaltige. Die chemische Struktur beeinflusst dabei nachdrücklich die sensorische Aktivität. Beispielsweise besitzen tertiäre Thiole geringere Schwellenwerte (z.B. 2-Methyl-2-butanthiol, 0,07 ng/l) als sekundäre (z.B. 3-Methyl-2-butanthiol, 200 ng/l) und primäre (z.B. 2-Methyl-1-propanthiol, 2500 ng/l) (Boelens und van Gemert, 1993). Hinzu kommt, dass Einblicke in Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei schwefelhaltigen Verbindungen dadurch erschwert werden, dass die Geruchsqualität von der Konzentration abhängt. Diese olfaktometrische Abhängigkeit wird als „Multiplizität“ (Eigenschaft, in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedene Rezeptorbindungsstellen anzusprechen) bezeichnet.

Aufgrund der genannten Eigenschaften schwefelhaltiger Aromastoffe (geringe Geruchs- und Geschmacksschwellenwerte, Multiplizität) sind diese Verbindungen auch an der Bildung von Fehleraromen („off-flavor“) beteiligt. So können beispielsweise in Fleisch, in dem schwefelhaltige Verbindungen einen entscheidenden Beitrag zum Aroma liefern, hohe Konzentrationen an Sulfiden das Produkt nahezu ungenießbar machen (Bailey *et al.*, 1992). Eingehende Untersuchungen gibt es auch über Fehleraromen in Citrussäften (Shaw und Wilson, 1982) und Milch (Azzara und Campbell, 1992), die jeweils durch Schwefelverbindungen hervorgerufen werden.

Die Mechanismen der Bildung schwefelhaltiger Aromastoffe wurden eingehend in Lebensmitteln oder in Modellstudien untersucht (Tressl *et al.*, 1994). Als nichtflüchtige Vorläufer schwefelhaltiger Verbindungen in Lebensmitteln gelten Vitamine wie Thiamin - der Abbau führt zu heterocyclischen Aromastoffen - sowie die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Diese reagieren mit reduzierenden Zuckern im Rahmen der Maillard-Reaktion und führen im Verlauf des Strecker-Abbaus zur Bildung von Mercaptoacetaldehyd, Acetaldehyd, Schwefelwasserstoff und anderen Verbindungen (de Roos, 1992). Methylmercaptan und Schwefelwasserstoff sind ihrerseits reaktiv und können mit ungesättigten Strukturen sowie mit Carbonylverbindungen eine Bandbreite weiterer sensorisch aktiver Komponenten bilden (Scarpellino und Soukup, 1993). Im Gegensatz zum thermischen Abbau im Rahmen der Maillard-Reaktion kann Methionin auch enzymatisch zu Dimethylsulfid und weiteren sensorisch aktiven Verbindungen umgesetzt werden (Scarpellino und Soukup, 1993; Schutte, 1976).

Das Aromaprofil von *Brassicaceae*-Gemüse ist gekennzeichnet durch schwefelhaltige Aromastoffe, die beim Zubereiten infolge Gewebeerstörung oder durch den Kochvorgang gebildet werden. Dabei steht der enzymatische Abbau von Glucosinolaten im Vordergrund, der zu



in der Regel erwünschten scharfen und würzigen Noten führt. Bezogen auf die Trockenmasse enthalten frische *Brassicaceae*-Gewebe meist ca. 1 % Glucosinolate (Rosa *et al.*, 1997). In den Samen einiger Pflanzen kann der Gehalt bis zu 10 % betragen und damit bis zu 50 % des gesamten Anteils an Schwefel beinhalten (Josefsson, 1970).

Abbildung 2 zeigt schematisch den enzymatischen Abbau von Glucosinolaten bei der Verletzung des Gewebes; dieser wird durch Myrosinase-Isoenzyme ( $\beta$ -Thioglucosidase-Aktivität), die im frischen Gewebe in den Vakuolen lokalisiert sind, katalysiert (Fahey *et al.*, 2001). Die  $\beta$ -Thioglucosidase zeigt im Übrigen in ihrer Aminosäuresequenz starke Ähnlichkeiten mit Enzymen aus der Glykosylhydrolase-Familie.

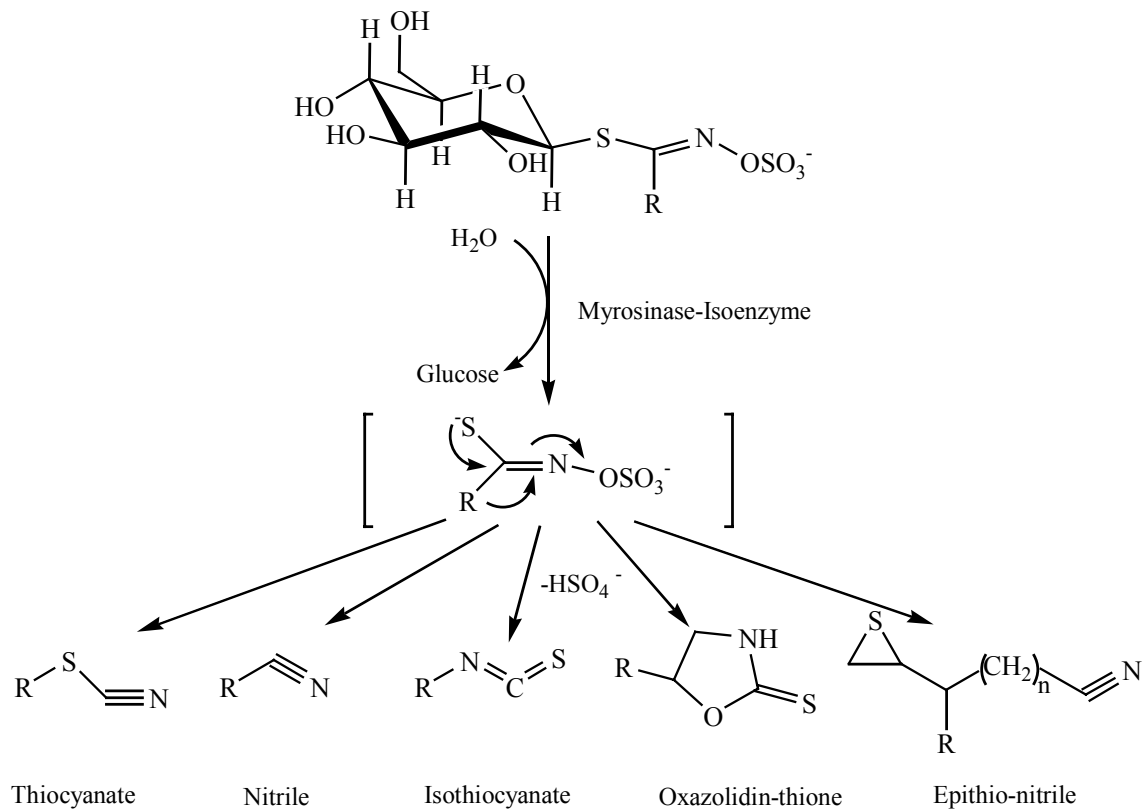


Abb. 2: Enzymatischer Abbau von Glucosinolaten durch Myrosinase-Isoenzyme (schematisch nach Fenwick *et al.*, 1983; Fahey *et al.*, 2001).

Nach enzymatischer Hydrolyse der Glucose-Einheit wird die Sulfat-Funktion nicht-enzymatisch abgespalten und es entsteht ein instabiles Intermediat, das Thiohydroxamat-O-sulfonat, aus dem durch Umlagerung in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Gehalt an  $\text{Fe}^{2+}$ , An- oder Abwesenheit eines sog. „Epithiospezifischer Protein“) sowie dem Rest R Thiocyanate, Nitrile, Isothiocyanate, Oxazolidin-2-thione oder Epithio-

ontrile entstehen. Dieser komplexe Mechanismus ist in seinen molekularen Grundlagen nur zum Teil aufgeklärt (Cole, 1976; Fenwick *et al.*, 1983; Leoni *et al.*, 1997; Fahey *et al.*, 2001).

Buttery *et al.* (1976) bestimmten für einige dieser Glucosinolat-Abbauprodukte Geruchsschwellenwerte (2-Propenyl-isothiocyanat 374 µg/l Wasser, 3-Methylthiobutylpropyl-isothiocyanat 5 µg/l, 4-Methylthiobutyl-isothiocyanat 3,4 µg/l, 2-Phenylethylnitril 15 µg/l). Diese meist im unteren ppb-Bereich liegenden Daten zeigen die Bedeutung der Spaltprodukte als Aromastoffe.

Zu den eher unangenehm riechenden Aromastoffen in *Brassicaceae*-Gemüsen zählen die aus S-Methyl-L-cysteinsulfoxid durch Kochen oder enzymatische Aktivität (Cystein-Sulfoxid Lyase) gebildeten Sulfide (Abbildung 3).

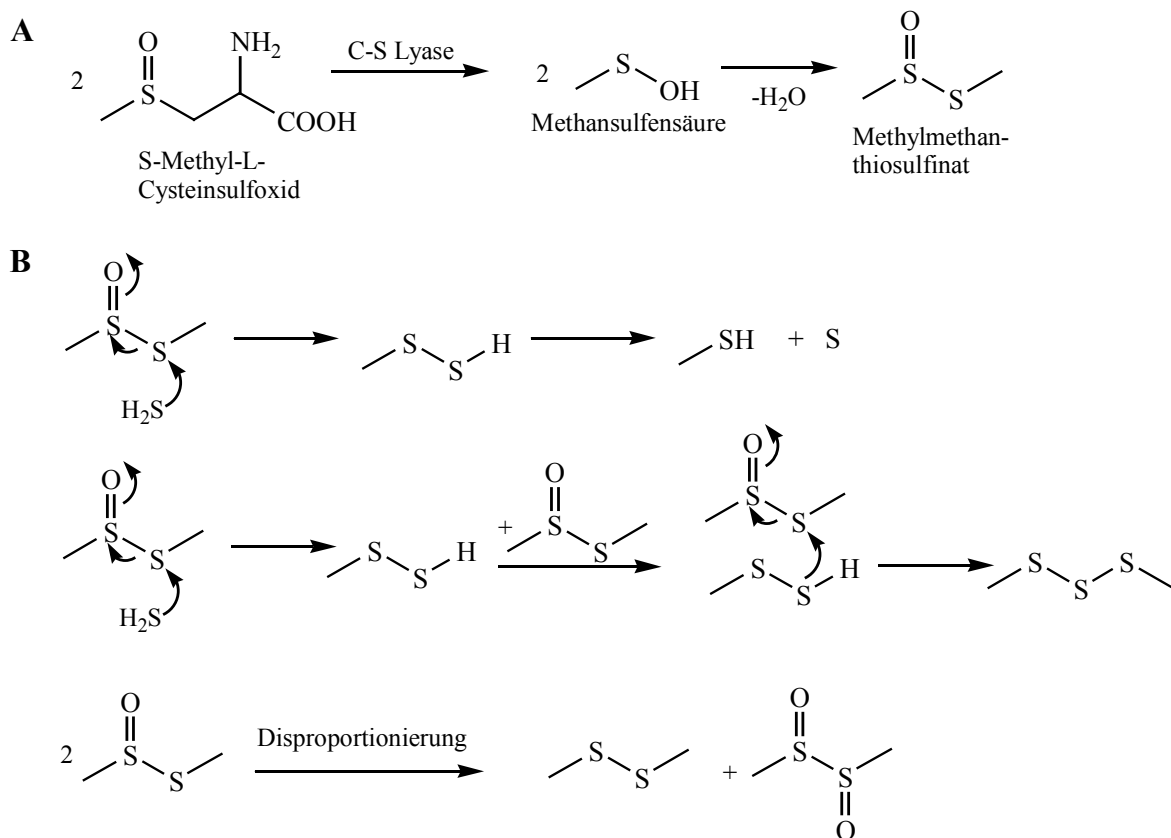


Abb. 3: Bildung von Methanthiol-verbunden flüchtigen schwefelhaltigen Verbindungen aus S-Methyl-L-cysteinsulfoxid durch Temperatureinfluss oder/und die Aktivität der Cystein Sulfoxid Lyase (C-S Lyase) in *Brassicaceae*-Gemüsearten (Marks *et al.*, 1992).

Das Primärprodukt des enzymatischen Abbaus von S-Methyl-L-cysteinsulfoxid, die Methansulfensäure, ist instabil und lagert unter Wasserabspaltung schnell zum Methylmethanthio-

sulfinat um (Abbildung 3A), das u.a. in Rosenkohl identifiziert wurde (Marks *et al.*, 1992). Aus diesem Vorläufer entstehen z.B. Methanthiol, Dimethyltrisulfid und Dimethyldisulfid (Abbildung 3B). Alle diese Verbindungen zeichnen sich durch sehr niedrige Geruchsschwellenwerte aus (z.B. Methanthiol 0,02 µg/l Wasser) (Lindsay *et al.*, 1986).

## 1.2.2 Instrumentell-analytische Grundlagen

### 1.2.2.1 Selektive Detektion flüchtiger schwefelhaltiger Verbindungen

Um schwefelhaltige Aromastoffe, die in pflanzlichen Geweben meist nur als Spuren unter einer Vielzahl anderer Komponenten zu finden sind, in einer solchen Mischung schnell und empfindlich detektieren zu können, bedarf es des Einsatzes selektiver, empfindlicher Detektoren. Zu nennen sind hier der Schwefel-Chemilumineszenz Detektor (SCD), der Flammen-Photometrische Detektor (FPD) und der Atom-Emissions Detektor (AED). Im Folgenden wird kurz die Funktionsweise der drei Detektoren, insbesondere auch im Hinblick auf Selektivität und Sensitivität erläutert.

Das Prinzip des SCD beruht auf der Verbrennung von schwefelhaltigen organischen Verbindungen in einer Flamme (unter Zufuhr von viel Wasserstoff, aber wenig Sauerstoff oder Luft) zu Schwefelmonoxid (SO) bei 800°C (Abbildung 4, Reaktion 1). In einer nachgeschalteten Reaktionszelle (20-25 mbar) trifft SO auf Ozon (O<sub>3</sub>), das in einem Reaktor durch Koronarentladung aus Sauerstoff und Hochspannung produziert wird. Durch eine stark exotherme Reaktion entsteht eine angeregte Spezies von Schwefeldioxid (SO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) (Abbildung 4, Reaktion 2). Unter Abgabe von Licht mit einer maximalen Intensität bei 350 nm kehrt dieses SO<sub>2</sub><sup>\*</sup> wieder in den Grundzustand zurück (Abbildung 4, Reaktion 3), die Strahlung wird mittels eines Photomultipliers detektiert. Das Detektionslimit eines SCD ist abhängig von der Struktur der zu analysierenden Verbindung. Für Butyldisulfid beispielsweise liegt es bei 10 pg, für Butylmercaptan bei 40 pg und für Thiophenol bei 2000 pg; die Obergrenzen des dynamischen linearen Bereichs eines SCD liegen zwischen 200 ng und 1000 ng. Die Selektivität zeigt sich darin, dass nicht-schwefelhaltige organische Verbindungen wie Dichlormethan, Methylantranilat oder Pentan nicht detektiert werden (Mistry *et al.*, 1994).

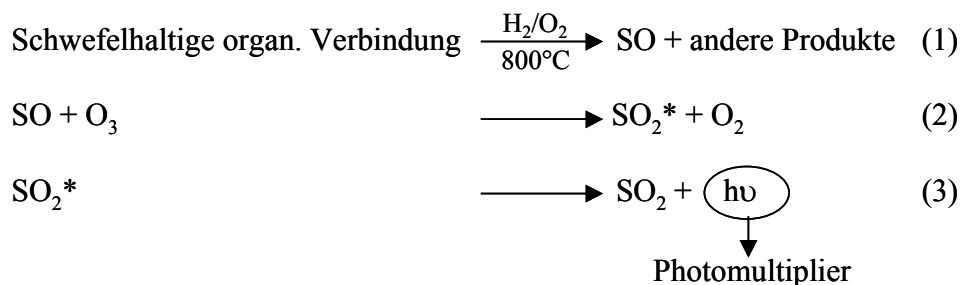


Abb. 4: Prinzip der Funktionsweise eines Schwefel-Chemilumineszenz Detektors (SCD) (Benner und Stedman, 1989; Shearer, 1994).

Auch beim FPD, mit dem sich außer schwefelhaltigen Verbindungen auch phosphorhaltige detektieren lassen, werden die organischen Verbindungen in einer Flamme unter Zufuhr von Wasserstoff und Sauerstoff verbrannt. Dabei entsteht eine angeregte S=S-Spezies, die beim Übergang in den Grundzustand Licht der Wellenlänge 393 nm emittiert, das von einem Photomultiplier (mit Filter zur selektiven Detektion der Wellenlänge 393 nm) erfasst wird. Sensitivität, Selektivität und Linearität des Detektors hängen stark von den Einstellung bezüglich der Brenngase und der Detektortemperatur ab. Es kann – unter Empfindlichkeitsverlust - im Detektor zu Quenching-Reaktionen zwischen den Heteroatom-Spezies untereinander und zwischen den Heteroatom-Spezies und Wasserstoff kommen. Der dynamische Bereich eines FPD liegt zwischen 100 pg (Detektionslimit) und ca. 200 ng (Mistry *et al.*, 1994).

Neben der elementspezifischen Detektion von z.B. chlor-, stickstoff- oder phosphorhaltigen Substanzen ermöglicht die Kopplung eines Gaschromatographen mit einem AED auch die schwefelselektive Detektion. Als Interface wird eine beheizte Transferline (Kapillarrohr) von der Trennsäule in den AED geführt; dort erfolgt im mikrowelleninduzierten Plasma die Zersetzung der Substanzen in Atome und deren Anregung. Das emittierte Licht gelangt über ein holographisches Gitter auf einen Photodiodenarray (ermöglicht die Aufnahme von Spektren; schwefelhaltige Verbindungen zeichnen sich durch ein Triplett bei 180,7, 182,0 und 182,6 nm aus) oder einen Photomultiplier. Die Detektionsgrenzen eines AED im Bezug auf schwefelhaltige Verbindungen liegen zwischen 1 pg (für Butyldisulfid) und 100 pg (für Thiophenol), der dynamische Bereich kann sich bis hin zu 2000 ng erstrecken (Mistry *et al.*, 1994).

Allen drei Detektoren ist gemeinsam, dass man außer der Selektivität und der mehr oder weniger großen Sensitivität keine Strukturinformation über die Analyten erhält. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit über schwefel-

haltige Aromastoffe in Rucolablättern durchgeführt wurden, ein System gewählt, das die Vorteile des SCD mit denjenigen eines Massenspektrometers vereint (Abbildung 5).

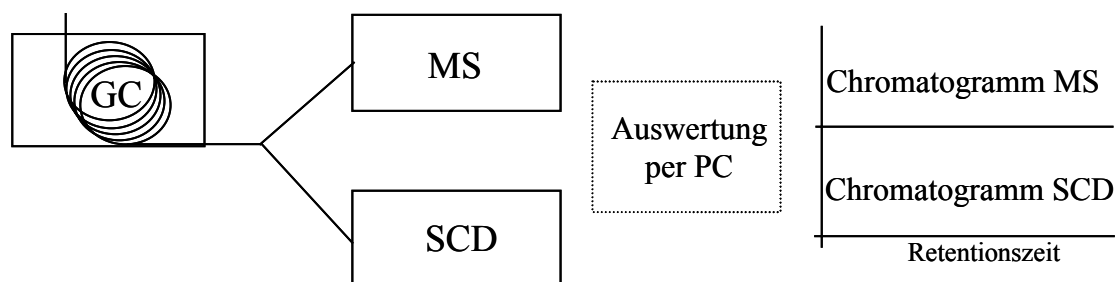


Abb. 5: Schematische Darstellung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Systems zur Paralleldetektion schwefelhaltiger flüchtiger Verbindungen aus Aromaextrakten von Rucola mittels HRGC-MS/SCD.

Nach der gaschromatographischen Trennung der Komponenten wird das Eluat der Trennsäule über ein Splitventil im Verhältnis 1:1 geteilt und dann jeweils zum MS bzw. zum SCD weitergeführt. Die Dimensionen der Zuführkapillaren sind unter Berücksichtigung der am MS und am SCD anliegenden Vakuum-Drücke so gewählt, dass die eluierenden Komponenten gleichzeitig an beiden Detektoren eintreffen und im aufgenommenen Chromatogramm die Signale in der SCD- und der MS-Spur idealerweise direkt übereinander liegen (eine Serienschaltung der Detektoren scheidet aus, da beide Systeme die Analyten in ihrer Struktur so verändern, dass eine Detektion durch einen zweiten Detektor nicht mehr möglich ist).

Bei der Analytik flüchtiger schwefelhaltiger Verbindungen ist eine durch das System bedingte potentielle Artefaktbildung (heiße Zonen, z.B. im Injektor des Gaschromatographen) zu berücksichtigen (Block, 1993). Gerade bei solchen Verbindungen, die im Rahmen einer Untersuchung als „neu“ beschrieben werden, ist daher eine Kontrolle des verwendeten analytischen Systems anhand einer (synthetisierten) Referenzverbindung unumgänglich.

### 1.2.2.2 Analytik chiraler schwefelhaltiger Verbindungen

#### *Übersicht*

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration von organischen Molekülen sowie die Ermittlung des Enantiomerenverhältnisses einer chiralen Verbindung aus einer komplexen Mischung (z.B. Aromaextrakt) heraus gehört bis heute mit zu den schwierigsten Aufgaben bei der Strukturaufklärung. In den letzten Jahren haben neben NMR-spektroskopischen Techniken, die allerdings auf die Analytik von Reinsubstanzen beschränkt sind, vor allem die fortschrittlichen Trenntechniken der GC und HPLC an chiralen Phasen, insbesondere auch der Einsatz der Multidimensionalen Gaschromatographie (MDGC) im Bereich der GC (Schreier *et al.*, 1995), sowie die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie zur Aufklärung der absoluten Konfiguration chiraler Verbindungen zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Die MDGC und die CD-Spektroskopie beruhen auf grundsätzlich verschiedenen Ansätzen. Die Auftrennung chiraler Verbindungen nach Derivatisierung zu Diastereomeren an achiralen Phasen bzw. die chromatographische Trennung underivatisierter Enantiomere an chiralen Phasen stellen keine Absolutmethode dar. Die Zuordnung der Konfiguration (*R*) oder (*S*) in den Produkten kann nur getroffen werden, wenn mit authentischen Referenzen die Elutionsreihenfolge festgelegt wird. Bei der CD-Spektroskopie werden die Enantiomere nicht chromatographisch getrennt. Eine spezielle Variante der CD-Spektroskopie, die sog. „exciton-coupled circular dichroism“ (ECCD)-Methode, ermöglicht aus dem CD-Spektrum eines Enantiomeren dessen Absolutkonfiguration zu bestimmen. Diese Zuordnung kann getroffen werden, ohne dass die Daten des entsprechenden Enantiomers oder einer Referenz vorliegen; diese Methode stellt somit eine Absolutmethode dar (Harada und Nakanishi, 1983; Nakanishi und Berova, 1994; Schreder *et al.*, 1996).

#### *Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses mittels Multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS)*

Gemische von Enantiomeren lassen sich mittels Gaschromatographie nach zwei Verfahren trennen. Bei der indirekten Methode werden sie durch Umsetzung mit einem enantiomerenreinen Reagenz zu Diastereomeren umgesetzt und können dann an einer achiralen Phase getrennt werden. Bei der direkten Methode, die sich heute weitgehend durchgesetzt hat, werden die Enantiomere direkt an einer chiralen stationären Phase getrennt. Um der Auftrennung von

Enantiomeren aus komplex zusammengesetzter Mischung heraus gereicht zu werden, hat man seit mehreren Jahren für die gaschromatographische Enantiomerenanalytik mehrere (meist zwei) stationäre Phasen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften durch eine serielle Verbindungsstelle gekoppelt; man kommt somit zur Multidimensionalen Gaschromatographie (MDGC) (Deans, 1981; Gibbings, 1984; Schomburg *et al.*, 1984).

Für die Enantiomerenanalytik von Aromastoffen mittels MDGC ist die Kombination aus einer Vorsäule (achirale Phase) und einer Hauptsäule (chirale Phase) als probates Werkzeug etabliert (Werkhoff *et al.*, 1993; Mosandl, 1995). Für die Herstellung enantioselektiver Trennsäulen werden heute vorwiegend modifizierte Cyclodextrine als chirale Separatoren in der Trennphase eingesetzt (Schreier *et al.*, 1995; Mosandl, 1998). Im Analysenablauf wird die komplexe Mischung auf der Vorsäule aufgetrennt und nur die zu bestimmende chirale Verbindung wird dann selektiv mittels einer Säulenschaltung zur Trennung der Enantiomere auf die chirale Hauptsäule übertragen („Cut“). Zur getrennten Steuerung der Temperaturgradienten für Vor- und Hauptsäule verwendet man in der Regel ein Doppelofensystem. Eine spezielle Säulenschaltung verbindet beide stationären Phasen miteinander und ermöglicht so einen „Cut“. Als Detektor für die Vorsäule (Monitor-detektor) wird normalerweise ein Flammenionisationsdetektor (FID) verwendet, das Eluat der chiralen Phase kann je nach Fragestellung mit einem FID, einem MS oder einem selektiven Detektor (z.B. SCD) untersucht werden.

Für die praktische Umsetzung der Säulenschaltung stehen im Wesentlichen zwei Systeme zur Verfügung. Bei der sog. „Live“-T-Schaltung, eine auf Schomburg (Schomburg *et al.*, 1983; Schomburg, 1984) zurückgehende Ventil-freie Säulenschalttechnik, bildet eine pneumatische Brückenschaltung das Kernstück. Der Transfer von der Vorsäule zum Detektor bzw. zur Hauptsäule wird allein durch Gasdruckregelung über verschiedene Nadelventile realisiert. Der von Sulzbach und Gill (Firma ThermoFinnigan, Egelsbach) im Jahre 1990 entwickelten Säulenschaltung mittels „Moving Column Stream Switch“ (MCSS) liegt ein anderes Prinzip zugrunde. Innerhalb eines minimalen abgeschlossenen Raumes, dem sog. „Dom“, werden alle für die Schnittstelle notwendigen Kapillarsäulen und -verbindungen (Säulenende Hauptsäule, Transfer zum Monitor-detektor, Säulen-anfang Hauptsäule, Gas-Zuführung für den Dom, Transfer zum Manometer zum Auslesen des Domdruckes) sehr nahe aneinander herangeführt. Dabei ist das Säulenende der Vorsäule über einen Motor in vertikaler Richtung beweglich und kann für den Cut-Vorgang entweder nahe an die Zuleitung zum Monitor-detektor oder nahe an den Säulen-anfang der Hauptsäule herangeführt werden.

*Bestimmung der Absolutkonfiguration mittels CD-Spektroskopie*

Der elektrische und damit auch der magnetische Feldvektor von Licht, das physikalisch als elektromagnetische Strahlung beschrieben werden kann, schwingen in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle in Form einer Sinuskurve. Die Energie dieser Welle ist ausreichend, um Elektronen in angeregte Zustände überzuführen. Farblich erscheinende Verbindungen absorbieren Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich (Licht von niedriger Energie), während Verbindungen ohne ausgedehnte Chromophore nur durch ultraviolettes Licht (Licht höherer Energie) angeregt werden. So besitzt jedes Molekül abhängig von Art, Anzahl und Verteilung von Chromophoren im Molekül ein mehr oder weniger charakteristisches UV-Spektrum. Dabei ist der Drehwert  $\alpha$  einer optisch aktiven Verbindung die Drehung des elektrischen Feldvektors der Lichtwelle um einen für diese Verbindung charakteristischen Wert.

Bei der CD-Spektroskopie macht man sich zirkular polarisiertes Licht zunutze, bei dem der elektrische Feldvektor um die Achse der Ausbreitungsrichtung rotiert und somit eine Helix beschreibt, zunutze. In Abhängigkeit von der Rotationsrichtung des Vektors unterscheidet man zwischen rechts- und links-zirkular polarisiertem Licht (definitionsgemäß entspricht rechts-zirkular polarisiertes Licht einer Rotation im Uhrzeigersinn und vice versa). Werden die beiden Feldvektoren des zirkular polarisierten Lichtes addiert, erhält man den Feldvektor von linear polarisiertem Licht. Eine optisch aktive Verbindung geht unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit den Teilstrahlen des zirkular polarisierten Lichts ein, so dass sich der Brechungsindex und damit die Fortpflanzungsgeschwindigkeit und die Wellenlänge ändern. Nach dem Austritt aus der Probe addieren sich die Vektoren wieder zu linear polarisiertem Licht, dessen Schwingungsebene allerdings jetzt um den Winkel  $\alpha$  gedreht ist. Der Betrag von  $\alpha$  ist einerseits abhängig von der Verbindung und andererseits von äußeren Faktoren (Konzentration; Küvettenlänge; Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes). Die Änderung des Drehwinkels in Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als optische Rotationsdispersion (ORD) bezeichnet (Snatzke, 1981).

Der Drehwinkel kehrt im Absorptionsmaximum der Substanz sein Vorzeichen um, man nennt diese Erscheinung „Cotton-Effekt“ (CE). Ändert sich nach kürzeren Wellenlängen der Wert von positiv nach negativ, so spricht man von einem positiven Cotton-Effekt, im entgegengesetzten Fall von einem negativen CE. Der Effekt des sogenannten Circular dichroismus (CD) tritt auf, weil die beiden zirkularen Teilstrahlen unterschiedlich stark absorbiert werden. Da die beiden Teilstrahlen beim Austritt aus der Probe dadurch eine unterschiedliche Amplitude



haben, resultiert ein elliptisch polarisierter Summenstrahl. Bei der CD-Spektroskopie wird abwechselnd links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht gleicher Intensität durch eine Probe geschickt und die Intensitäten der austretenden Lichtstrahlen werden gemessen. Der Circular-dichroismus wird entweder als Elliptizität  $\Theta$  oder üblicherweise als Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  gemessen. Dabei ist  $\Delta E$  die Differenz zwischen der Extinktion für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht ( $\Delta E = E_L - E_R$ ). Wenn ein CD-Effekt auftritt, haben die beiden Teilstrahlen nach dem Austritt unterschiedliche Intensitäten, es kann dann aus dem erhaltenen CD-Spektrum auf die absolute Konfiguration einer chiralen Verbindung geschlossen werden.

Eine spezielle Methode der CD-Spektroskopie ist von Nakanishi und seiner Arbeitsgruppe entwickelt worden, die als „exciton-coupled circular dichroism“ (ECCD)-Methode bezeichnet wird (Harada und Nakanishi, 1983; Nakanishi und Berova, 1994). Die (ECCD)-Methode stellt eine spezielle Anwendung der CD-Spektroskopie dar, welche die nichtempirische Bestimmung von Absolutkonfigurationen und Konformationen organischer Moleküle im Mikromaßstab ermöglicht. Voraussetzung zur Anwendung der ECCD-Methode ist das Vorliegen zweier oder mehrerer chromophorer Gruppen in der zu untersuchenden Verbindung. Dabei können die Chromophore im Molekül bereits vorhanden sein (z.B. ein konjugiertes Diensystem) oder über eine O-, S- oder N-Acylierung erst eingeführt werden. Die beiden Chromophore müssen nicht notwendig identisch sein. Günstige Chromophore sind symmetrische Moleküle mit hohen Extinktionskoeffizienten und bekannter Richtung des elektrischen Übergangsmomentes.

Die ECCD-Methode beruht auf der Wechselwirkung zwischen den elektrischen Übergangsmomenten benachbarter Chromophore eines Moleküls. Diese bewirkt eine Aufspaltung (*splitting*) der beiden angeregten Zustände. Die daraus resultierende Split-CD-Kurve ist abhängig von den Extinktionskoeffizienten und dem Abstand in den Absorptionsmaxima  $\Delta\lambda_{\max}$  der beiden Chromophore sowie von ihrer räumlichen Entfernung. Je höher die Extinktionskoeffizienten sind, desto höher ist die Amplitude der resultierenden CD-Kurve. Dagegen nimmt die Amplitude mit der räumlichen Entfernung und steigendem  $\Delta\lambda_{\max}$  ab. Die Kopplung der elektrischen Übergangsmomente bedingt, dass es nicht mehr möglich ist, Einzelübergänge eines Chromophors anzuregen, sondern nur eine Kombination beider Übergänge.

Von den beiden möglichen Kombinationen stellt die ungleichsinnige Dipol-Dipol-Wechselwirkung (die Übergangsmomente ziehen einander an) den Übergang zum energetisch tieferliegenden Zustand A dar, während die gleichsinnige, abstoßende Wechselwirkung den Übergang zum Zustand B darstellt (vgl. Abbildung 6). Diese Wechselwirkungen lassen sich auch mit Hilfe von Wellenfunktionen berechnen.

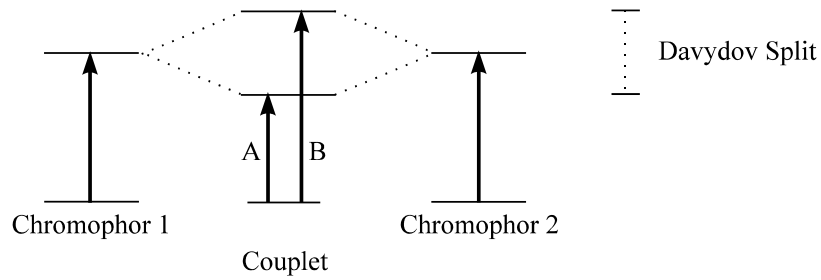


Abb. 6: Die Wechselwirkung zwischen den elektrischen Übergangsmomenten führt zu einer Aufspaltung in zwei Energiezustände, den niedrigeren Zustand A und den höheren Zustand B. Die Differenz der Energieniveaus entspricht dem Davydov Split (Harada und Nakanishi, 1983; Nakanishi und Berova, 1994).

Wie Abbildung 7 veranschaulicht, äußert sich die Aufspaltung der angeregten Zustände im UV-Spektrum nur durch eine Kurve mit einfachem Maximum, aber doppelter Intensität.

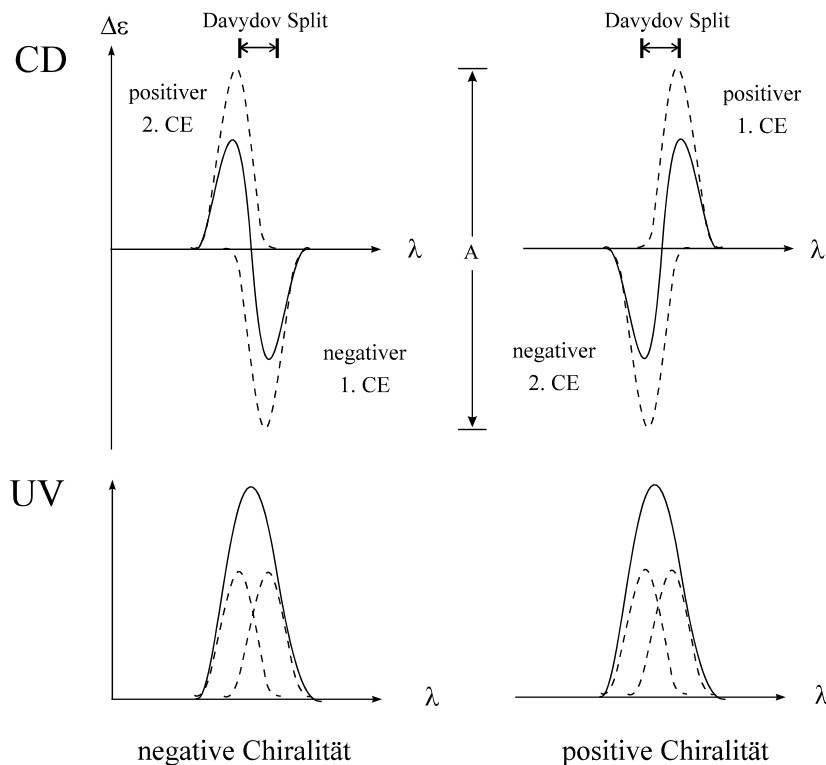


Abb. 7: Die Überlagerung der beiden Cotton-Effekte (---) führt zu einem Couplet (—), dessen Vorzeichen von der Chiralität der Chromophore bestimmt wird. Die Höhe der Amplitude A ergibt sich durch Addition der Beträge des ersten und zweiten Cotton-Effekts. Die Addition der Teilkurven im UV-Spektrum führt zu einem einzigen Maximum (Harada und Nakanishi, 1983).

Im CD-Spektrum führt diese Kopplung zum Auftreten von zwei Cotton-Effekten entgegengesetzten Vorzeichens, die gegeneinander verschoben sind. Deren Addition ergibt die typische „Split“-CD-Kurve mit einem positiven und einem negativen Zweig. Dabei wird der Kurvenast bei höheren Wellenlängen als erster CE bezeichnet, der bei niedrigeren Wellenlängen als zweiter CE. Der Abstand zwischen den beiden Cotton-Effekten ist der sog. „Davydov Split“ (Harada und Nakanishi, 1983).

Definitionsgemäß ergeben ein positiver erster CE und ein negativer zweiter CE ein sogenanntes positives Couplet, die Verbindung besitzt „positive Chiralität“. Abbildung 8 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Molekülgeometrie und Chiralität.

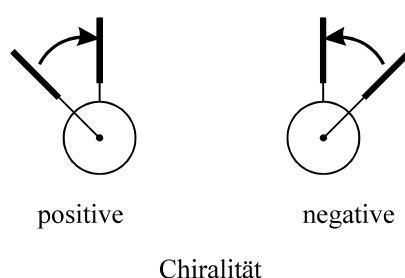


Abb. 8: Zusammenhang zwischen Molekülgeometrie und Chiralität (Harada und Nakanishi, 1983).

Sind die Übergangsdipolmomente der Chromophore in der Newman-Projektion des Moleküls im Uhrzeigersinn angeordnet - die Blickrichtung verläuft entlang der C-C-Achse der Kohlenstoffe, die die chromophoren Gruppen tragen - dann besitzt die Verbindung positive Chiralität; andernfalls spricht man von negativer Chiralität. Dabei spielt es keine Rolle, von welcher Seite aus das Molekül betrachtet wird.

Da das Vorzeichen der CD-Kurve von der absoluten Orientierung der beiden elektrischen Übergangsmomente abhängig ist, lassen sich allein aus dem Vorzeichen der CD-Kurve Rückschlüsse auf die absolute Stereochemie einer chiralen Verbindung ziehen.

### **1.2.3 Schwefelhaltige Aromastoffe in Rucola – Ergebnisse der Analytik mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Schwefelchemilumineszenzdetektion (HRGC-MS/SCD)**

Nach dem aktuellen Stand der Literatur existieren keine Arbeiten, die aus instrumentell-analytischer Sicht einen Überblick über das in Rucolablättern - derjenige Teil der Pflanze, der vermehrt als Lebensmittel verwendet wird - enthaltene Aromaprofil unter spezieller Berücksichtigung schwefelhaltiger Aromastoffe geben. Einige Arbeitsgruppen (Hamence und Taylor, 1978; Mahran *et al.*, 1992) beschäftigten sich in ihren Untersuchungen mit der GC-MS-Analytik der Bestandteile einer Wasserdampffraktion aus dem Öl von luftgetrockneten *Eruca sativa* Samen. Dabei wurden unter anderem Methyl-, 3-Butenyl-, 4-Methylthiobutyl- und 5-Methylthiopentylisothiocyanat neben 4-Methylthiopentanonitril, Tetrahydrothiophen, 2-Pentylfuran sowie Hexanal und Nonanol detektiert. Mit *Eruca sativa* Blättern durchgeführte Untersuchungen (Schlüter und Gmelin, 1972; Fenwick *et al.*, 1983; Cerny *et al.*, 1996) beziehen sich im Wesentlichen auf die Analytik der aus dem Hauptglucosinolat des Rucola – Glucoerucin (4-Methylthiobutylglucosinolat) - gebildeten Abbauprodukte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Aromaprofil von Rucolablättern unter spezieller Berücksichtigung schwefelhaltiger Aromastoffe mit der im Abschnitt 1.2.2 vorgestellten HRGC-MS/SCD Analytik untersucht. Dabei stellte sich zunächst die Frage nach geeigneten Aufarbeitungsmethoden zur Herstellung von Aromaextrakten. Zur Gewinnung eines Rohextraktes standen zwei Möglichkeiten zur Auswahl: die Zerkleinerung des Materials unter Zusatz von Wasser und die direkte Extraktion der Blätter mittels Auspressen. Dabei waren die Zerkleinerung des Materials und die damit im Gewebe ablaufenden Reaktionen zwischen Enzymen und potentiellen Aromastoffvorläufern durchaus erwünscht, da diese Reaktionen auch beim Verzehr von Rucola als Lebensmittel eintreten; auf eine Inhibierung der enzymatischen Degradationsprozesse wurde deshalb verzichtet.

Auch zur Extraktion der Rohextrakte standen mehrere Alternativen zur Auswahl: die Extraktion der wässrigen Extrakte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, die Abtrennung mittels Simultaner Destillation-Extraktion (SDE), durch die das Material zusätzlich thermisch belastet wird, und die adsorptive Extraktion der Aromastoffe mittels Festphasenextraktion an XAD-2-Material mit anschließender Diethylether-Elution der Aromastoffe.

Nach einer Reihe von Vorversuchen wurden folgende Aufarbeitungsschritte gewählt:

- (1) Gewinnung eines Rohextraktes durch Auspressen der Blätter (ohne Wasserzusatz, dadurch keine Verdünnung).
- (2a) Adsorption/Extraktion des Rohextraktes an XAD-2 Material (direkte Lösungsmittelextraktion war infolge starker Emulsionsbildung nicht möglich) und
- (2b) Abtrennung der Aromastoffe aus dem Rohextrakt mittels Simultaner Destillation-Extraktion (SDE).

Die erhaltenen Extrakte wurden mittels HRGC und Paralleldetektion sowohl durch MS als auch durch SCD analysiert (Abbildung 9, HRGC-MS/SCD Analytik des XAD-Ethereluates aus gepresstem Saft von Rucolablättern).

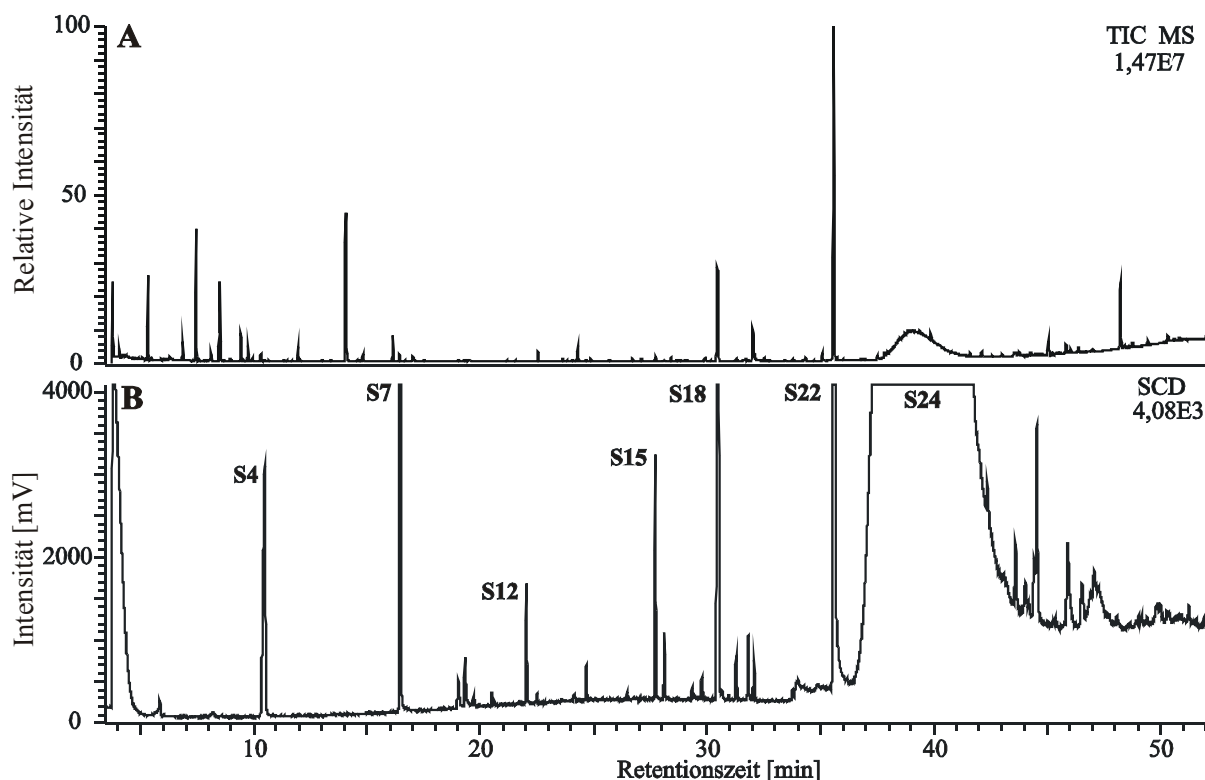
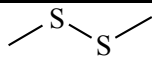
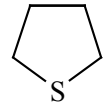
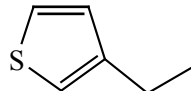
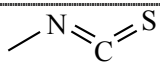

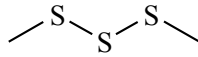
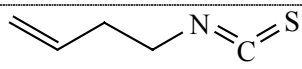
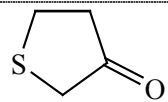
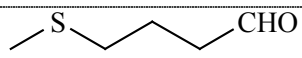
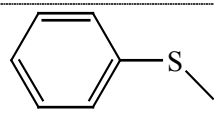
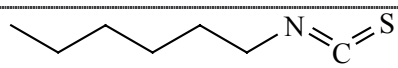


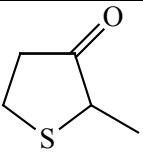
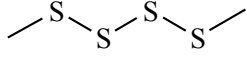
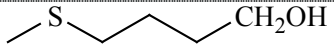
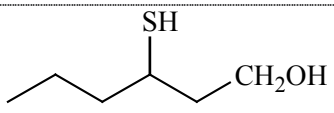
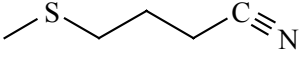
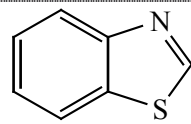
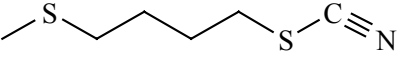
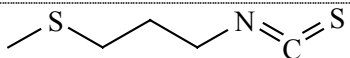
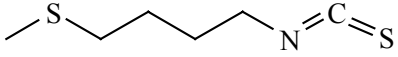
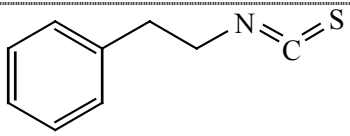
Abb. 9: HRGC-MS/SCD Analytik des XAD-Ethereluates aus gepresstem Saft von Rucolablättern (Trennsäule #1, Temperaturprogramm #1); **A**: Totalionenstrom (TIC) der MS-Detektion, **B**: parallel zum TIC aufgenommene analoge SCD-Detektion; die intensivsten Signale des SCD sind in Tab. 1 entsprechend bezeichnet.

Aus Abbildung 9 wird die Bedeutung der verwendeten Analytik - Kombination von Strukturinformation durch MS sowie selektive und sensitive Detektion durch SCD - deutlich. Mittels HRGC-MS/SCD-Analyse ließ sich jedem Signal des S-selektiven Detektors ein entsprechendes im MS-TIC zuordnen. Dadurch erhielt man zu jeder schwefelhaltigen Verbindung ein Massenspektrum, mit dessen jeweiliger Information in Verbindung mit dem Retentionsindex (KI) 22 der insgesamt 26 detektierten und korrelierten Signale identifiziert werden konnten.

Tabelle 1 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Auswertung der HRGC-MS/SCD-Analytik. Gleichzeitig wurden durch den Zusatz eines internen Standards (2-Heptanon) über die Flächeneinheiten der Signale des MS-TIC die Mengen der enthaltenen Schwefelverbindungen halbquantitativ (d.h. ohne Berücksichtigung von Responsefaktoren) erfasst.

Tab. 1: In Rucolablättern mittels HRGC-MS/SCD identifizierte Aromastoffe (vgl. Abbildung 9).

KI <sup>a</sup>	Verbindung <sup>b</sup>	XAD <sup>c</sup>	SDE <sup>c</sup>	Struktur bzw. Massenzahlen <i>m/z</i> (%)
1017	Dimethyldisulfid <sup>f</sup> <b>S1</b>	-	1	
1083	Tetrahydrothiophen <b>S2</b>	-	<1	
1165	3-Ethylthiophen <b>S3</b>	-	1	
1209	Methylisothiocyanat <sup>e</sup> <b>S4</b>	7	11	
1278	Propylisothiocyanat <sup>e</sup> <b>S5</b>	1	2	
1391	Dimethyltrisulfid <sup>f</sup> <b>S6</b>	-	4	
1450	3-Butenylisothiocyanat <sup>e</sup> <b>S7</b>	6	1	
1478	Tetrahydrothiophen-3-on <b>S12</b>	1	-	
1538	4-Methylthiobutanal <b>S9</b>	<1	-	
1555	Methylthiobenzol <b>S10</b>	1	-	
1559	Hexylisothiocyanat <sup>e</sup> <b>S11</b>	-	1	

KI <sup>a</sup>	Verbindung <sup>b</sup>	XAD <sup>c</sup>	SDE <sup>c</sup>	Struktur bzw. Massenzahlen <i>m/z</i> (%)
1567	2-Methyltetrahydrothiophen-3-on <b>S8</b>	<1	2	
1737	Dimethyltetrasulfid <b>S13</b>	-	<1	
1799	4-Methylthiobutanol <b>S14</b>	1	-	
1819	Unbekannte <b>S15</b>	5	9	116 (76), 88 (45), 60 (100), 55 (52), 54 (19), 41 (27)
1829	3-Sulfanyl-1-hexanol <sup>g</sup> <b>S16 (= 6)</b>	2	1	
1857	Unbekannte <b>S17</b>	-	22	136 (5), 114 (26), 100 (13), 87 (66), 82 (46), 55 (64), 54 (100), 47 (65), 41 (73)
1878	4-Methylthiobutylnitril <sup>d</sup> <b>S18</b>	89	50	
1929	Benzothiazol <b>S19</b>	-	1	
1949	4-Methylthiobutylthiocyanat <b>S20</b>	20	14	
2041	3-Methylthioisothiocyanat <b>S21</b>	1	2	
2116	4-Methylthiobutylisothiocyanat <sup>e</sup> <b>S22</b>	432	689	
2165	2-Phenylethylisothiocyanat <sup>e</sup> <b>S23</b>	-	1	
2259	Unbekannte <b>S24</b>	540	-	147 (5), 114 (100), 87 (33), 85 (18), 72 (42), 60 (34), 55 (35), 47 (35)
2305	Unbekannte <b>S25</b>	-	11	163 (5), 161 (52), 93 (7), 82 (51), 80 (67), 64 (11), 55 (100), 45 (21)
2507	Unbekannte <b>S26</b>	1	12	193 (4), 114 (100), 79 (10), 72 (95), 55 (58), 45 (18)

<sup>a</sup> linearer Retentionsindex; <sup>b</sup> ermittelt durch Spektrenvergleich mit NIST und Wiley Bibliothek; <sup>c</sup> halbquantitative Abschätzung in µg/100 g Salat, interner Standard 2-Heptanon, Berechnung ohne Berücksichtigung des jeweiligen Responsefaktors; <sup>d</sup> vgl. Spencer und Daxenbichler, 1980; <sup>e</sup> vgl. Kjaer, 1963; <sup>f</sup> vgl. Näf und Velluz, 1996; <sup>g</sup> vgl. Weber *et al.*, 1992.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, setzten sich die beiden SDE- und XAD-Extrakte aus drei bzw. vier Hauptkomponenten (**S18**, **S20**, **S22** im SDE-Extrakt, **S18**, **S20**, **S22**, **S24** im XAD-Extrakt) und etlichen Minorverbindungen zusammen. Zu den nicht-schwefelhaltigen Verbindungen, die in beiden Extrakten detektiert werden konnten, zählen die als „Grünnoten“ bekannten C<sub>6</sub>-Komponenten *E*-2-Hexenal, *Z*-3-Hexen-1-ol und *E*-2-Hexen-1-ol.

Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Extrakten ist hinsichtlich der Unbekannten **S24**, die nur im XAD-Extrakt detektiert werden konnte, zu erkennen. **S24** ist offensichtlich nicht wasserdampflich und lässt sich nur schlecht gaschromatographisch analysieren (Abbildung 9); auf die Verbindung **S24** wird in Abschnitt 1.2.5 näher eingegangen. Die Verbindungen **S1-S4**, **S13** und **S19**, die nur im Extrakt der SDE-Aufarbeitung detektiertbar waren, sind aus entsprechenden Vorläufern durch den Einfluss der Temperatur entstanden (Abbildung 2).

Die detektierten Verbindungen 4-Methylthiobutylnitril **S18**, 4-Methylthiobutylthiocyanat **S20** und 4-Methylthiobutylisothiocyanat **S22** sind auf einen Abbau aus dem bereits in Rucola beschriebenen, mengenmäßig vorherrschenden Glucosinolat Glucoerucin (4-Methylthiobutylglucosinolat) zurückzuführen. Die Art der bei dieser Reaktion entstehenden funktionellen Gruppen an den terminalen Enden der Abbauprodukte ist im Übrigen vom pH-Wert abhängig (McGregor *et al.*, 1983; Wagner, 1988). Der gemessene pH-Wert von 6,0 im Saft der Blätter steht im Einklang mit der Tatsache, dass überwiegend Isothiocyanate aus Glucoerucin gebildet worden sind.

Unter den identifizierten Schwefelverbindungen ist 3-Sulfanyl-1-hexanol aufgrund seines Chiralitätszentrums besonders interessant. Zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses solcher Sulfanylalkanole liegen Arbeiten von Weber *et al.* (1992) und Widder *et al.* (2000) vor. Nach dem aktuellen Stand der Literatur gibt es jedoch keine Arbeiten zur Bestimmung der Absolutkonfiguration von chiralen Sulfanylalkanolen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine Methodik zur Bestimmung der Absolutkonfiguration mittels ECCD als Modellstudie (Kapitel 1.2.4.1) entwickelt. Zusätzlich wurde auch das in Rucola vorliegende Enantiomerenverhältnis von 3-Sulfanyl-1-hexanol mittels MDGC-MS bestimmt (Kapitel 1.2.4.2).



## 1.2.4 Analytik von 3-Sulfanyl-1-hexanol

### 1.2.4.1 Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration von 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanolen mittels ECCD (Modellstudie)

#### 1.2.4.1.1 Strategie und Synthese enantiomerenreiner Referenzen

Bisher ist die ECCD-Methode v.a. für die stereochemische Zuordnung von Hydroxy- oder Aminofunktionen genutzt worden, da sich diese problemlos mit Chromophoren umsetzen lassen, die eine als Imidazol, Triazol oder Halogenid aktivierte Säuregruppe besitzen (Zhou *et al.*, 1993a; Harada *et al.*, 1996; Akritopoulou-Zanze *et al.*, 1997). Die am häufigsten eingesetzten Chromophore sind dabei *para*-substituierte Benzoesäure- oder Zimtsäure-Derivate, 9-Anthroat oder 2-Naphthoat (Wiesler und Nakanishi, 1989a; Zhou *et al.*, 1991a; Zhou *et al.*, 1991b; Zhou *et al.* 1993b; Humpf *et al.*, 1994; Rele *et al.*, 1996; Schreder *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1997). Bezüglich ausführlicher Beschreibungen von Anwendungsbeispielen sei auf verschiedene Übersichtsartikel verwiesen (Gawronski, 1995; Nakanishi und Berova, 1994). Bezogen auf azyklische Sulfanyl-1-alkanole liefert der aktuelle Stand der Literatur keinen Hinweis auf die Bestimmung der Absolutkonfiguration dieser Verbindungsklasse mittels der CD Exciton Chirality Methode. Es liegt lediglich eine Arbeit der Gruppe um Gawronski vor (Gawronski *et al.*, 1981), in der die Anwendung der „Exciton Chirality“-Methode zur Analytik von zyklischen Sulfanyl-Verbindungen beschrieben wird.

Aus diesem Grund wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine Möglichkeit zur Bestimmung der Stereochemie von azyklischen 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanolen mittels der ECCD-Methode entwickelt. Ausgangspunkt war die Synthese der chiralen Schwefelverbindungen in enantiomerenreiner Form. Dies wurde in Anlehnung an Vorschriften von Pickenhagen und Brönner-Schindler (1984) verwirklicht.

Abbildung 10 zeigt den dreistufigen Syntheseweg zur Darstellung von enantiomerenreinem 3-Sulfanyl-1-hexanol **6** und 2-Sulfanyl-1-hexanol **7**.

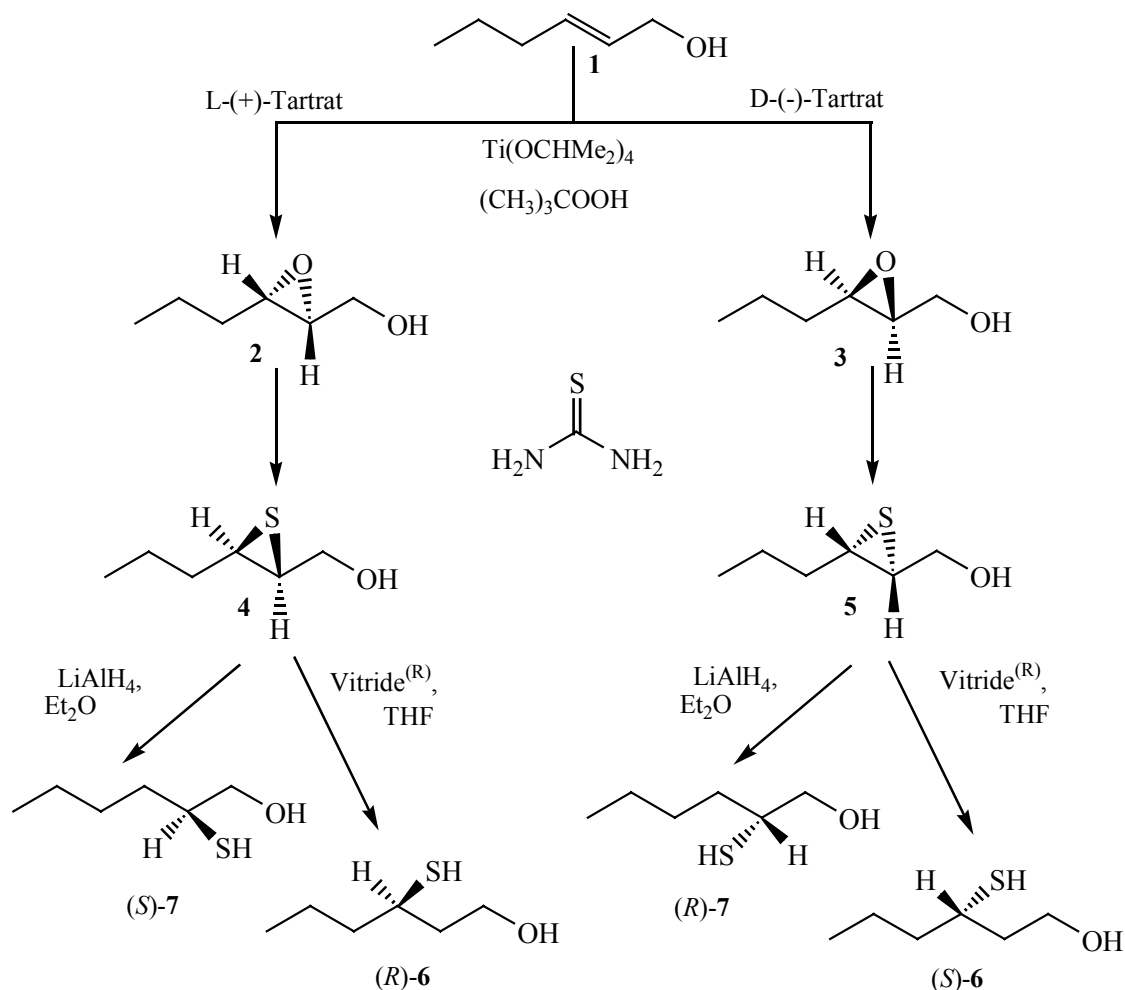


Abb. 10: Syntheseweg zur Darstellung der enantiomerenreinen 2- und 3-Sulfanyl-1-hexanole (*R*)-6, (*S*)-6, (*R*)-7 und (*S*)-7 (nach Pickenhagen und Brönnner-Schindler, 1984).

Durch asymmetrische Epoxidierung wird dabei aus (*E*)-2-Hexen-1-ol unter Sharpless-Bedingungen (Katsuki und Sharpless, 1980) und Verwendung von Diethyl-L-(+)- und Diethyl-D-(-)-tartrat als enantioselektivem Katalysator (*2S,3S*)-2,3-Epoxy-1-hexanol **2** bzw. das entsprechende Enantiomer **3** gebildet. Durch Behandlung der Epoxide **2** und **3** mit Thioharnstoff erhält man infolge eines Sauerstoff-Schwefel-Austauschs unter Walden-Umkehr die entsprechenden Thiirane **4** und **5** mit inverser Konfiguration (Pickenhagen und Brönnner-Schindler, 1984). In Abhängigkeit der Reduktionsbedingungen resultieren dann die entsprechenden 2- bzw. 3-Sulfanyl-1-hexanole **6** [Reduktion von **4** und **5** mit Vitride<sup>®</sup> (Natriumbis(2-methoxyethoxy)aluminiumhydrid) in THF] und **7** (Reduktion von **4** bzw. **5** mit LiAlH<sub>4</sub> in Et<sub>2</sub>O). Die Endprodukte (*S*)-**6**, (*R*)-**6**, (*S*)-**7** und (*R*)-**7** wurden mittels Säulenchromatographie gereinigt. Die Kontrolle der optischen Reinheit erfolgte mittels MDGC-MS (chirale

Säule #5, Temperaturprogramm #6) und durch Vergleich mit Literatur-Drehwerten (Pickenhagen und Brönner-Schindler, 1984).

Da es sich bei dieser Strategie um eine neu entwickelte ECCD Methode handelte, wurden zur Erweiterung der Datenlage die beiden Enantiomere **7** mit in die experimentelle Umsetzung einbezogen. Parallel dazu dienten die (R)- und (S)-Enantiomere von 1,3-Butandiol (**8**) und 1,2-Propandiol (**9**) als S-freie Modellverbindungen für die geplante ECCD-Methode, bei der die genannten Verbindungen mittels entsprechender Chromophore umgesetzt werden sollten.

#### **1.2.4.1.2 Auswahl eines Chromophors und dessen Umsetzung mit den enantiomerenreinen Verbindungen (Ein-Schritt-Derivatisierung)**

Die Anwendung der ECCD-Methode auf azyklische 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanole erfordert zwei Chromophore. Für 1,2- und 1,3-Diole sind Derivatisierungsmethoden beschrieben, bei denen jeweils zwei verschiedene Chromophore selektiv an den unterschiedlichen Hydroxygruppen der Diole eingeführt werden. Beispielfhaft seien hier die Verwendung von 9-Anthroat für die primäre Hydroxygruppe eines Polyols mit einem 1,2-Diol-Terminus und von *p*-Methoxycinnamat (Wiesler und Nakanishi, 1989; Rele *et al.*, 1996) bzw. von 2-Anthroat (Akritopoulou-Zanze *et al.*, 1997) für die sekundäre Hydroxygruppe erwähnt.

Für diese Art der Derivatisierung sind jedoch zwei Synthese- und Reinigungsschritte notwendig. Ziel unserer Modellstudie war es, die azyklischen 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanole in einem Schritt mit zwei Äquivalenten desselben Chromophors umzusetzen. Parallel hierzu sind als etablierte Modellverbindungen 1,3-Butandiol und 1,2-Propandiol eingesetzt worden. Unter Verwendung von Benzoat oder von *p*-substituiertem Benzoat sind solche Ein-Schritt-Umsetzungen bereits für terminale und interne 1,2- und 1,3-Diole beschrieben (Harada *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 1996). In einem anderen Ansatz wird das 2-Anthroat als einziges Chromophor zur Derivatisierung von 1,2-Diolen verwendet; die Autoren beobachteten in diesem Fall für die entsprechenden 1,3-Diole einen sehr schwachen, nicht aussagefähigen und nicht interpretierbaren Cotton Effekt (Akritopoulou-Zanze *et al.*, 1997).

Bei der Wahl des Chromophors ist darauf zu achten, dass die Lage des elektrischen Übergangsmomentes bekannt ist und es einen möglichst hohen Extinktionskoeffizienten besitzt, weil daraus intensive CD-Effekte resultieren. Aus diesen Gründen wurde für die im Rahmen

dieser Arbeit durchgeführte Modellstudie zur Bestimmung der Stereochemie azyklischer 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanole sowie der Modellverbindungen 1,3-Butandiol und 1,2-Propandiol mittels der ECCD Methode nach Derivatisierung mit einem einzigen Chromophor das 9-Anthroat ausgewählt.

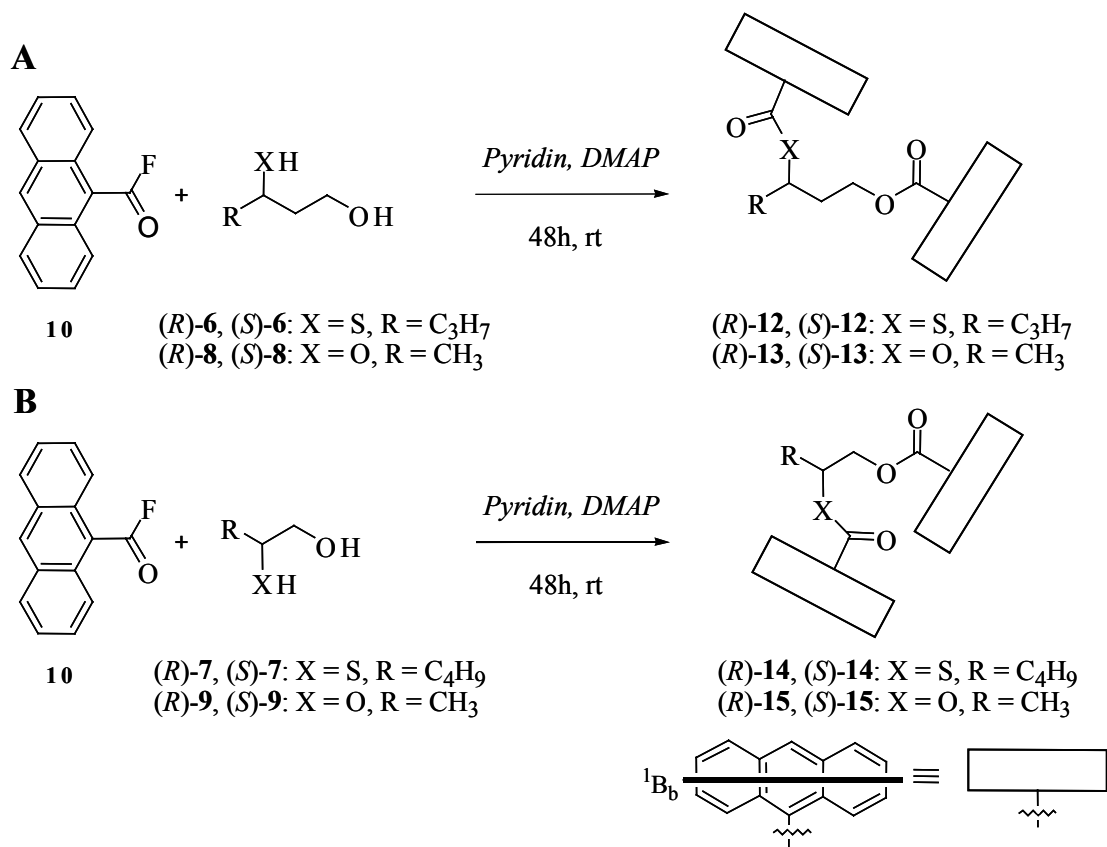


Abb. 11: Schema der Umsetzung der enantiomeren Verbindungen 6-9 mit dem Chromophor 9-Anthroylfluorid (Ein-Schritt-Derivatisierung).

Das in Abbildung 11 aufgeführte Schema zeigt die Umsetzung der enantiomeren Verbindungen mit als Säurefluorid aktiviertem Chromophor (Weckerle *et al.*, 2001b).

In Anlehnung an die oben erwähnten, in der Literatur beschriebenen Zwei-Schritt-Derivatisierungsmethoden wurde zusätzlich für das im Aroma der Rucolablätter nachgewiesene 3-Sulfanyl-1-hexanol eine ECCD Methode entwickelt, bei der als Chromophor 2-Anthroyl- und 9-Anthroylfluorid verwendet wurden. Im ersten Schritt wird hierbei die SH-Gruppe mit 9-Anthroylfluorid (fällt als Nebenprodukt aus der in Abbildung 11 beschriebenen Umsetzung an) umgesetzt; man erhielt  $(R)$ -16 und  $(S)$ -16. In einem zweiten Schritt wurde dann die Hydroxyfunktion mit dem 2-Anthroylfluorid umgesetzt, und man erhielt die bichromophoren Verbindungen  $(R)$ -17 und  $(S)$ -17 (Abbildung 12). Die derivatisierten Verbindungen wurden

schrittweise mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt (Weckerle *et al.*, 2001b).

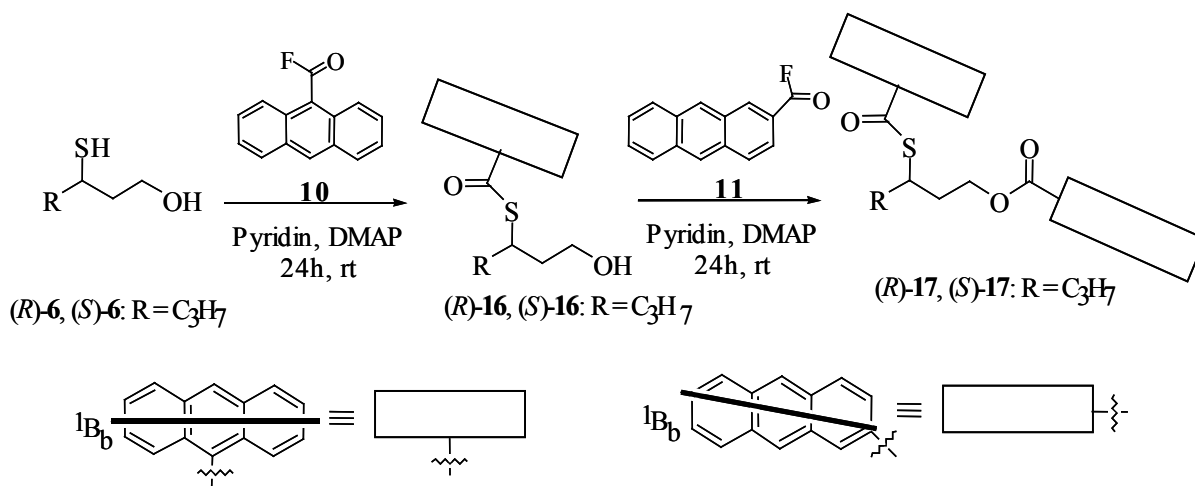


Abb. 12: Schema der Umsetzung der enantiomeren Verbindungen (*R*)-**6** und (*S*)-**6** mit dem Chromophor 9-Anthroylfluorid (erster Schritt) und dem zweiten Chromophor 2-Anthroylfluorid.

#### 1.2.4.1.3 Ergebnisse der CD-Spektroskopie

Die Ergebnisse der UV- und CD-Spektroskopie der bichromophoren Diester von 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**12**, (*S*)-**12** bzw. (*R*)-**17**, (*S*)-**17**, von 1,3-Butandiol (*R*)-**13**, (*S*)-**13**, von 2-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**14**, (*S*)-**14** und von 1,2-Propandiol (*R*)-**15**, (*S*)-**15** sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Abbildung 13 zeigt die graphische Darstellung der UV- und CD-Spektren der bichromophoren Diester von 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**12**, (*S*)-**12** und von 1,3-Butandiol (*R*)-**13**, (*S*)-**13**. Im derivatisierten 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**13** führte die Kopplung der beiden 9-Anthroylreste zu einer negativen Split-CD Kurve mit einem ersten negativen Cotton Effekt (CE) bei 255 nm ( $\Delta\epsilon = -54,8$ ) und einem zweiten positiven CE bei 244 nm ( $\Delta\epsilon = +37,1$ ) mit einer Amplitude von  $A = -91,9$ . Dieser negative CD zeigte, dass die beiden in Längsrichtung verlaufenden elektrischen Übergangsdipolmomente (<sup>1</sup>B<sub>b</sub>-Bande, Abbildung 11) der beiden Chromophoren eine negative Chiralität und eine damit verbundene Orientierung der Chromophoren im Uhrzeigersinn zur Folge hatten. Das entsprechende Enantiomer (*S*)-**12** zeigte ein spiegelbildliches

Verhalten mit einer positiven Split-CD Kurve mit Extrema bei 255 nm ( $\Delta\varepsilon = +63,1$ ) und 244 nm ( $\Delta\varepsilon = -32,4$ ) und einer Amplitude  $A$  von  $+95,5$ .

Tab. 2: UV- und CD-Daten der bichromophoren Diester von 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**12**, (*S*)-**12** bzw. (*R*)-**17**, (*S*)-**17**, von 1,3-Butandiol (*R*)-**13**, (*S*)-**13**, von 2-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**14**, (*S*)-**14** und von 1,2-Propandiol (*R*)-**15**, (*S*)-**15**.

Eintrag	Diester	Cotton Effekt <sup>a</sup>				Amplitude <sup>d</sup>
		$\lambda_{\max}$ [nm]	erster $\Delta\varepsilon$	$\lambda_{\max}$ [nm]	zweiter $\Delta\varepsilon$	A
1	( <i>R</i> )- <b>12</b> <sup>b</sup>	255	-54.8	244	+37.1	-91.9
2	( <i>S</i> )- <b>12</b> <sup>b</sup>	255	+63.1	244	-32.4	+95.5
3	( <i>R</i> )- <b>13</b> <sup>b</sup>	255	-76.5	244	+57.9	-134.4
4	( <i>S</i> )- <b>13</b> <sup>b</sup>	255	+70.3	244	-54.7	+125.0
5	( <i>R</i> )- <b>14</b> <sup>b</sup>	256	+151.3	244	-77.2	+228.5
6	( <i>S</i> )- <b>14</b> <sup>b</sup>	256	-136.0	244	+73.8	-209.8
7	( <i>R</i> )- <b>15</b> <sup>b</sup>	256	+135.5	243	-71.0	+206.5
8	( <i>S</i> )- <b>15</b> <sup>b</sup>	256	-145.0	243	+56.9	-201.9
9	( <i>R</i> )- <b>17</b> <sup>c</sup>	259	+98.3	248	-109.1	+207.4
10	( <i>S</i> )- <b>17</b> <sup>c</sup>	258	-104.0	249	+98.8	-202.8

<sup>a</sup> Die CD-Effekte der Enantiomere sind nicht direkt vergleichbar, da das Ausgangsmaterial nicht 100 % enantiomerenrein war (vgl. C Experimentalteil, 3.1.1.2, ee-Werte von **6** und **7**);

<sup>b</sup> Konzentrationen wurden bestimmt mittels des UV Extinktionskoeffizienten:  $\varepsilon_{253} = 215000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;

<sup>c</sup> Konzentrationen wurden bestimmt mittels des UV Extinktionskoeffizienten:  $\varepsilon_{255} = 186000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;

<sup>d</sup> Amplitude ist der Abstand zwischen Minimum und Maximum einer CD-Kurve, das Vorzeichen entspricht dem Vorzeichen des ersten Cotton Effektes.

Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Derivate von 1,3-Butandiol erhalten. Das (*R*)-konfigurierte zeigte ebenfalls eine negative Split-CD Kurve mit Cotton Effekten bei 255 nm ( $\Delta\varepsilon = -76,5$ ) und 244 nm ( $\Delta\varepsilon = +57,9$ ) und einer Amplitude von  $A = -134,3$ . Das (*S*)-**13** Enantiomer zeigte ein vergleichbar scharfes CD Spektrum mit umgekehrten Vorzeichen der Cotton Effekte bei 255 nm ( $\Delta\varepsilon = +70,3$ ) und 244 nm ( $\Delta\varepsilon = -54,7$ ) und einer Amplitude von  $A = +125,0$ . Der Vergleich der CD Spektren der derivatisierten 3-Sulfanyl-1-hexanole **12** (Abbildung 13A) mit den entsprechenden Spektren des derivatisierten 1,3-Butandiols **13** (Abbildung 13B) ergab, dass in beiden Fällen die (*R*)-konfigurierte Verbindung eine negative Split-CD Kurve und das (*S*)-Enantiomer ein spiegelbildliches, positives Ergebnis zeigte.

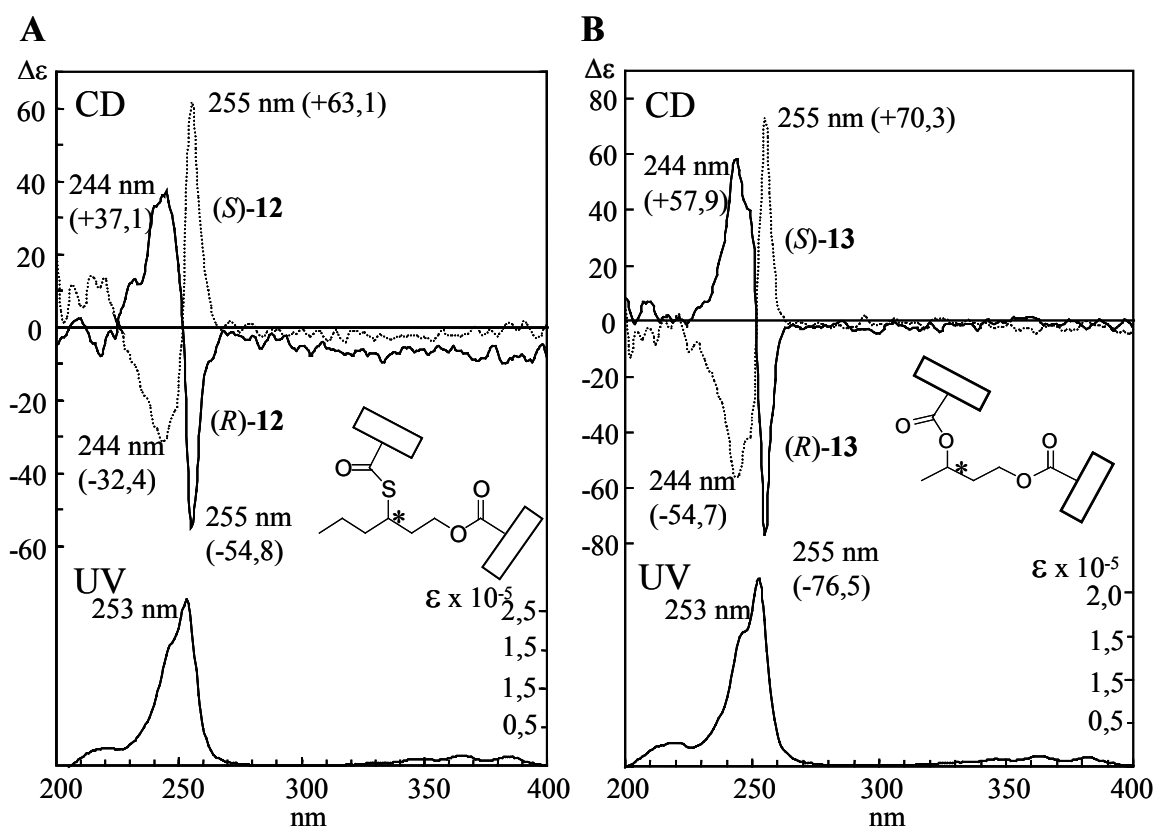


Abb. 13: UV- und CD-Spektren der bichromophoren Diester (je zweimal 9-Anthroylrest) von 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**12**, (*S*)-**12** (A) und von 1,3-Butandiol (*R*)-**13**, (*S*)-**13** (B).

Die UV- und CD-Spektren der bichromophoren Diester von 2-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**14** und (*S*)-**14** und von 1,3-Butandiol (*R*)-**15**, (*S*)-**15** sind in Abbildung 14A und 14B dargestellt. Bei 1-*O*-(9-Anthroyl)-2-*S*-(9-anthroyl)-2(*R*)-sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**14** resultierte die Kopplung zwischen den beiden elektrischen Übergangsdipolmomenten der Chromophoren in einer positiven Split-CD Kurve mit einem ersten Cotton Effekt bei 256 nm ( $\Delta\varepsilon = +151,3$ ) und einem zweiten negativen CE bei 244 nm ( $\Delta\varepsilon = -77,2$ ) und einer Amplitude  $A$  von +228,5. Das Enantiomer (*S*)-**14** zeigte gegensätzliche Cotton-Effekte bei 256 nm ( $\Delta\varepsilon = -136,0$ ) und 244 nm ( $\Delta\varepsilon = +73,8$ ) und einer Amplitude  $A$  von -209,8. Die CD Spektren der entsprechenden derivatisierten Enantiomere der 1,2-Modellverbindung 1,2-Propandiol waren vergleichbar mit einer negativen Split-CD Kurve für das (*S*)-konfigurierte Enantiomer (*S*)-**15** (Amplitude  $A = -201,9$ ) und einer positiven Split-CD Kurve für das (*R*)-konfigurierte Enantiomer (*R*)-**15** ( $A = +206,5$ ). Die absoluten Werte der Amplitude der bichromophoren Derivate **14** und **15** reichten von 201,9 bis 228,5 und waren damit weitaus größer als die Amplituden der bichromophoren Derivate **12** und **13** ( $A = 91,9$  bis 134,4, Tabelle 2). Dies ist durch den kleineren

Abstand zwischen den Chromophoren im Falle der 1,2-funktionalisierten Verbindungen **14** und **15** im Vergleich zum Abstand der Chromophoren im Falle der 1,3-funktionalisierten Verbindungen **12** und **13** zu erklären. Zusätzlich zu diesem Effekt wird die Amplitude vom interchromophoren Winkel der interagierenden Chromophoren beeinflusst. In diesem Falle sind jedoch die interchromophoren Winkel der Verbindungen (*S*)-**12** und (*S*)-**14** nur unwesentlich verschieden ( $30^\circ$  bis  $50^\circ$ ), wie der Abbildung 16A und 16B entnommen werden kann.

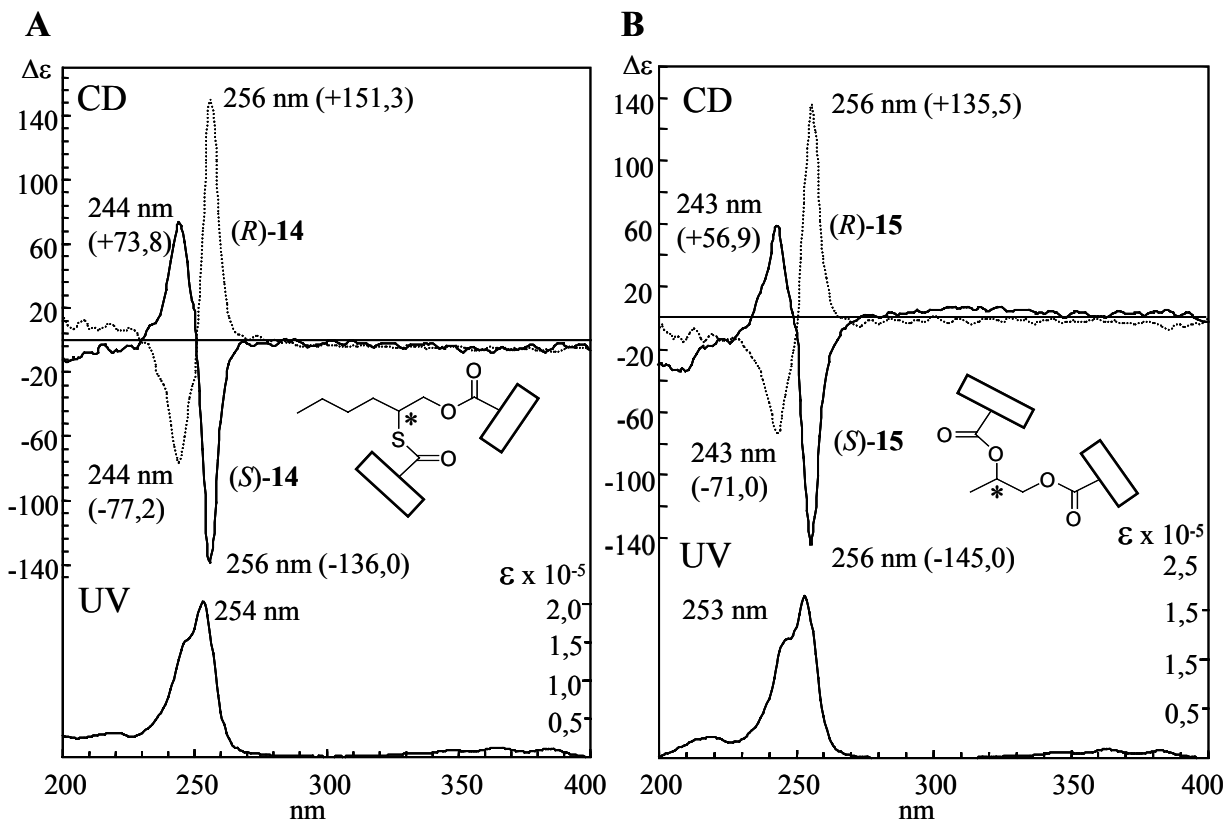


Abb. 14: UV- und CD-Spektren der bichromophoren Diester (je zweimal 9-Anthroylrest) von 2-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**14**, (*S*)-**14** (A) und von 1,2-Propandiol (*R*)-**15**, (*S*)-**15** (B).

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass die Ein-Schritt-Derivatisierung unter Verwendung von 9-Anthroat in Verbindung mit der ECCD-Methode eine allgemeine Mikro-Methode zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von sowohl 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanolen als auch von entsprechenden Dihydroxyverbindungen darstellt. Die Kopplung zwischen den 9-Anthroylresten innerhalb eines bichromophoren Diesters führt zu stark gegensätzlichen Cotton-Effekten, bei denen die absoluten Werte der Amplituden  $A$  zwischen 91,9 und 228,5 liegen. Der bevorzugte Drehsinn zwischen den 9-Anthroat-Chromophoren folgt für beide Serien von Verbindungen dem gleichen CD: (i) im Falle von 3-Sulfanyl-1-hexanol **12** und



1,3-Diol **13** führt die Orientierung gegen den Uhrzeigersinn (negative Chiralität) der Übergangsdipolmomente der beiden Chromophoren zu (*S*)-Konfiguration und vice versa (Abbildung 13), (ii) für 2-Sulfanyl-1-alkanole und 1,2-Diole ist negative Chiralität charakteristisch für (*R*)- und positive Chiralität für (*S*)-konfigurierte Verbindungen (Abbildung 14).

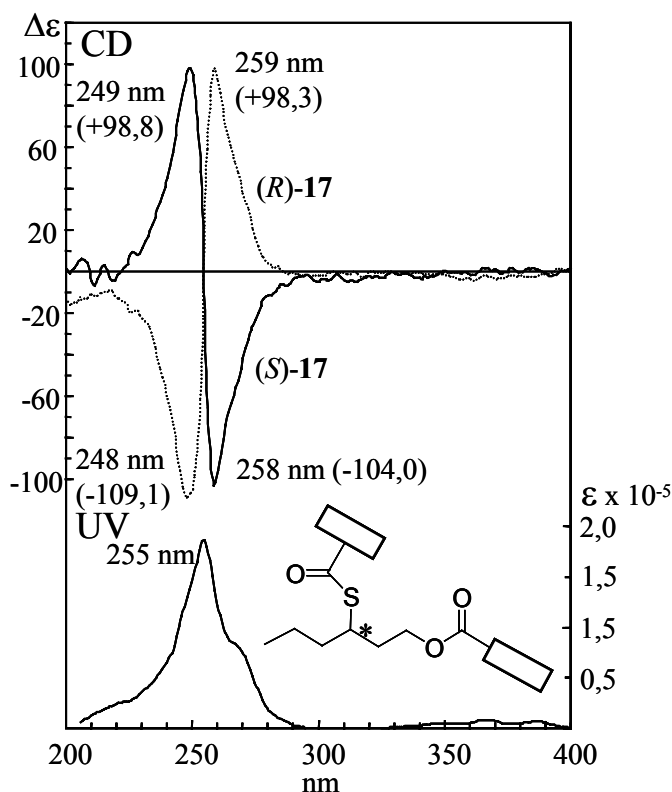


Abb. 15: UV- und CD-Spektren der bichromophoren Diester (einmal 9-Anthroylrest, einmal 2-Anthroylrest) von 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-**17**, (*S*)-**17**.

Wie oben schon erwähnt, wurde für das zentrale 3-Sulfanyl-1-hexanol **6** auch eine ECCD-Methode entwickelt, bei der zwei verschiedene Chromophore Verwendung fanden. Abbildung 15 verdeutlicht graphisch die Darstellung des CD- und UV-Spektrums der bichromophoren Diester (*R*)-**17** und (*S*)-**17**. (*R*)-**17** zeigte eine positive Split-CD-Kurve mit einem positiven ersten Cotton-Effekt bei 259 nm ( $\Delta\epsilon = +98,3$ ) und einem negativen CE bei 248 nm ( $\Delta\epsilon = -109,1$ ) und einer Amplitude von  $A = +207,4$ . Das Enantiomer (*S*)-**17** ergab entsprechende spiegelbildliche Werte mit Extrema bei 258 nm ( $\Delta\epsilon = -104,0$ ) und 249 nm ( $\Delta\epsilon = +98,8$ ) und einer Amplitude  $A$  von  $-202,8$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass auch diese Art der Derivatisierung eine Zuordnung der Stereochemie von 3-Sulfanyl-1-hexanol **6** und ähnlichen Verbindungen ermöglicht. Auffällig war,

dass die CD Effekte von **17** sich spiegelbildlich zu denen von **12** verhielten; dies stand jedoch in Übereinstimmung mit den mittels Computersimulation (MacroModel 5.0) ermittelten Konformationsberechnungen. Die energetisch möglichst niedrige Konformation von (*S*)-**12**, die durch lokale Energieminimierung und Monte Carlo Konformationsuche erhalten wurde, zeigte, dass die Orientierung zwischen den Übergangsdipolmomenten im Uhrzeigersinn (positive Chiralität) mit einem interchromophoren Winkel von ungefähr  $30^\circ$  (Abbildung 16A) verläuft. Dies stimmte mit den erhaltenen positiven CD Kopplungen für (*S*)-**12** mit einem positiven ersten CE bei 255 nm überein (Abbildung 13A, Tabelle 2). Bei (*S*)-**17** legte das in Längsrichtung verlaufende Übergangsdipolmoment der 2- und 9-Anthroylreste eine negative Chiralität fest (Orientierung gegen den Uhrzeigersinn, interchromophorer Winkel ca.  $100^\circ$ ; Abbildung 16C), was zu einer negativen experimentellen CD-Kopplung führte.

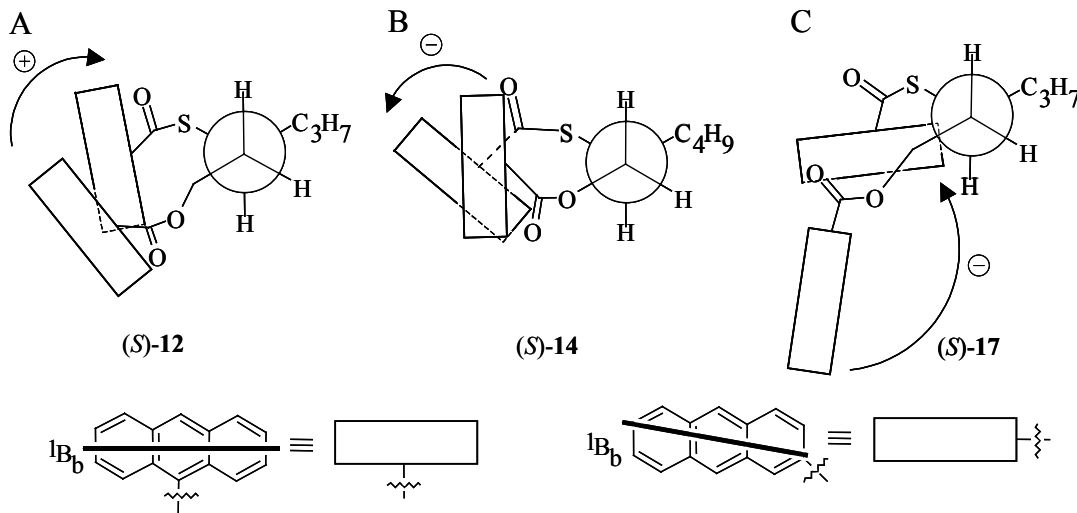


Abb. 16: Bevorzugte Konformationen und vorhergesagte Vorzeichen der jeweils ersten Cotton-Effekte von (*S*)-**12**, (*S*)-**14** und (*S*)-**17**, ermittelt durch Computerberechnungen mit MacroModel 5.0 (fett gedruckte Linien verdeutlichen die Lage der Übergangsdipolmomente).

Die bisher aufgeführten Daten bezüglich der CD-Spektren beziehen sich auf Messungen in Acetonitril. Zusätzlich wurden alle Messungen auch in Hexan als unpolarem Lösungsmittel durchgeführt. In Hexan waren die CD Kurven prinzipiell die gleichen, die Werte der Amplituden waren jedoch im Vergleich zu den Messungen in Acetonitril weitaus kleiner (z.B. (*S*)-**12** erzeugte in Acetonitril eine Amplitude von  $A = +95,5$ , in Hexan dagegen eine von  $A = +40,7$ ). Die bevorzugte Konformation aller in den Abbildungen 13 bis 15 dargestellten bichromophoren Diester wurden somit durch die Polarität des verwendeten Acetonitrils stabilisiert.

### 1.2.4.2 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von 3-Sulfanyl-1-hexanol mittels Multidimensionaler Gaschromatographie–Massenspektrometrie (MDGC-MS)

Für racemisches 3-Sulfanyl-1-hexanol sind Wahrnehmungsschwellenwerte von 17 ng/l in Wasser und 60 ng/l in wässrigem Alkohol bestimmt worden (Tominaga *et al.*, 1998). Beide Enantiomere besitzen intensive Geruchsnoten, das (*S*)-Enantiomer tendiert dabei eher zu einem tropisch-fruchtigen, das (*R*)-Enantiomer zu einem kräuterartigen Geruch (Heusinger und Mosandl, 1984). Aus diesem Grund spielt nicht nur die Entwicklung von Möglichkeiten zur Bestimmung der Absolutkonfiguration (Weckerle *et al.*, 2001b), sondern auch die Ermittlung des Verhältnisses der in einem Aroma enthaltenen Enantiomere solcher chiraler schwefelhaltiger Aromastoffe eine wichtige Rolle.

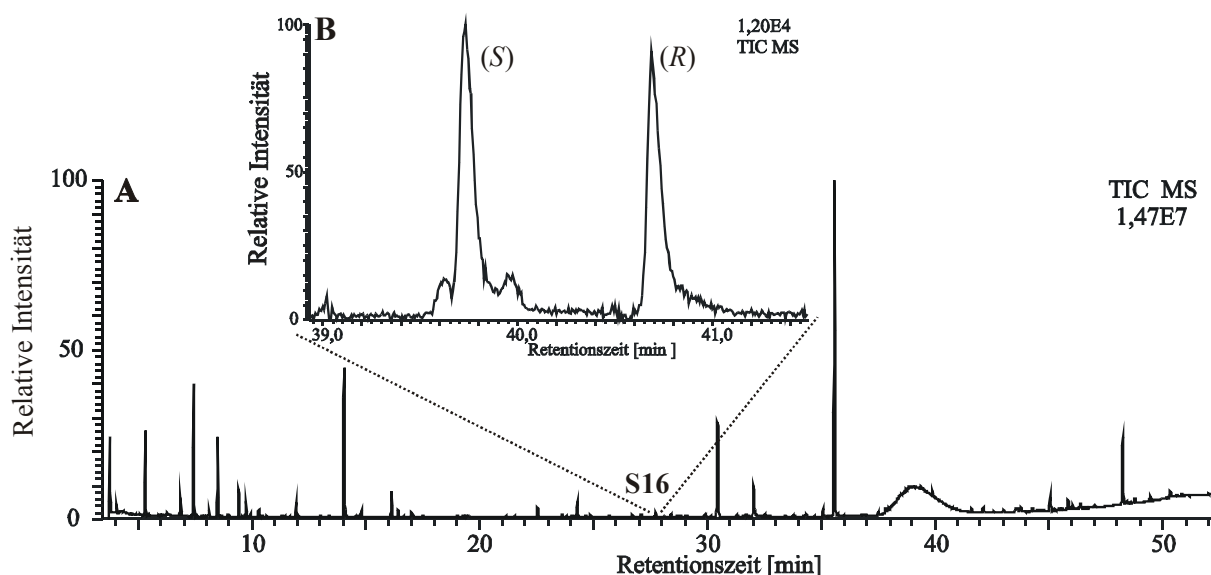


Abb. 17: Ermittlung des Enantiomerenverhältnisses des im Aromaextrakt aus Rucolablättern enthaltenen 3-Sulfanyl-1-hexanols; A: HRGC-MS Chromatogramm des Extraktes, B: Chromatogramm der MS-Detektion der Eluenten der Hauptsäule der MDGC (Säule # 5, Temperaturprogramm #6).

Das Enantiomerenverhältnis von 3-Sulfanyl-1-hexanol in den Aromaextrakten aus Rucolablättern wurde mittels MDGC-MS bestimmt (Abbildung 17). Die Elutionsreihenfolge der beiden Enantiomere von 3-Sulfanyl-1-hexanol (*R*)-6 und (*S*)-6 wurde anhand der enantiomerenrein synthetisierten Referenzen ermittelt; das Enantiomerenverhältnis von 6 im Saft von Rucola wurde aus dem Verhältnis der Peakflächen ermittelt, es ergab sich ein Wert von 44 % (*R*)-6 zu 56 % (*S*)-6. Damit ist ein nahezu racemisches Gemisch ermittelt worden. Weber

stellte in seinen 1996 durchgeführten Untersuchungen an Passionsfrüchten einen Anteil von 58-78 % (*S*)-**6** in Abhängigkeit vom untersuchten Teil der Frucht fest. Solange die Biosynthesewege von **6** nicht bekannt sind, erübrigt sich eine Diskussion dieses Ergebnisses, das aufgrund der geringen Selektivität überrascht. In pflanzlichen Geweben finden sich bekanntlich meist definierte Enantiomerenverhältnisse mit überwiegend hohen Selektivitäten (Mosandl, 1998).

### **1.2.5 Isolierung und Identifizierung der unbekanntem schwefelhaltigen Aromakomponente S24 aus Rucolablättern**

#### **1.2.5.1 Analytik der unbekanntem Verbindung S24 mittels „on-column“-Injektion**

Um vor der Isolierung der Verbindung **S24** zu klären, dass es sich nicht um ein Artefakt der durchgeführten HRGC-MS-Analytik handelte – eventuell durch die Temperatur im Split-/Splitless-Injektionssystem (Temperatur 220°C) entstanden – wurde die Probe zusätzlich mittels „on-column“-Injektion und anschließender HRGC-MS-Analytik untersucht. Bei einer „on-column“-Injektion wird die Probe direkt mittels einer speziellen Kanüle und einem Einführsystem in die GC-Kapillarsäule überführt. Die Verdampfung des Lösungsmittels und der darin enthaltenen Analyten vollzieht sich dann durch das Temperaturprogramm des GC-Ofens; Peaks von Verbindungen, die in den ersten Minuten der Analyse eluieren, können dadurch etwas an Schärfe verlieren. Der große Vorteil dieser Technik jedoch liegt in der schonenden Behandlung der Analyten. Jede Verbindung dampft bei Erreichen ihres spezifischen Siedepunktes ab, Abbau- oder Umlagerungsreaktionen durch (überhöhten) Temperatureinfluss werden so vermieden.

In Abbildung 18 ist das Ergebnis dieser Untersuchung (Teilbild **B**) im Vergleich zur Analytik mittels Split-Injektion (Teilbild **A**) graphisch dargestellt; der Elutionsbereich der Verbindung **S24** wurde zur Verdeutlichung vergrößert.

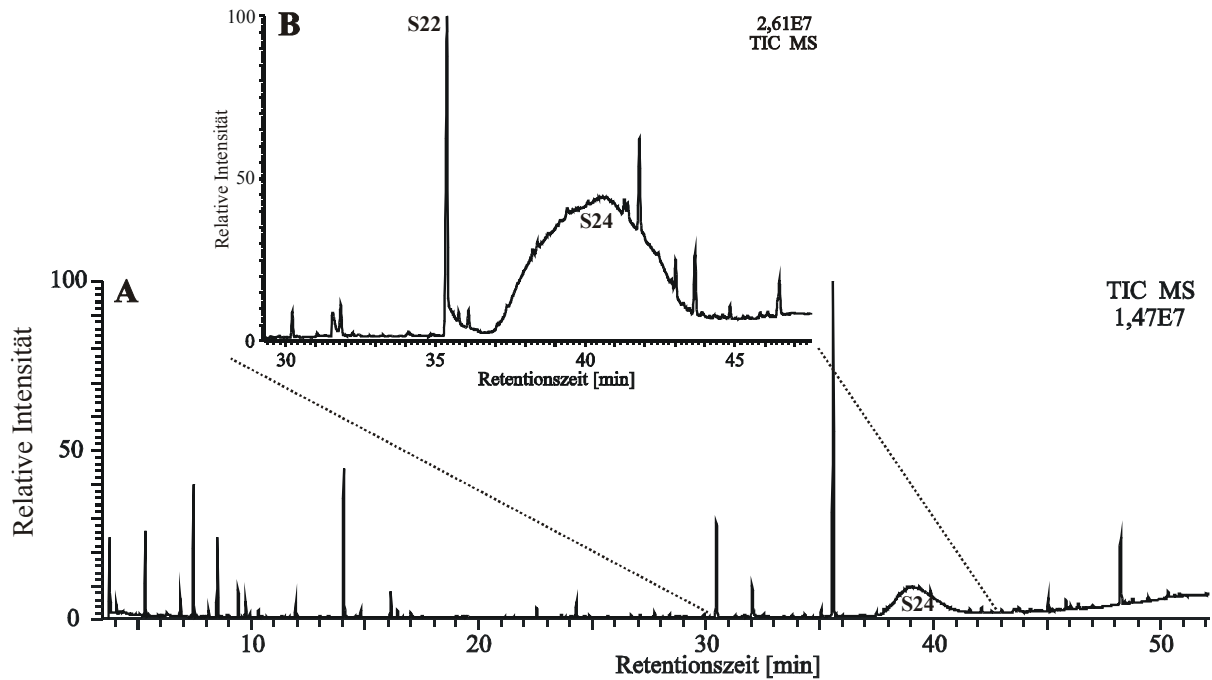


Abb. 18: HRGC-MS-Analytik des XAD-Ethereluates aus Rucolablätter-Presssaft (Trennsäule #1, Temperaturprogramm #1); **A**: MS-Chromatogramm, aufgenommen mit Split-Injektion (Injektortemperatur 220°C, #1), **B**: Ausschnitt 30-47 min aus dem MS-Chromatogramm, aufgenommen mit on-column-Injektion (Injektor #2 ohne eigene Temperierung, Injektion direkt in die Kapillarsäule).

Wie der Vergleich der beiden in Abbildung 18 aufgeführten Teilbilder **A** und **B** zeigt, eluieren die Verbindungen **S22** und **S24** unabhängig von der Art der Injektion zur gleichen Zeit, auch die verbreiterte Peakform der Verbindung **S24** war in beiden Fällen zu beobachten. Als Schlussfolgerung ergab sich, dass die Verbindung **S24** nicht als Artefakt der durchgeführten Analytik per Split-Injektion anzusehen war, sondern in dieser Form im Aromaextrakt vorliegen musste.

### 1.2.5.2 Isolierung der unbekanntnen Verbindung S24

Zur Reinigung der Verbindung **S24** aus dem Aromaextrakt wurde eine größere Menge an Rucolablättern aufgearbeitet und nach XAD-Adsorption mittels Diethylether extrahiert. Die Reinigung erfolgte an einer Mikro-Kieselgelsäule mit einem Pentan-Diethylether-Gradienten und anschließender präparativer Dünnschichtchromatographie (Abbildung 19). Das chromatographische Verhalten - die Komponente **S24** eluierte erst mit Methanol von der Kieselgel-

säule – wies auf eine polare Struktur hin. Insgesamt wurden so 5,4 mg in kristalliner Form isoliert.

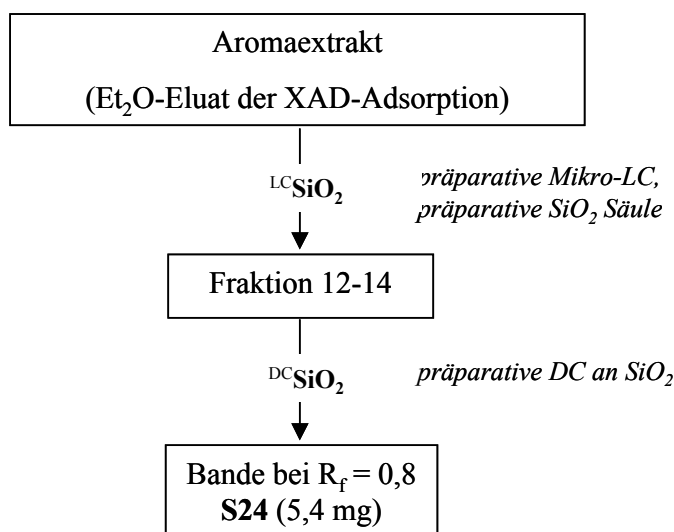


Abb. 19: Schema zur Reinigung der unbekanntes schwefelhaltigen Verbindung **S24**.

### 1.2.5.3 Strukturaufklärung der unbekanntes Verbindung **S24**

Zur Strukturaufklärung der unbekanntes schwefelhaltigen Verbindungen **S24** dienten ein- und zweidimensionale NMR-Spektren und die Untersuchung der Probensubstanz mittels hochauflösender Massenspektrometrie sowie der Vergleich der erhaltenen Daten mit denen eines synthetisierten Strukturanalogons.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **S24** sind fünf Signale detektiert worden, die sich aufgrund von DEPT-Messungen vier sekundären (27,5, 27,9, 35,5 und 48,0 ppm) und einem quartären Kohlenstoffatom (203,7 ppm) zuordnen ließen. Die extrem hohe Tieffeldverschiebung des quartären C-Atoms deutete auf die Nachbarschaft mehrerer Heteroatome hin. Die Struktur eines Thiocyanates oder Isothiocyanates wurde an dieser Stelle ausgeschlossen, da die C-Atome der funktionellen Gruppe dieser Stoffklassen  $^{13}\text{C}$ -Signale im Bereich von 120-140 ppm zeigen (Breitmaier, 1993). Des Weiteren wurden in HMBC-Messungen jeweils Kreuzsignale zwischen den Protonen der beiden sekundären C-Atome bei 35,5 und 48,0 ppm und dem quartären C-Atom detektiert. Aus H,H-COSY- und HMQC-Messungen ergab sich die Anordnung der sekundären C-Atome in der Reihenfolge 35,5 – 27,9 - 27,5 - 48,0 ppm. Durch Hinweise aus dem bei den HRGC-MS-Messungen erhaltenen Massenspektrum der

Verbindung **S24** auf einen Molekülionenpeak mit  $m/z$  147,0 wurde die exakte Masse der Unbekannten mit 147,0178 bestimmt; dies entspricht der Summenformel  $C_5H_9NS_2$ . Aus den erhaltenen Daten wurde für die Verbindung **S24** die in Abbildung 20A dargestellte Struktur von [1,3]-Thiazepan-2-thion ermittelt. Das Vorliegen der Thionfunktion ( $^{13}C$ -Signal von C-2 bei 203,7 ppm) sowie der Aminfunktion ( $^1H$ -Signal des N-H Protons bei 8,33 ppm) wurde durch den Vergleich mit Literaturdaten (Friebolin, 1999; Li und Ohtani, 1997) bestätigt. Zusätzlich wurden die Messergebnisse mit entsprechenden Daten des synthetisierten Struktur-analogons [1,3]-Thiazinan-2-thion verglichen (Abbildung 20B).

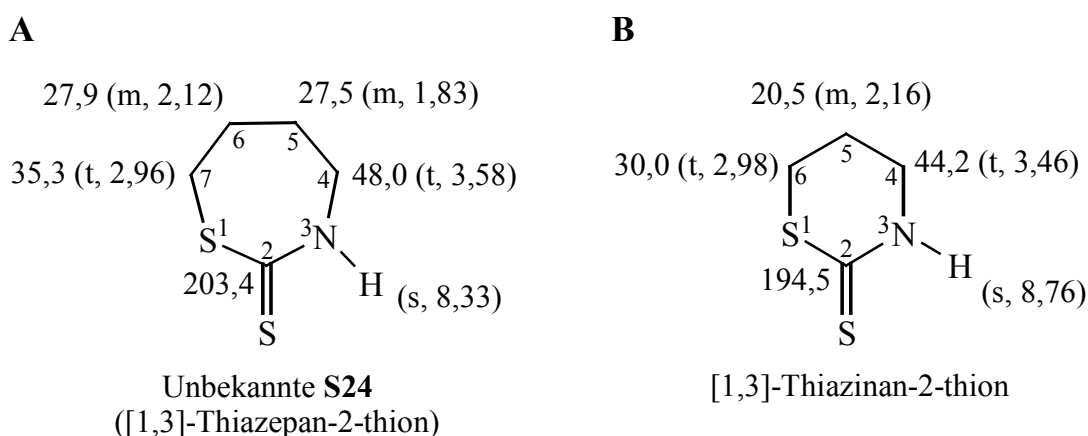


Abb. 20: NMR-Daten der Unbekannten **S24** (= [1,3]-Thiazepan-2-thion; **A**) und des synthetisierten Analogons [1,3]-Thiazinan-2-thions (**B**); Ergebnisse der  $^{13}C$ -NMR- und der  $^1H$ -NMR-Messungen in Klammern (mit Signaltyp) in ppm.

Das isolierte [1,3]-Thiazepan-2-thion wurde im Rahmen unserer Untersuchungen erstmals beschrieben. Wenngleich 4-Methylthiobutylglucosinolat formal, d.h. nach Abspaltung der Methylgruppe, als Vorläufer von **S24** betrachtet werden kann, war es mit unserer Versuchsanordnung allerdings nicht möglich, festzustellen, ob das [1,3]-Thiazepan-2-thion als direktes Spaltprodukt aus Glucoerucin durch Myrosinasehydrolyse hervorgeht. Einen deutlichen Hinweis auf die Abspaltung der Methylgruppe erhält man aufgrund eines bereits beschriebenen Abbauproduktes des Glucoerucins aus Rucola. Es handelt sich dabei um das von Cerny *et al.* (1996) in vergleichsweise großer Menge gefundene Bis-(4-isothiocyanatobutyl)-disulfid. Die Autoren beschrieben als präparativ nicht fassbares Intermediat 4-Sulfanyl-butylisothiocyanat  $[H-S-(CH_2)_4-N=C=S]$ , das in entsprechenden Experimenten durch milde Oxidation in das Disulfid überführbar war (Cerny *et al.*, 1996). Bei unseren Studien konnten wir 4-Sulfanyl-butylisothiocyanat nicht nachweisen; im Gegensatz zu den Angaben von Cerny *et al.* trat das Dimere nur als Spurenkomponente auf, wodurch die oben genannte Hypothese zur Bildung der zyklischen Verbindung **S24** gestützt wird.

### 1.3 Analytik von glykosidisch gebundenen Flavonoiden

Gemäß der einleitend erläuterten Strategie wurden im Folgenden mit Rucola weitere Studien durchgeführt, die auf die Analytik von (glykosidisch gebundenen) Flavonoiden als potentiell „bioaktiv“ wirksame Verbindungen ausgerichtet waren. Glucosinolate (als weitere „funktionelle“ Inhaltsstoffe) sind in Rucola bereits ausführlich untersucht worden, so dass dieser Stoffklasse bei den nachfolgend aufgeführten Untersuchungen keine weitere Aufmerksamkeit gewidmet worden ist.

#### 1.3.1 Allgemeines zu (glykosidisch gebundenen) Flavonoiden

Flavonoide und ihre glykosidisch gebundenen Derivate kommen in Blütenblättern und Früchten sowie in den grünen Bestandteilen von Pflanzen (v.a. Blätter) vor.

Tab. 3: Extrema der UV-Spektren einiger (glykosidisch gebundener) Flavonoide (Literatur siehe Bezifferung und Fußnoten).

Flavonoid	Maximum 1	Maximum 2
Quercetin <sup>1</sup>	253 nm	367 nm
Kaempferol <sup>1</sup>	262 nm	367 nm
Apigenin <sup>1</sup>	265 nm	335 nm
Quercetin-glykosid <sup>1,2</sup>	255 nm	357 nm
Kaempferol-glykosid <sup>1,2</sup>	262 nm	348 nm
Rutin <sup>3</sup>	259 nm	355 nm
Isoquercitrin <sup>3</sup>	259 nm	355 nm
Kaempferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-[2- <i>E</i> -caffeoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)glucopyranosid]-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid <sup>4</sup>	268 nm	230 nm
Quercetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-[2- <i>E</i> -feruloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)glucopyranosid]-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid <sup>4</sup>	253 nm (+ Schulter bei 268 und 290 nm)	237 nm

<sup>1</sup> nach Escarpa und González (2000); <sup>2</sup> Struktur des Glykosides nicht näher definiert; <sup>3</sup> nach Brolis *et al.* (1998); <sup>4</sup> nach Nielsen *et al.* (1993).



Die Flavonoide lassen sich je nach Struktur des heterocyclischen Ringes C in verschiedene Klassen einteilen (Abbildung 21). Die gezeigten Grundstrukturen der einzelnen Klassen von Flavonoiden ermöglichen v.a. durch die unterschiedlichen Substitutionsmuster an den aromatischen Ringen **A** und **B** eine Vielzahl an Strukturen, die ihrerseits für die charakteristischen UV-Spektren von Flavonoiden verantwortlich sind (Tabelle 3). Strukturabhängig ergeben sich auch Unterschiede im Hinblick auf die Lokalisierung der Verbindungen innerhalb der Kompartimente einer Pflanze. Beim grünen Blatt beispielsweise befinden sich die freien Flavonoide überwiegend in den äußeren Schichten der Blattoberfläche, während ihre glykosidisch gebundenen Derivate meist in den Vakuolen und epidermalen Gewebeschichten vorkommen.

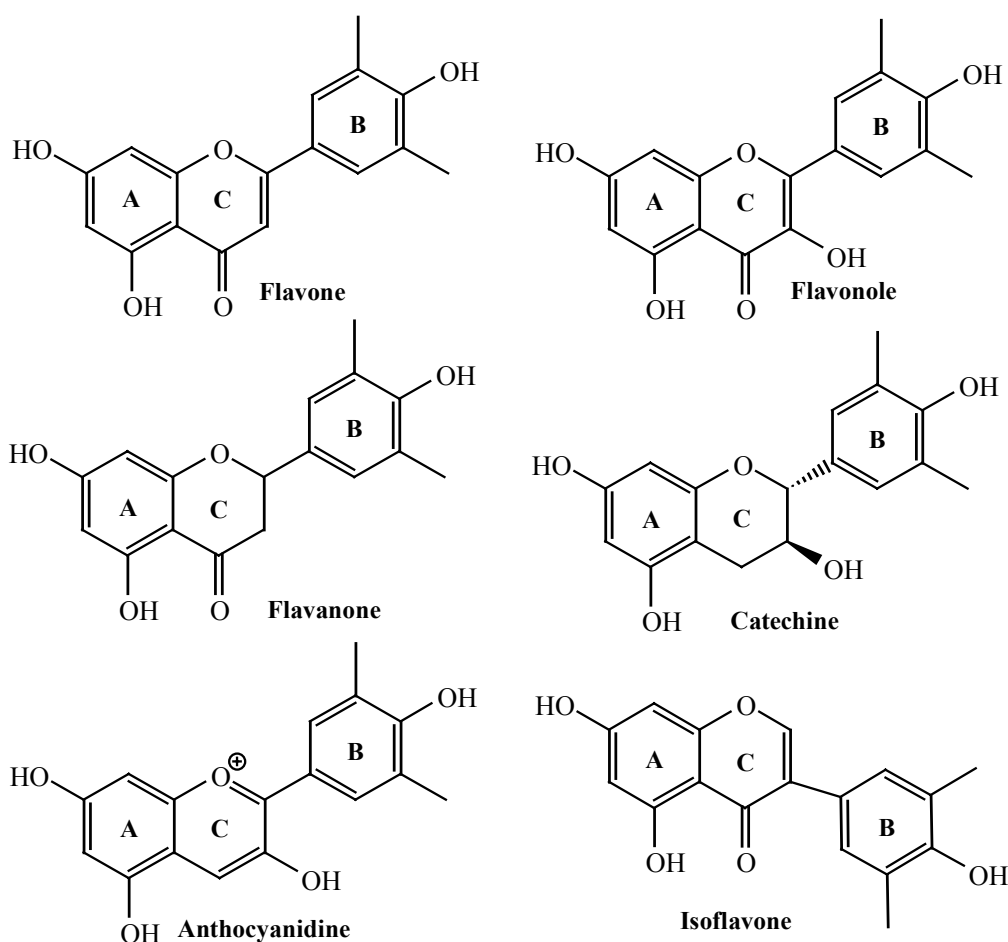


Abb. 21: Klassifizierung von Flavonoiden in Abhängigkeit der Struktur des heterocyclischen C-Ringes (nach Formica und Regelson, 1995).

Flavonoide stellen heute den Ausgangspunkt für verschiedene wissenschaftliche Forschungsrichtungen dar (Harborne und Williams, 2000). Diese setzen dabei hauptsächlich an folgenden Kriterien an (im Folgenden wird unspezifisch nur von Flavonoiden gesprochen, der Begriff soll hier freie und glykosidisch gebundene Verbindungen umfassen):

### *Schutz vor UV-B-Strahlung in Pflanzen*

Ultraviolette Strahlung wird in drei Banden mit verschiedenen Energieniveaus und daraus resultierender unterschiedlicher ökologischer Bedeutung eingeteilt, wobei die UV-B-Strahlung mit einer Bandbreite von 280-315 nm von besonderer Bedeutung ist. Schutz gegen diese Art von Strahlung spielt für Pflanzen, die dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, eine wichtige Rolle. Neben anderen Faktoren könnte der Flavonoidgehalt in den Blättern durch die Fähigkeit dieser Verbindungen, Licht in einem Bereich von 280-320 nm zu adsorbieren, dazu beitragen, als UV-Filter zu wirken und beispielsweise die photosynthetisch aktiven Gewebeschichten zu schützen. So hat man gezeigt, dass unter erhöhter UV-B-Einstrahlung der Gehalt an Flavonoiden in bestimmten Kompartimenten von Pflanzen signifikant zunahm (Skaltsa *et al.*, 1994; Ormrod *et al.*, 1995; Reuber *et al.*, 1996).

### *Antimikrobielle Eigenschaften*

Die Fähigkeit bestimmter Flavonoide als sog. Phytoalexine zu fungieren, wird von Pflanzen zur Verhinderung des Wachstums pathogener Keime (z.B. *Botrytis*-Arten, verschiedene Stämme von *Staphylococcus*) ausgenutzt. Man hat gezeigt, dass es bei einem mikrobiellen Angriff auf Pflanzen zur Akkumulation bestimmter Flavonoide kommen kann. Darüber hinaus wird dementsprechend derzeit auch die Verwendung von Flavonoiden zur Bekämpfung fungaler und viraler Keime beim Menschen diskutiert (Grayer und Harborne, 1994; Haraguchi *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Stevenson und Haware, 1999).

### *Interaktionen zwischen Pflanze und Tier*

Neben anderen pflanzlichen Polyphenolen spielen Flavonoide eine wichtige Rolle beim Schutz von Pflanzen vor Insekten. Auch in diesem Bereich ist gezeigt worden, dass einerseits bestimmte Pflanzen bei Angriffen von Insekten mit einer erhöhten Produktion von Flavonoiden reagieren und andererseits auch Insekten bzw. deren Larven (in bestimmten Entwicklungsstadien) den Verzehr von Blättern aufgrund ihres Gehaltes an gewissen Flavonoiden vermeiden (Beninger und Abou-Zaid, 1997; Dillon *et al.*, 1997). In einigen Fällen sind Insekten allerdings auch auf die Zufuhr bestimmter Flavonoide mit der Nahrung angewiesen. So nutzt z.B. das männliche adulte Tier des Monarchschmetterlings (*Danaus plexippus*) die Flavonoide aus *Asclepias*-Arten als „attractant“ für seinen Sexualpartner (Haribal und Renwick, 1996).

*Funktionalität im medizinischen und ernährungswissenschaftlichen Bereich*

Im ernährungswissenschaftlich-medizinischen Bereich hat man damit begonnen, Flavonoide hinsichtlich ihrer antioxidativen, Enzym-hemmenden, entzündungshemmenden und antitumoralen Eigenschaften zu studieren sowie ihre hormonell wirksame, antibakterielle, antimutagene und anxiolytische Aktivität zu untersuchen. Auf einschlägige Literatur zu diesen Bereichen sei – ohne Anspruch auf Vollständigkeit - verwiesen (Dziedzic und Hudson, 1983; Frankel *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1993; Tournaire *et al.*, 1993; Hodnick *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1995; Jankun *et al.*, 1997; Mata *et al.*, 1997; Kitayoka *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Miyase *et al.*, 1999a).

Flavonoide sind als polyphenolische Verbindungen in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs weit verbreitet. Bisher wurden über 4000 solcher Verbindungen in Pflanzen der verschiedensten Familien beschrieben (Middleton und Kandaswami, 1994). Eine Aussage über die täglich mit der Nahrung aufgenommene Menge an Flavonoiden ist schwierig, da die Daten über Flavonoid-Gehalte in pflanzlichen Lebensmitteln noch begrenzt sind. Vorläufige Schätzungen belaufen sich von 23 mg/Tag (Hollman und Katan, 1999) – berechnet als Summe der Aglykone Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Luteolin und Apigenin – bis zu 115 mg/Tag (Kühnau, 1974). Für die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden und deren Glykoside ist jedoch nicht nur die absolut aufgenommene Menge von Bedeutung, entscheidend ist letztlich, ob und zu welchem Prozentsatz die Verbindungen resorbiert werden können. Ging man in der Vergangenheit davon aus, dass hierzu nur die Aglykone in Frage kommen (Kühnau, 1974), so belegen aktuelle Untersuchungen, dass auch glykosidisch gebundene Formen – in Abhängigkeit des Substitutionsmusters und der Struktur der Zuckeruntereinheit(en) in unterschiedlichen Mengen – nach entsprechender Hydrolyse resorbiert werden (Hollman *et al.*, 1995; Hollman *et al.*, 1997).

Eine essentielle Grundlage für derartige Untersuchungen stellt die Isolierung und Charakterisierung von (glykosidisch gebundenen) Flavonoiden aus dem entsprechenden pflanzlichen Material dar. Bezüglich Rucola liegen erste Informationen zum Flavonoidgehalt von Rahman *et al.* vor; die Identifizierung von Isorhamnetin-3-glucosid aus Rucolablättern stammt bereits aus dem Jahr 1969.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Blätter von Rucola auf ihren Gehalt an weiteren Flavonoiden und/oder deren Glykoside untersucht. Dabei kamen sowohl für die Aufarbeitung als auch für die Isolierung und spektroskopische Charakterisierung einschlägige Metho-

den der Flavonoidanalytik (HPLC-UV/ELSD, HPLC-MS/MS, ein- und zweidimensionale NMR-Techniken) zum Einsatz. Der Darstellung der bei unseren Studien erhaltenen Ergebnisse ist eine kurze Erläuterung der instrumentell-analytischen Grundlagen vorangestellt.

### 1.3.2 Instrumentell-analytische Grundlagen

#### *Übersicht*

Grundsätzlich bietet sich für die Isolierung, Reinigung und Charakterisierung glykosidisch gebundener Flavonoide die gleiche Vorgehensweise an, wie sie in den Abschnitten 2.2.2 und 2.2.3 (Teil B, Ergebnisse und Diskussion) näher erläutert wird. Unterschiede treten v.a. aufgrund unterschiedlicher chromatographischer Eigenschaften sowohl der Flavonoid-Konjugate als auch der freien Flavonoide auf. So können die Aglykone von Aromastoff-Prekursoren üblicherweise mittels Gaschromatographie untersucht werden; bei den Flavonoid-Konjugaten sind die Aglykone aufgrund ihrer Molekularmasse, Polarität und geringen Flüchtigkeit nur mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) analysierbar. Lassen sich Aromastoffkonjugate sowohl direkt via HPLC als auch teilweise nach geeigneter Derivatisierung mittels Gaschromatographie analysieren, so kommt auch hier für Flavonoid-Glykoside nur die Hochleistungsflüssigchromatographie in Betracht.

Flavonoide besitzen aufgrund ihrer Struktur charakteristische UV-Spektren, die teilweise sogar eine Einordnung dieser Verbindungen in die verschiedenen Klassen (Flavone, Flavonole, Flavanone, Isoflavone, Catechine, Anthocyanidine) erlauben. Deswegen stellt die Kopplung der HPLC an einen Photo-Diodenarray-Detektor eine ideale Möglichkeit dar, schon bei Screeninguntersuchungen von Rohextrakten die via HPLC chromatographisch getrennten Verbindungen mit einem UV-Spektrum zu korrelieren und so potentiell in der (komplexen) Mischung vorhandene Flavonoide herauszufiltern (Nogata *et al.*, 1994; Escarpa und González, 2000; Mattila *et al.*, 2000; Weckerle *et al.*, 2001a). Die massenspektrometrische Charakterisierung von Flavonoid-Glykosiden konzentriert sich auf die Möglichkeiten der Kopplung der HPLC mit der (Tandem-) Massenspektrometrie. Die Funktionsweise und die Anwendungsmöglichkeiten der HPLC-MS/MS werden im nächsten Abschnitt näher erläutert, die Möglichkeiten der Kernresonanzspektroskopie (NMR) zur Strukturaufklärung von Naturstoffen werden im Kapitel 2.2.2 (Teil B, Ergebnisse und Diskussion) dargestellt.

*Strukturaufklärung und Charakterisierung*

Für die Untersuchung polarer nichtflüchtiger Moleküle, die als Mischung in einer wässrigen Matrix vorliegen (z.B. Naturstoffextrakte), stellt die Kopplung der HPLC mit der Massenspektrometrie ein ideales analytisches Werkzeug dar. Seit mehr als 20 Jahren hat man deshalb Techniken entwickelt und optimiert, die eine direkte Kopplung der HPLC an die Massenspektrometrie (HPLC-MS) ermöglichen. Das für diese Kombination notwendige Kopplungsteil muss in der Lage sein, (i) die in der flüssigen Phase des Eluenten solvatisierten Analytenmoleküle nahezu gleichzeitig vom Lösungsmittel zu befreien, (ii) die Analytenmoleküle effektiv in die Gasphase zu überführen und sie für die Detektion zu ionisieren und (iii) das Hochvakuum, das auf der Seite des massenspektrometrischen Detektors anliegt, aufrecht zu erhalten. Die Entwicklung einer derartigen Kopplung führte über das „moving belt“-Interface (McFadden *et al.*, 1976) und das „direct liquid introduction“-Interface (Henion, 1978; Apffel *et al.* 1983) zu „particle beam“-Ionisierung (Willoughby und Browner, 1984) und „thermospray“-Ionisierung (Blakely *et al.*, 1980) Anfang der achtziger Jahre schließlich hat man eine Strategie entwickelt, bei der die Ionisierung unter Atmosphärendruck („atmospheric pressure ionization“, API) erfolgt. Bei dem letztgenannten und heute routinemäßig eingesetzten System erfolgt die Abtrennung des Lösungsmittels sowie die Ionisierung der Analyten außerhalb des Hochvakuums unter dem Druck der Umgebungsatmosphäre; zum Einsatz kommt hier die Elektrosprayionisierung (ESI) und die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck („atmospheric pressure chemical ionization“, APCI).

Im Gegensatz zum ESI-Interface werden die Analyten bei der letztgenannten Methode nach dem pneumatischen Zerstäuben der Probe in einem starken Stickstoffstrom (4-8 l/min) und dem Passieren eines auf 200-400°C beheizten Glaszylinders (von den gebildeten Mikrotröpfchen verdampft hier das restliche Lösungsmittel) im APCI-Interface aktiv chemisch ionisiert. Die Ionisierung der Probenmoleküle erfolgt indirekt mittels einer Koronarentladungselektrode, die ihrerseits durch die an ihr anliegende Hochspannung (4-6 kV) ein Stickstoffplasma - bestehend aus  $N_2^+$ ,  $N_4^+$  und  $H_2O^+$  Radikalkationen sowie freien Elektronen - erzeugt, aus denen schließlich  $H_3O^+$ -Ionen als eigentliche reaktive Species für die chemische Ionisierung generiert werden (Garcia *et al.*, 1996). Die Analyten werden anschließend durch Protonentransfer, Bildung von Adduktionen oder Ladungsaustauschreaktionen (Niessen und Tinke, 1995) in Kationen überführt. Im Hinblick auf die Kopplung des Interface an die HPLC toleriert dieses Flussraten bis zu 2 ml/min ohne Probleme. Nachteilig auf die Analyten können sich Degradationsreaktionen – bedingt durch die hohe Temperatur – auswirken.

Die Arbeiten zur Elektrospray-Ionisierung beruhen auf Untersuchungen aus Arbeitsgruppen um Hines (Hines, 1966), Dole (Dole *et al.*, 1968), Yamashita (Yamashita und Fenn, 1984a, 1984b) und Aleksandrov (Aleksandrov *et al.*, 1985). Bei dieser Art der Ionisierung werden die aus der Chromatographie-Säule austretenden Eluenten elektrostatisch zerstäubt, wobei ein Aerosol hochgeladener Tröpfchen entsteht. Im weiterentwickelten System von Bruins (Bruins *et al.*, 1987) wird zusätzlich ein Stickstoffstrom eingesetzt, um diesen Prozess pneumatisch zu unterstützen.

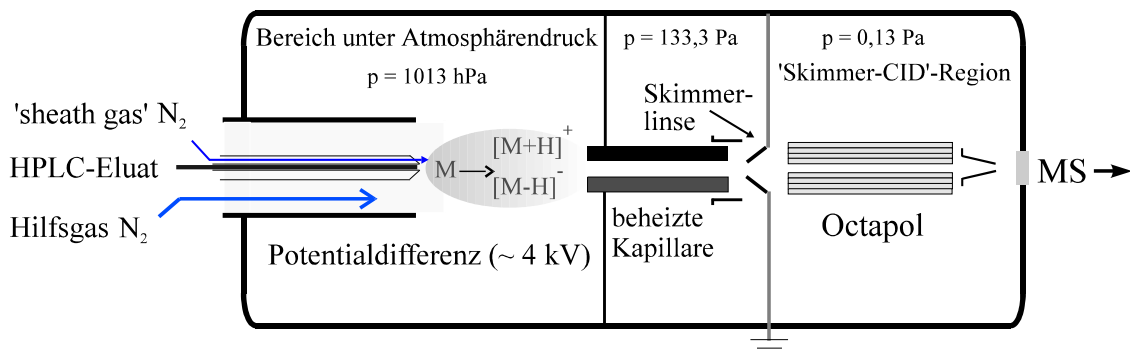


Abb. 22: Schematischer Aufbau des verwendeten ESI-Interface (nach Iribarne und Thomson, 1976; Thomson und Iribarne, 1979).

Abbildung 22 zeigt ein Schema des in der vorliegenden Arbeit verwendeten ESI-Interface. In diesem wird der Prozess der Zerstäubung durch eine Hochspannung (2-6 kV) zwischen der Probenkapillare und der beheizten Eingangskapillare des Massenspektrometers (dient als Gegenelektrode) eingeleitet; das dadurch ausgebildete elektrostatische Feld sorgt für eine elektrophoretische Trennung der Ionen in der austretenden Probenlösung. Durch diese elektrostatische Zerstäubung wird zunächst ein Aerosol aus hochgeladenen Teilchen gebildet. Durch die Verdampfung des Lösungsmittels kommt es zu einem Anstieg der Ladungsdichte an der Oberfläche der Tröpfchen, so dass zu einem bestimmten Zeitpunkt das sog. „Rayleigh-Limit“ überschritten wird, d.h. die Coulomb'schen Abstoßungskräfte reichen aus, um positiv oder negativ geladene Ionen (als „nackte“ Gasphasen-Ionen) zu emittieren. Diesem sog. „charged residue“-Prinzip von Dole (Dole *et al.*, 1968) steht das „ion evaporation“-Modell von Iribarne und Thomson gegenüber (Iribarne und Thomson, 1976; Thomson und Iribarne, 1979). Letzterer Theorie liegt eine direkte feldinduzierte Emission einzelner Ionen aus den Mikrotröpfchen in die Gasphase zu Grunde. Für die Analytik mittels eines ESI-Interfaces müssen die Analyten entweder schon geladen im HPLC-Eluat (z.B. Verbindungen mit nucleophilen Gruppen wie Amine oder Carbonsäuren oder Verbindungen mit Heteroatomen, die ein freies Elektro-

nenpaar besitzen) oder durch Addukt-Bildung mit Komponenten des Lösungsmittels (starke Säuren wie Trifluoressigsäure, flüchtige Puffermedien wie Ammoniumacetat) vorliegen.

Um die durch das ESI- oder APCI-Interface generierten ionisierten Analyten (normalerweise liefern diese „sanften“ Ionisierungstechniken Quasimolekülonen wie  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M+Ammonium]^+$  oder  $[M+Acetat-H]^-$ ) detektieren zu können und weitere strukturelle Aussagen zu erhalten, ist der Einsatz der Tandemmassenspektrometrie erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein sog. Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer eingesetzt. Abbildung 23 zeigt schematisch diesen Aufbau.

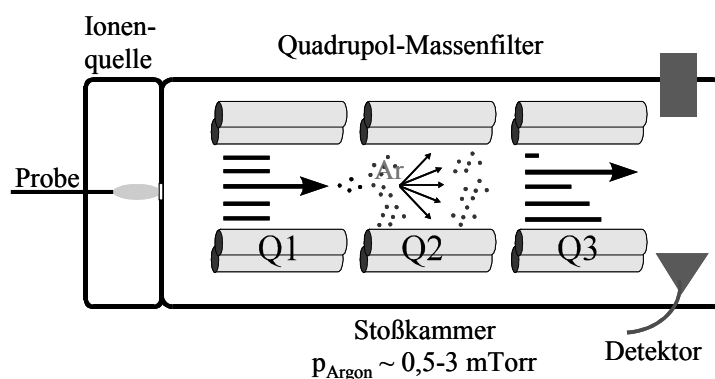


Abb. 23: Schematischer Aufbau des von uns verwendeten Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometers (nach Yost und Enke, 1978; Busch *et al.*; 1988 Wysocki, 1992).

Es besteht aus drei linear angeordneten Quadrupolfiltern (Q1, Q2, Q3), wobei Quadrupol 1 und Quadrupol 3 als frequenzmodulierte Massenanalysatoren dienen. Der dazwischen liegende Quadrupol, der nur im Hochfrequenzbetrieb („rf-only“) arbeitet, fungiert als stark fokussierende, feldfreie Stoßkammer mit hoher Transmission, in der ausgewählte Prekursor-Ionen („Elternionen“) dort mit einem inerten Stoßgas wie Argon oder Xenon kollidieren, wobei ein Teil der kinetischen Energie in innere Energie (Schwingungsenergie) umgewandelt wird, was zu einem unimolekularem Zerfall der aktivierten Prekursorionen in Produktionen („Tochterionen“) führt (Wysocki, 1992). Dieser als „collision induced decomposition“ (CID) bezeichnete Vorgang wird über die kinetische Energie der Ionen, die von der Potentialdifferenz zwischen den Quadrupolen Q1 und Q2 abhängig ist, und den Druck in der Stoßkammer kontrolliert. Das Ausmaß der Fragmentierung einer gleichartigen Prekursorionenpopulation ist direkt mit diesen beiden Parametern korreliert (Yost und Enke, 1978; Busch *et al.*, 1988).

Zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen kann das Tandemmassenspektrometer in unterschiedlichen Messarten betrieben werden: (i) „Full Scan“-Modus; Q1 und Q3 entspre-

chen bei abgestelltem Stoßgas der Arbeitsweise eines Single-Quadrupol Massenspektrometers; (ii) Produktionen Scan-Modus (auch Tochterionen Scan-Modus); in Q1 wird ein Molekulation selektiert, anschließend in Q2 mittels Stoßaktivierung fragmentiert und die gebildeten Produktionen werden in Q3 detektiert (Aufnahme von Massenspektren); (iii) Prekursorionen Scan-Modus (auch Elternionen Scan-Modus), erfasst sämtliche Ionen, die nach Stoßaktivierung ein charakteristisches Fragmention bilden; (iv) Neutralverlust Modus, erfasst Abspaltungen ungeladener Molekülbruchstücke; (v) im „Selected Reaction Monitoring“ (SRM-Modus) schließlich wird in Q1 ein bestimmtes  $m/z$  selektiert, in Q2 fragmentiert und aus den entstehenden Produktionen wiederum mittels Q3 ein selektives  $m/z$  erhalten.

### **1.3.3 Isolierung und Charakterisierung glykosidisch gebundener Flavonoide aus Rucola**

#### **1.3.3.1 Herstellung eines Rohextraktes**

Die Anreicherung an Zuckereinheiten gebundener Flavonoide erfolgte aus einem Lösungsmittelextrakt an RP-18 bzw. XAD-2 Material. Zu diesem Zweck wurde eine definierte Menge an frischen Rucolablättern (*Eruca sativa* Mill., Provenienz Italien) mit Extraktionslösung (70 % Methanol-30 % Wasser, v/v) versetzt, im Mixer zerkleinert und während 24 h auf dem Schüttler extrahiert. Nach Filtration wurde die organische Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt, der konzentrierte Rückstand wurde lyophilisiert. Den trockenen Extrakt nahm man wieder in wenig Wasser auf und applizierte ihn auf eine vorkonditionierte XAD-2-Säule. Nach Auswaschen polarer Substanzen (z.B. Zucker, Aminosäuren, Salze) mit Wasser und Abtrennung ggf. noch vorhandener Anteile an freien Aromastoffen mit Diethylether wurde ein Flavonoid-Rohextrakt durch Elution mit Methanol gewonnen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte Lyophilisierung des Rückstandes.

#### **1.3.3.2 Analytik des Rohextraktes mittels Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photo-Diodenarray Detektion (HPLC-DAD)**

Wie oben erwähnt, stellt die Hochleistungsflüssigchromatographie in Verbindung mit einem Photodiodenarray-Detektor eine elegante Möglichkeit dar, einen Rohextrakt in einem Schritt



auf seinen Gehalt an Flavonoiden hin zu überprüfen, da sowohl die komplexe Mischung aufgetrennt wird als auch die UV-Spektren der detektierten Verbindungen aufgenommen werden. Aufgrund unterschiedlicher chemischer Strukturen (Abbildung 21) zeigen Flavonoide charakteristische UV-Spektren (Tabelle 3) und lassen sich mit dieser analytischen Methode schon in einem ersten Screening von anderen Verbindungen unterscheiden. Abbildung 24 zeigt das bei 254 nm registrierte HPLC-DAD-Chromatogramm des aus Rucolablättern gewonnenen Rohextraktes.

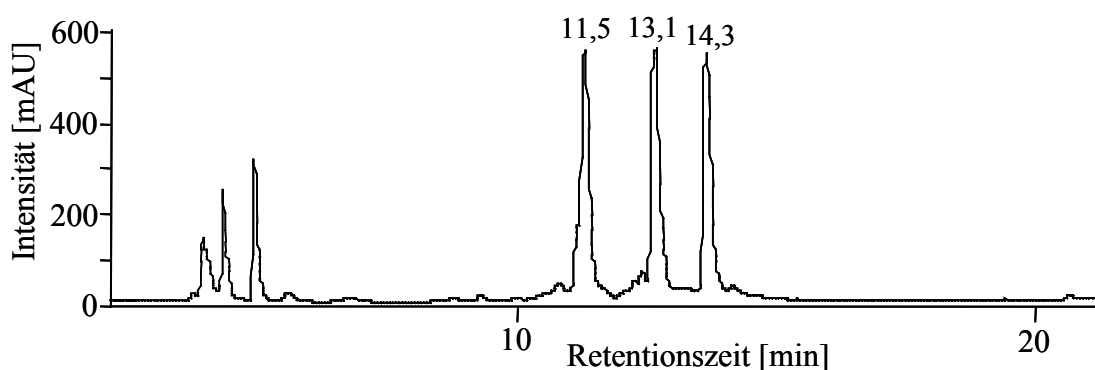


Abb. 24: HPLC-DAD-Chromatogramm des aus Rucolablättern gewonnenen Rohextraktes (analytische RP-18 Säule; Analyt. Gradient #7; Abbildung zeigt die Spur bei 254 nm).

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich ist, beschränkte sich die mittels HPLC-DAD (bei 254 nm) detektierte Zusammensetzung des Rohextraktes im Wesentlichen auf drei Hauptverbindungen (Peaks bei  $R_t$  11,5, 13,1 und 14,3 min), die ungefähr im gleichen Mengenverhältnis zueinander vorlagen. In Tabelle 4 sind die Extrema der UV-Spektren dieser drei Verbindungen aufgeführt.

Beim Vergleich dieser Daten mit entsprechenden Literaturangaben (Tabelle 3) stellte sich heraus, (i) dass es sich bei den drei detektierten Hauptkomponenten **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3** um Strukturen handelte, die mit denen von Flavonoiden aufgrund der beiden bei höherer Wellenlänge liegenden Maxima übereinstimmten, und (ii) dass es sich wahrscheinlich nicht um freie, sondern um glykosilierte Flavonoide handelte, sowie (iii) dass im Falle von **Ruc2** und **Ruc3** vermutlich zusätzlich eine Acylierung im Molekül vorliegen dürfte.

Tab. 4: Extrema der UV-Spektren der mittels HPLC-DAD im Rohextrakt bei 254 nm detektierten Hauptkomponenten (Abbildung 24).

Verbindung (Bezeichnung)	Maximum 1	Schulter	Maximum 2	Maximum 3
Rt 11,5 min ( <b>Ruc1</b> )	214 nm	248 nm	266 nm	338 nm
Rt 13,1 min ( <b>Ruc2</b> )	212 nm	241 nm	272 nm	330 nm
Rt 14,3 min ( <b>Ruc3</b> )	224 nm	242 nm	273 nm	330 nm

### 1.3.3.3 Fraktionierung und Reinigung mittels „reversed phase“- Chromatographie

Die Reinigung des Rohextraktes erfolgte an „reversed phase“ RP-18 Material mittels präparativer LC-Auftrennung (<sup>LC</sup>RP-18<sub>R</sub>). Ausgehend von dem Methanol-Eluat des durch Adsorption an XAD-2 erhaltenen Extraktes sind die drei mittels HPLC-DAD detektierten (potentiell glykosidisch gebundenen) Flavonoide in einem Schritt in ausreichender Reinheit isoliert worden (Abbildung 25).

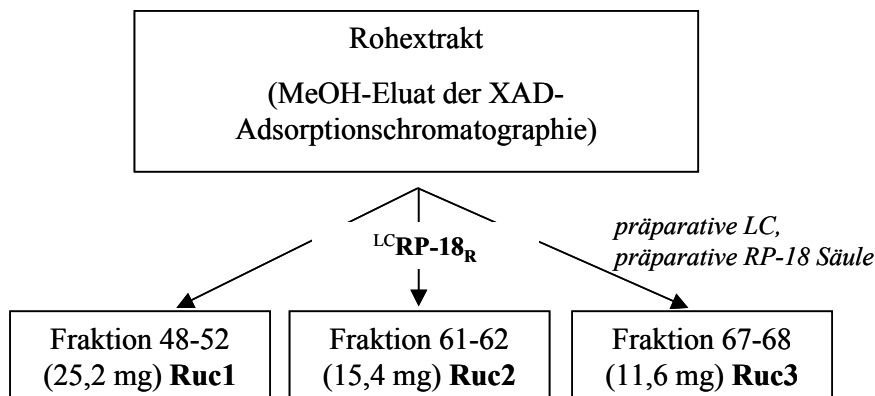


Abb. 25: Schema zur chromatographischen Reinigung von **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3**.

Die drei Substanzen konnten in einem einzigen chromatographischen Reinigungsschritt in ausreichender Reinheit (Kontrolle mittels Rechromatographie an HPLC-DAD) und vergleichsweise großer Ausbeute (11,6-25,2 mg) erhalten werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels Tandemmassenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie.

#### 1.3.3.4 Bestimmung des Zuckeranteils mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

Zur Identifizierung der in den isolierten Flavonoiden zu erwartenden Zuckereinheiten mittels HRGC-MS wurden Aliquote der isolierten reinen Verbindungen zunächst einer Säurehydrolyse unterworfen. Nach Neutralisieren der Lösungen wurden die Zuckereinheiten mit Natriumborbordeuterid reduziert. Dadurch wurden die Aldehyd- bzw. Keto-funktionen der freigesetzten Zuckereinheiten zu den entsprechenden Hydroxyfunktionen reduziert, aus den Aldosen bzw. Ketosen entstanden Polyole. Durch Reduktion mit deuteriertem Natriumborhydrid wurde die Position im Zuckermolekül, die die Aldehyd- bzw. Ketofunktion trug, selektiv markiert und konnte so später im Massenspektrum wieder zugeordnet werden. Im Anschluss an die Reduktion wurden die erhaltenen Polyole acetyliert, um die Verbindungen der HRGC-MS zugänglich zu machen.

Neben den isolierten Verbindungen **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3** sind nach der beschriebenen Vorgehensweise auch Referenz-Monosaccharide ( $\beta$ -D-Glucose,  $\beta$ -D-Galactose,  $\beta$ -D-Arabinose,  $\beta$ -D-Fructose) umgesetzt worden. Aus dem Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren der Referenzen mit denen der aus den isolierten glykosilierten Flavonoiden freigesetzten Zuckereinheiten zeigte sich, dass in den drei isolierten Verbindungen Glucoseeinheiten enthalten waren. Dieses Ergebnis stand in Einklang mit den bei der HPLC-DAD-Analytik erhaltenen Resultaten, bei der anhand des Vergleichs der UV-Spektren schon eine Glykosilierung zu erwarten war. Die Methodik ließ allerdings keine Aussage über die Anzahl der Glucose-Untereinheiten im jeweiligen Molekül zu.

#### 1.3.3.5 Charakterisierung der Glykoside mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) und Infrarotspektroskopie

Zur Charakterisierung der intakten Flavonoide wurde die Tandemmassenspektrometrie in Verbindung mit der HPLC und der Elektrosprayionisierung (ESI) im positiven Detektionsmodus herangezogen. Diese Technik hat man bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Charakterisierung von (glykosilierten) Flavonoiden eingesetzt (Brolis *et al.*, 1998; Cuyckens *et al.*, 2000). Zur chromatographischen Auftrennung des Rohextraktes an einer RP-18-Säule wurde ein Lösungsmittelsystem aus Wasser (0,05 % Trifluoressigsäure) und Acetonitril

(0,05 % Trifluoressigsäure) verwendet. Wie Abbildung 26A verdeutlicht, ist mit dieser Art der Analytik ein mit der HPLC-DAD-Analyse vergleichbares Chromatogramm erhalten worden (vgl. dazu Abbildung 24).

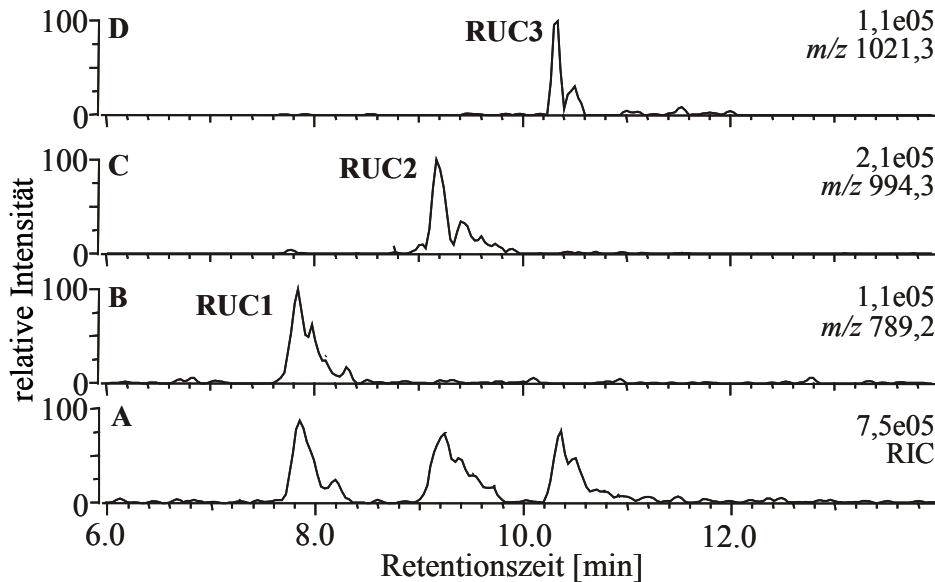


Abb. 26: HPLC-ESI-MS Chromatogramm des Rucolablatt-Rohextraktes an einer RP-18 Säule [Fließmittelsystem Wasser (0,05 % Trifluoressigsäure) und Acetonitril (0,05 % Trifluoressigsäure), ESI pos, Full Scan Modus, Gradient #1]; **A**: RIC (reconstructed ion chromatogram), **B-D**: Ionenspuren  $m/z$  789,2, 994,3 und 1201,3 (jeweils Hauptsignale der Massenspektren der drei Verbindungen).

In Abbildung 26 sind weiterhin die drei Ionenspuren  $m/z$  789,2, 994,3 und 1201,3 dargestellt, die aus den Massenspektren der drei Hauptverbindungen mit den Retentionszeiten 7,9, 9,2 und 10,2 min hervorgehen. Um weitere strukturelle Informationen über die drei isolierten Flavonoide zu erhalten, wurden auf der Grundlage der drei Prekursorionen  $m/z$  789,2, 994,3 und 1201,3 durch Fragmentierung mit Argon (Kollisionsenergie -15 bis -20 eV, 2 mTorr Argon) die Produktionenspektren aufgenommen. In Tabelle 5 sind die Fragmente der erhaltenen Produktionenspektren sowie deren Zuordnung zu den einzelnen strukturellen Untereinheiten der Verbindungen **Ruc1** bis **Ruc3** zusammengestellt. Aufgeführt sind auch die massenspektrometrischen Daten des bereits in Rucola beschriebenen Isorhamnetin-3-glucosids (Rahmen *et al.*, 1969), das wegen der geringen Menge im Vergleich zu den drei Hauptflavonoiden von uns jedoch nicht isoliert worden ist.

Tab. 5: Mittels HPLC-ESI-MS/MS ermittelte Fragmente der Produktionenspektren von **Ruc1**, **Ruc2**, **Ruc3** und dem auch im Rucola-Rohextrakt detektierten Isorhamnetin-3-glucosid.

<i>m/z</i>	Ruc1 <sup>y</sup> Exakte Masse 788.20	Ruc2 <sup>y</sup> Exakte Masse 994.26	Ruc3 <sup>y</sup> Exakte Masse 1200.32	Isorhamnetin- glucosid <sup>e,x</sup>
1201	∅	∅	[M <sup>a</sup> + H] <sup>+</sup>	∅
1039	∅	∅	[M <sup>a</sup> – Hex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	∅
995	∅	[M <sup>a</sup> + H] <sup>+</sup>	-	∅
789	[M <sup>a</sup> + H] <sup>+</sup>	-	-	∅
671	-	[M <sup>a</sup> – 2 x Hex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	[M <sup>a</sup> – 2xHex <sup>b</sup> – Acyl <sup>d</sup> + H] <sup>+</sup>	∅
627	[M <sup>a</sup> – 1xHex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	-	-	∅
479	-	-	-	[M <sup>a</sup> + H] <sup>+</sup>
465	[M <sup>a</sup> – 2xHex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	-	-	-
369	-	-	[G <sup>b</sup> + S <sup>d</sup> + H] <sup>+</sup>	-
317	-	-	-	[A <sup>c</sup> + H] <sup>+</sup>
303	[A <sup>c</sup> + H] <sup>+</sup>	[A <sup>c</sup> + H] <sup>+</sup>	[A <sup>c</sup> + H] <sup>+</sup>	[A <sup>c</sup> – CH <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>
207	-	[Acyl <sup>d</sup> + H] <sup>+</sup>	[Acyl <sup>d</sup> + H] <sup>+</sup>	-
163	[Hex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	[Hex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	[Hex <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>	[G <sup>b</sup> + H] <sup>+</sup>

<sup>x</sup> Kollisionsenergie –15 eV (2 mTorr Argon); <sup>y</sup> *m/z* 789,2, 994,3 und 1201,3 Kollisionsenergie –20 eV (2 mTorr Argon); <sup>a</sup> M = Gesamtmolekül; <sup>b</sup> G = Hexose abzüglich H<sub>2</sub>O; <sup>b</sup> Hexose abzüglich H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup> A = Aglykon (**Ruc1-3**: Flavonol; Isorhamnetin-glucosid: 3'-methoxy-quercetin); <sup>d</sup> Acyl = Acyl-Einheit abzüglich H<sub>2</sub>O; <sup>e</sup> beschrieben von Rahman *et al.* (1969), jedoch ohne spektroskopische Daten.

Die Produktionenspektren der isolierten Flavonoide zeigten in allen drei Fällen Quasimolekülen [M+H]<sup>+</sup>, die jeweils einen Unterschied von 206 Masseneinheiten aufwiesen. Des Weiteren wurde jeweils ein Fragment mit *m/z* 163 (entspricht einer protonierten Hexose-Einheit abzüglich des Verlusts eines Moleküls H<sub>2</sub>O) und eines mit *m/z* 303 (entspricht z. B. einer protonierten Einheit des Flavonols Quercetin) detektiert. Aufgrund der oben erwähnten Extrema in den UV-Spektren deutete sich zudem für die Verbindungen **Ruc2** und **Ruc3** eine Acyl-Untereinheit im Molekül an. Das Fragment mit *m/z* 207 in den Produktionenspektren von **Ruc2** und **Ruc3** wurde einer solchen Einheit zugeordnet; es könnte sich beispielsweise um Sinapinsäure (*m/z* 207 entspricht der protonierten Acyleinheit abzüglich des Verlusts eines Moleküls H<sub>2</sub>O) handeln.

Aus der mittels HPLC-MS ermittelten Molekülmasse und den Fragmenten aus den Produktionenspektren der Verbindungen **Ruc1-3** ließen sich zu diesem Zeitpunkt folgende Schlussfolgerungen ziehen: (i) bei dem Flavonoid handelt es sich aufgrund der Molekülmasse um

ein Flavonol, (ii) das Flavonoidgrundgerüst der drei Verbindungen ist in allen drei Fällen mit jeweils drei Hexose-Untereinheiten glykosiliert und (iii) die Verbindungen **Ruc2** und **Ruc3** enthalten zusätzlich eine bzw. zwei Acyluntereinheiten. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 27 das Produktionenspektrum der Verbindung **Ruc3**.

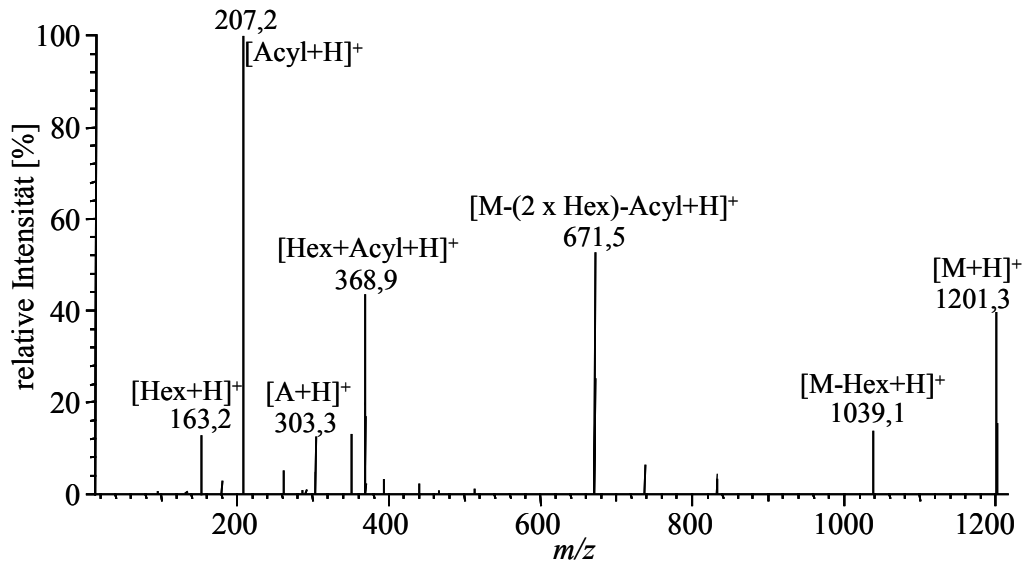


Abb. 27: Produktionenspektrum der Verbindung **Ruc3** (HPLC-MS/MS, ESI positiv, Prekursorion  $m/z$  1201,3, 2 mTorr Argon, -20 eV, Lösungsmittelsystem Wasser (0,05 % Trifluoressigsäure) und Acetonitril (0,05 % Trifluoressigsäure), „loop“-Injektion); <sup>a</sup> M = Gesamtmolekül; <sup>b</sup> G = Hexose abzüglich H<sub>2</sub>O; <sup>c</sup> A = Aglykon (Flavonol); <sup>d</sup> Acyl = Acyl-Einheit abzüglich H<sub>2</sub>O.

Zusätzliche Information über die Untereinheiten der drei isolierten glykosidisch gebundenen Flavonoide wurde durch die Aufnahme von Infrarot-Spektren erhalten. Alle drei Verbindungen zeigten intensive Signale bei 3400 cm<sup>-1</sup> (O-H) und bei 1645 cm<sup>-1</sup> ( $\alpha,\beta$ -ungesättigte C=O-Einheit), die auf eine Flavonol-ähnliche Struktur hindeuteten, wie sie beispielsweise bei Quercetin vorliegt (Li *et al.*, 1998). Die zusätzlichen Signale bei 1700 cm<sup>-1</sup> für **Ruc2** bzw. bei 1680 und 1700 cm<sup>-1</sup> für **Ruc3** wiesen auf die Acyl-Untereinheit(en) in den Molekülen hin.

### 1.3.3.6 Charakterisierung der intakten Glykoside mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur vollständigen Strukturaufklärung der Verbindungen **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3** wurden abschließend verschiedene ein- und zweidimensionale NMR-Messungen (DEPT, sel-COSY, sel-TOCSY, HSQC, HMBC) durchgeführt, mit deren Hilfe eine vollständige Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ - und der  $^1\text{H}$ -Signale möglich war (Tabelle 6). Für die drei isolierten glykosidisch gebundenen Flavonoide wurden die in Abbildung 28 dargestellten Strukturen ermittelt.

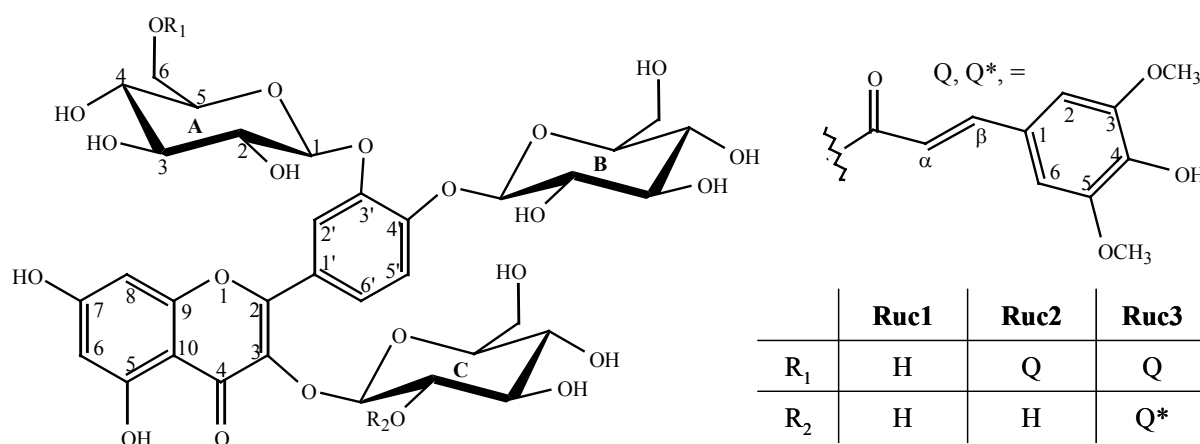


Abb. 28: Strukturelle Zusammensetzung der Verbindungen **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3**; die Positionsbezeichnungen beziehen sich auf die in Tabelle 6 aufgeführten Zuordnungen für die  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebungen.

Im Tieffeld-Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von **Ruc1** sind zwei verschiedene Spin-Systeme identifiziert worden, ein Duplett-Paar bei 6,44 (1H, d,  $J_{\text{meta}} = 2,0$  Hz) und eines bei 6,21 (1H, d,  $J_{\text{meta}} = 2,0$  Hz), die auf einen 1,2,3,5-tetra-substituierten aromatischen Ring (überwiegend mit Sauerstoff-Funktionen) hindeuteten. Die Protonen-Signale bei 8,08 (1H, d,  $J_{\text{meta}} = 2,2$  Hz), 7,89 (1H, dd) beziehungsweise 7,37 (1H, d,  $J_{\text{ortho}} = 8,6$  Hz) bilden ein separates Spin-System, die auf das Vorhandensein eines 1,2,4-tri-substituierten aromatischen Ringes hinweisen. Im Hochfeld-Bereich des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums traten drei voneinander getrennte Dupletts bei 5,28 (1H, d, 7,6 Hz), 5,02 (1H, d, 7,6 Hz) bzw. 4,99 (1H, d, 7,3 Hz) sowie stark überlappende Signale im Bereich von 3,95-3,15 (18H, m) hervor. Für die Zuordnung dieser Signale stellte die Messung mittels selektivem 1D TOCSY die Methode der Wahl dar (Stott *et al.*, 1995); es wurden damit die Strukturen der Zuckeruntereinheiten als drei  $\beta$ -Glucose-Einheiten identifiziert. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des Aglykons (180-94 ppm) bestan-

den aus 15 Signalen, von denen 5 einer =CH – Einheit, 9 zu quaternären  $sp^2$  C-Atomen und einer konjugierten C=O Funktion (179,6 ppm) zugeordnet wurden. Anhand eines Vergleichs der  $^{13}\text{C}$ -chemischen Verschiebungen von **Ruc1** mit Literaturdaten von Flavonol-Glykosiden (Breitmaier und Voelter, 1987) wurde die Flavonoid-Unterheit der Verbindung dem Flavonol Quercetin zugeordnet.

Die Verknüpfungen der drei Monosaccharid-Einheiten mit dem Flavonol wurden auf der Grundlage von HMBC Signalen, die die Fernkopplungen zwischen  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  Signalen aufzeigen, ermittelt. Das anomere Proton C1 mit der größten chemischen Verschiebung (C1:  $\delta = 5,28$ ) korrelierte mit C-3 (136,2) und zeigte somit die Verknüpfung der ersten Glucose-Einheit über die Position 1 des Zuckers mit dem Kohlenstoffatom C-3 des Quercetins an. Das intensive Korrelationssignal des anomeren Protons B1 ( $\delta = 5,02$ ) mit C-4' (151,8) und das HMBC – Korrelationssignal zwischen A1 (4,99) und C-3' (148,3) bewiesen die Position der verknüpften zwei weiteren Zuckereinheiten an Position C-3' und C-4' der Quercetin-Hydroxyfunktionen.

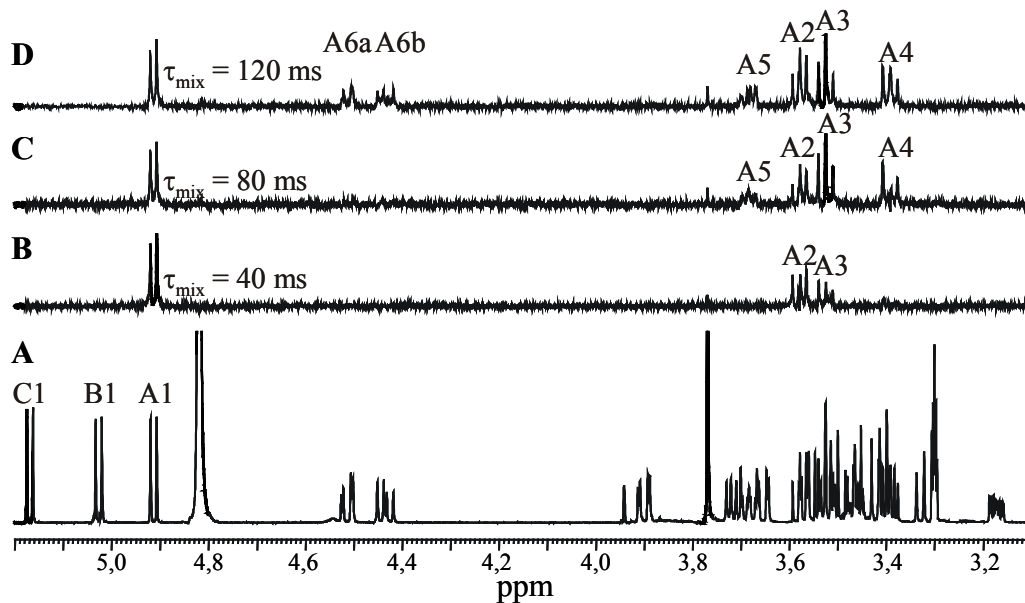


Abb. 29: Selektives 1D-TOCSY-Spektrum der Verbindung **Ruc2** unter Einstrahlung auf das Proton A1; **A**:  $^1\text{H}$ -Spektrum, **B-D**: TOCSY-Messungen mit ansteigendem  $\tau_{\text{mix}}$ ; die Bezeichnung der Signale bezieht sich auf die in Abb. 28 angegebenen Positionen innerhalb des Moleküls.

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Verbindungen **Ruc2** und **Ruc3** zeigten vergleichbare Signale, hinzu kamen hier noch zusätzliche für eine bzw. zwei Sinapoyl-Untereinheiten. Der



hohe Wert der Kopplungskonstanten  $J_{H-\alpha,H-\beta}$  von 15,9 Hz bewies die (*E*)-Konfiguration der Doppelbindung. Die chemischen Verschiebungen der Protonen der Monosaccharid-Einheit zeigten eine starke Abschirmung an den Positionen, an denen die Sinapinsäure mit der Glucose-Einheit verknüpft ist. Aus diesem Grunde war die Unterscheidung der einzelnen Monosaccharid-Untereinheiten von erheblicher Bedeutung. Eine Serie von selektiven 1D-TOCSY-Experimenten (Abbildung 29) mit der Verbindung **Ruc2** mit unterschiedlichen  $\tau_{\text{mix}}$ -Zeiten bewies die erwähnte Tieffeldverschiebung an den Methylen-Protonen A6a und A6b. Des Weiteren waren intensive Korrelationssignale im HMBC-Spektrum zwischen diesen Protonen und dem Kohlenstoffatom der Ester C=O-Funktion zu beobachten, was die Verknüpfung der Säure an Position 6 der Zuckeruntereinheit A belegte. Analog dazu wurde für die Verbindung **Ruc3** die Verknüpfung der zweiten Sinapoyl-Einheit über Position 2 der Zuckeruntereinheit C festgelegt.

Mit Hilfe der durchgeführten NMR-Messungen wurden die aus Rucolablättern isolierten glykosidisch gebundenen Flavonoide als Quercetin-3,3',4'-tri-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**Ruc1**), Quercetin-3'-(6-sinapoyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3,4'-di-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**Ruc2**) und Quercetin-3-(2-sinapoyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3'-(6-sinapoyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**Ruc3**) identifiziert.

Tab. 6: Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ - und der  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebungen sowie der HMBC-Signale für die isolierten Verbindungen **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3**; die Bezeichnung der einzelnen Positionen innerhalb der Moleküle ist aus den Strukturen in Abb. 28 zu ersehen.

	<b>Ruc1</b>			<b>Ruc2</b>			<b>Ruc3</b>		
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC
2		157,8			156,7			155,6	
3		136,2			136,4			136,2	
4		179,6			179,2			178,6	
5		158,6			158,0			157,7	
6	6,44	94,9	C-5; C-8; C-10	6,28	94,8	C-5; C-7; C-8	6,09	94,6	C-5; C-8; C-10
7		166,1			166,0			165,6	
8	6,21	100,0	C-6; C-7; C-9; C-10	6,10	100,0	C-6; C-9	5,96	99,8	C-6; C-9; C-10
9		163,1			162,8			162,7	
10		105,9			106,3			105,9	
1'		126,9			126,5			126,7	

	Ruc1			Ruc2			Ruc3		
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC
2'	8,08	122,5	C-2; C-3'; C-4'; C-6'	8,11	122,9	C-2; C-3'; C-4'; C-6'	8,08	120,8	C-2; C-3'; C-4'; C-6'
3'		148,3			147,6			148,3	
4'		151,8			151,8			150,9	
5'	7,37	119,0	C-1'; C-3'; C-4'	7,33	118,6	C-1'; C-3'; C-4'	7,31	119,1	C-1'; C-3'; C-4'
6'	7,89	126,8	C-4'	7,94	126,7	C-2; C-2'; C-4'	7,73	125,8	C-2; C-2'; C-4'
A1	4,99	104,6	C-3'	4,91	103,8	C-3'	4,98	103,4	C-3'
A2	3,55	75,2		3,58	74,9		3,60	75,0	
A3	3,52	77,7		3,53	77,9		3,58	77,9	
A4	3,41	71,3		3,39	72,2		3,38	72,4	
A5	3,41	78,4		3,68	75,9		3,86	75,9	
A6a	3,90	62,5		4,51	64,8	Q-CO	4,79	64,7	Q-CO
A6b	3,74			4,43		Q-CO	4,18		A5
B1	5,02	103,3	C-4'	5,03	102,9	C-4'	5,04	103,1	C-4'
B2	3,56	75,0		3,56	74,9	B1	3,57	74,9	
B3	3,50	77,0		3,50	77,7	B2; B4	3,50	77,8	
B4	3,42	71,3		3,41	71,3		3,44	71,3	
B5	3,45	78,4		3,47	78,4		3,44	78,4	
B6a	3,91	62,5		3,90	62,5		3,90	62,5	
B6b	3,72			3,72			3,73		
C1	5,28	104,0	C-3	5,17	104,3	C-3	5,72	100,2	C-3
C2	3,48	75,6		3,47	75,8		4,85	76,5	C1; Q*-CO
C3	3,41	78,0		3,40	77,7		3,54	76,5	
C4	3,32	71,3		3,32	71,3		3,42	71,5	
C5	3,19	78,4		3,17	78,4		3,38	79,1	
C6a	3,67	62,5		3,66	62,5		3,85	62,5	
C6b	3,52			3,52			3,71		
Q-CO					169,0			168,7	
Q-α				6,07	115,4	126,1	6,10	115,6	Q-1
Q-β				7,31	147,1	Q-α; Q-2,6; Q-CO	7,29	146,7	Q-α; Q-2,6; Q-CO
Q-1					126,1			126,1	
Q-2,6				6,47	106,3	Q-1; Q-4; Q-β; Q-3,5	6,42	106,2	Q-β; Q-2,6; Q-1; Q-3,5; Q-4
Q-3,5					149,1			148,9	
Q-4					139,4			139,2	

	<b>Ruc1</b>			<b>Ruc2</b>			<b>Ruc3</b>		
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC
Q-3,5- OMe				3,72	56,6		3,72	56,5	Q-3,5
Q*-CO								167,7	
Q*-α							6,08	115,3	Q*-1
Q*-β							7,38	147,3	Q*-α, Q*-2,6, Q*-CO
Q*-1								126,5	
Q*-2,6							6,72	106,8	Q*-β; Q*-4; Q*- 1; Q*-2,6; Q*-3,5;
Q*-3,5								149,3	
Q*-4								139,5	
Q*-3,5- OMe							3,85	56,8	Q*-3,5

Im Gegensatz zu anderen glykosidisch gebundenen Flavonoiden, bei denen die Zuckereinheiten an die Positionen C-3, C-7 des Flavonoids (Barakat *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993; Gluchoff-Fiasson *et al.*, 1997), C-3 (Ferrerres *et al.*, 1995) und C-4' (Saleh *et al.*, 1972) geknüpft sind, zeigen die hier isolierten Quercetin-triglucoside ein ungewöhnliches Verknüpfungsmuster über die Position C-3, C-3' und C-4' des Aglykons. Eine solches Muster hat man lediglich für Rhamnetin-triglucoside aus *Pyrola* Spezies beschrieben (Averett und Bohm, 1986). Ebenfalls außergewöhnlich ist die Verknüpfung der zweiten Sinapoyl-Einheit bei der Verbindung **Ruc3** über die Position 2 der Zuckereinheit C. Die in der Literatur beschriebenen acylierten Flavonoid-Glykoside weisen in der Regel über Position 6 der Zuckeruntereinheit die Verbindung zur entsprechenden Säure auf (Williams und Harborne, 1988; Ferreres *et al.*, 1995).

Da sich in entsprechenden Untersuchungen herausgestellt hat, dass sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Bioaktivität von glykosilierten (und acylierten) Flavonoiden (Hollman und Katan, 1999; Harborne und Williams, 2000) abhängig ist von (i) der Klasse des Flavonoids und (ii) von der Art und Weise der Verknüpfung von gebundenen Flavonoiden, stellt die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Identifizierung von drei neuen acylierten Quercetin-tri-O-β-D-glucosiden (Weckerle *et al.*, 2001a) eine neue, wichtige Information für weitere Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen derartiger Verbindungen dar.

## 2 Untersuchungen an Rohkaffee

Wie einleitend ausgeführt wurde, bestehen aufgrund intensiver Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der glykosidisch und anderweitig „gebundenen“ Aromastoffe nur noch wenige Möglichkeiten, mit pflanzlichem Material Neuland zu betreten. Eine solche „Lücke“ besteht überraschenderweise hinsichtlich der Kaffeepflanze. Wir haben uns dementsprechend Rohkaffee gewidmet, zumal sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass in grünen Kaffeebohnen durchaus ein gewisses Potential gebundener Aromastoffe enthalten ist.

### 2.1 Die Kaffeepflanze

Die Pflanzengattung *Coffea*, die zur Familie der Rötengewächse (*Rubiaceae*) gehört, ist der Oberbegriff für alle Kaffeearten, die zahlreich sowohl in Strauch- als auch in Baumform vorkommen. Obwohl es unter diesen Arten mehrere mit coffeinhaltigen Samen gibt, spielen für die Erzeugung von Kaffee im wesentlichen nur *Coffea arabica* L. (Varietäten *typica*, *bourbon*, *maragogips*, *mocca*), *Coffea canephora* (Varietäten *robusta*, *typica*, *uganda*, *quillon*) und *Coffea liberica* eine Rolle. Die Anteile für die weltweite Erzeugung von Kaffee entfallen mit 70–75 % auf *C. arabica*, mit 20–25 % auf *C. canephora* und mit 1–3 % auf *C. liberica*. Verteilt auf die Kontinente entspricht dies Produktionsanteilen von 47 % für Südamerika (vor allem Brasilien, Kolumbien und Mexiko), 21 % für Afrika (vor allem Kenia, Elfenbeinküste, Uganda), 19 % für Zentralamerika (vor allem Mexiko), 12 % für Asien und von ca. 1 % für Ozeanien. Die weltweite Gesamtproduktion an Rohkaffee lag in den 90er Jahren zwischen 92 und 107 Millionen Einheiten pro Jahr (1 Einheit entspricht einem Sack zu 60 kg) (Kaffee-Digest 1, dt. Kaffeeverband, 1999; Kaffee-Text, dt. Kaffeeverband, 2/90).

Der Kaffeebaum, der zur Erleichterung der Ernte meist strauchartig auf eine Höhe von 2–2,5 m gestutzt wird, besitzt lederartige immergrüne Blätter und weiße Blüten, aus denen sich kirschenähnliche Steinfrüchte mit festem, weißgelblichen Fruchtfleisch von ca. 1,5 cm Durchmesser entwickeln. Im Inneren der Frucht befinden sich meist zwei mit ihren abgeflachten Seiten aneinanderliegende Steinkerne. Unter der Steinschale befindet sich die Samenschale, das sogenannte Silberhäutchen, die das Endosperm (genutzter Teil der Frucht) umschließt.

Die Kaffeepflanze stellt an die Anbauvoraussetzungen hohe Ansprüche, für ertragreichen Anbau müssen Temperatur, Wasser, Wind, Sonnenschein und Bodenzusammensetzung optimal aufeinander abgestimmt sein. Kaffee gedeiht aufgrund seiner Frostempfindlichkeit - die mittlere Jahrestemperatur sollte zwischen 15-25°C liegen - nur in den Tropen bis ca. 28° südlich und nördlich des Äquators. Beim Niederschlag kommt es nicht nur auf die absolute Wassermenge an (jährlicher Niederschlagsbedarf von *C. arabica* ca. 500-1500 mm, von *C. canephora* und *liberica* ca. 2000 mm), sondern auch auf die zeitliche Verteilung und den Grad der Luftfeuchtigkeit. Die Bodenbeschaffenheit in den verschiedenen Anbauländern ist höchst unterschiedlich, optimal ist ein humusreicher, lockerer Boden mit einem Grundwasserspiegel unter 3,5 m Tiefe. Im Bezug auf die geographische Höhenlage bevorzugt *C. arabica* Lagen zwischen 600 und 1200 m, *C. canephora* Zwischenlagen (300-600 m), und *C. liberica* ist auch für Niederungen geeignet.

An die Reifezeit der Kaffee Früchte (8-12 Monate) und die Ernte, die in der Regel per Hand durchgeführt wird, schließt sich die Aufbereitung der Kirschen nach dem sog. „nassen“ oder „trockenen“ Verfahren an. Bei letzterem Verfahren werden die Bohnen nach dem Eintrocknen an der Sonne mit Schälmaschinen vom getrockneten Fruchtfleisch, von der Pergamenthaut und möglichst auch vom Silberhäutchen befreit. Bei der aufwendigeren „nassen“ Aufbereitung (für die meisten Arabica-Sorten üblich) wird in einem ersten Arbeitsgang der Großteil des Fruchtfleisches durch Abquetschen entfernt, der an den Samen anhaftende Rest wird durch pektinolytische Enzyme und Mikroorganismen soweit abgebaut und gelockert, dass auch dieser Teil des Fruchtfleisches durch Abwaschen entfernt werden kann. Daran schließt sich ein Trocknungs- und Schälgang wie beim „trockenen“ Verfahren an. (Franke, 1992; Beltz, *et al.*, 2001; Kaffee-Digest 1, dt. Kaffeeverband, 1999; Kaffee-Text, dt. Kaffeeverband, 2/90). Die Qualitätsbeurteilung von Rohkaffee erfolgt anhand bestimmter Kriterien: Sensorische Prüfung (Geruch und Geschmack), Größe, Form, Farbe, Härte und Schnitt der Bohnen (Spiller, 1984).

Beim Röstvorgang, der in die vier Phasen Trocknung, Entwicklung, Zersetzung und Vollröstung eingeteilt ist, erfahren die grünen Kaffeebohnen Veränderungen hinsichtlich ihres makroskopischen Erscheinungsbildes (Volumenzunahme, Struktur- und Farbveränderungen, Gewichtsminde rung, Wasserverlust) sowie der Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe (Ausbildung des Röstaromas, das sich aus über 800 flüchtigen Komponenten zusammensetzt). Technisch gesehen wird zwischen Kontakt- und Konvektionsröstung unterschieden (Spiller, 1984).

## **2.2 Analytik von gebundenen Aromastoffen**

### **2.2.1 An Zuckereinheiten gebundene Aromastoffe**

In den letzten Jahren zeigten Untersuchungen verschiedener Arbeitskreise, dass in Blättern, Früchten und anderen Pflanzenteilen eine Vielzahl gebundener Aromastoffvorläufer enthalten sind (Engel und Tressl, 1983; Strauss *et al.*, 1987; Winterhalter und Schreier, 1988b; Schwab *et al.*, 1990; Krammer *et al.*, 1991; Pabst *et al.*, 1991a, 1991b; Wintoch *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1994). Dabei handelt es sich in der Regel um Verbindungen, bei denen das Aglykon über eine Hydroxyfunktion glykosidisch an die entsprechende Zuckereinheit gebunden ist, bei der es sich meist um Mono- oder Disaccharideinheiten handelt. In wenigen Fällen hat man aber auch Aromastoffprekursoren gefunden, bei denen das Aglykon mit einer Carboxyl-einheit über eine Esterbindung an einen Zucker gebunden ist, wie z.B. bei 2,6-Dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-diensäure-glucoseester (Winterhalter *et al.*, 1997; Bonnländer *et al.*, 1998; Miyase *et al.*, 1999b).

Trotz der hohen industriellen Bedeutung von Kaffee und intensiver Forschungsarbeiten (Czerny und Grosch, 2000; Mayer und Grosch, 2001; Clarke und Vitzthum, 2001) sind in Rohkaffee bisher nur Diterpen-Glykoside beschrieben, bei denen die Aglykone nicht zu den flüchtigen Aromastoffen gehören (Richter *et al.*, 1977; Richter und Spitzler, 1978; Maier und Wewetzer, 1978; Richter und Spitzler, 1979).

### **2.2.2 Instrumentell-analytische Grundlagen**

#### *Übersicht*

Aromastoffprekursoren, bei denen das Aglykon glykosidisch oder über eine Esterbindung an den Zuckeranteil gebunden ist - sie werden im folgenden kurz als Prekursoren bezeichnet - sind aufgrund ihrer Struktur wasserlöslich, nichtflüchtig und unter bestimmten Bedingungen labil. Während glykosidisch gebundene Vorläufer säurelabil sind, können Aglykone, die über eine Esterbindung an den Zucker gebunden sind, sowohl in saurem als auch in alkalischem Milieu hydrolysiert werden. Die Säurehydrolyse solcher Ester ist – wie die Veresterung – eine Gleichgewichtsreaktion, wogegen die alkalische Hydrolyse infolge der Bildung des Carboxylat-Anions praktisch irreversibel verläuft. Aus diesem Grund erfordert die Isolierung solcher

Verbindungen aus einer komplex zusammengesetzten Matrix wie einem Pflanzengewebe eine aufwendige und im Bezug auf äußere Einflüsse (z.B. Temperatur, pH-Wert) schonende Vorgehensweise. Abbildung 30 zeigt als Übersicht ein allgemeines Schema zur Isolierung und Identifizierung gebundener Prekursoren, das im folgenden kurz erläutert werden soll.

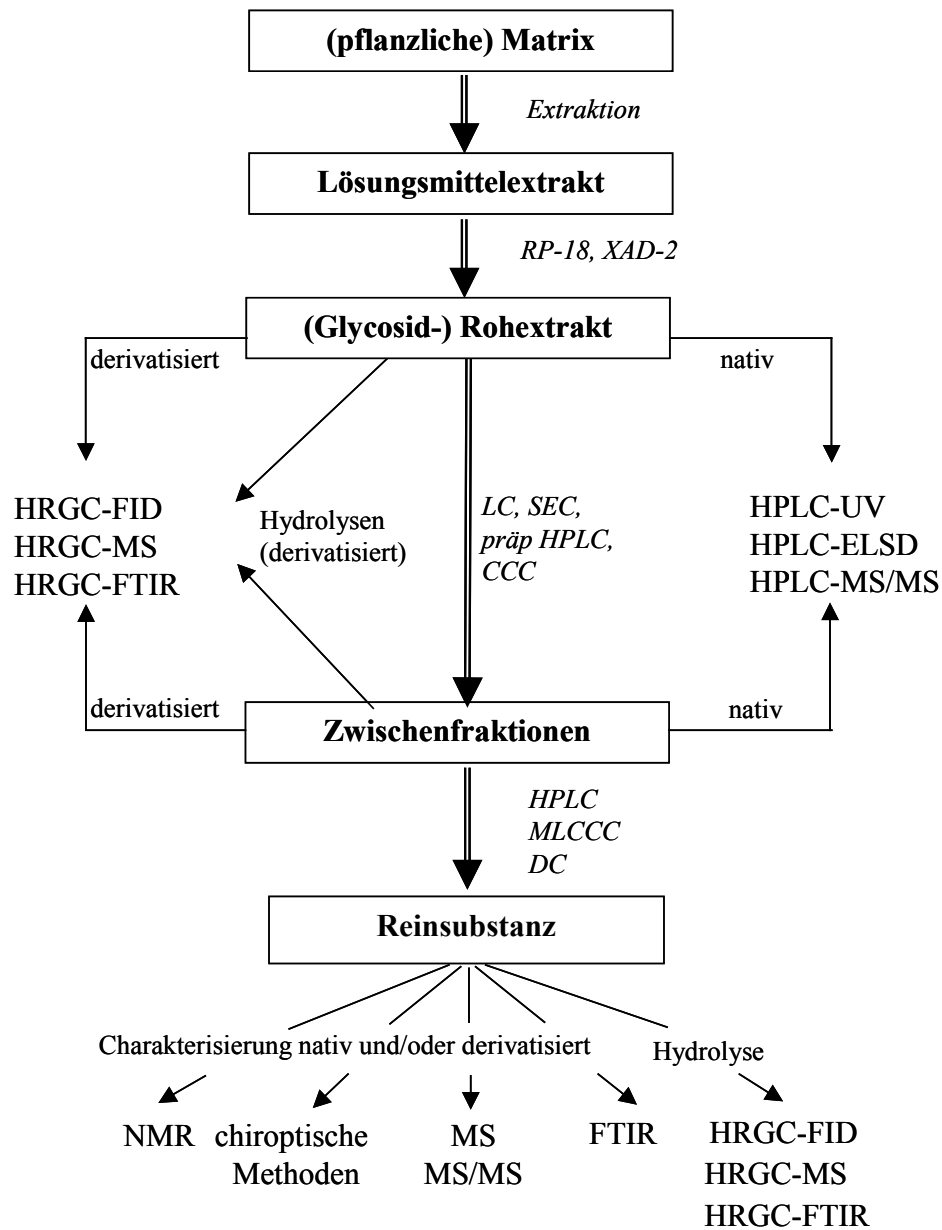


Abb. 30: Schema zur Analytik von gebundenen Aromastoffprekursoren (Glykoside, Vorläufer mit Esterbindung) (nach Winterhalter und Skouroumounis, 1997a).

### *Isolierung und Extraktion*

Die Isolierung der intakten gebundenen Prekursoren aus pflanzlichem Material erfolgt durch Extraktion mit polaren Lösungsmitteln wie z.B. Wasser, Methanol, Ethanol oder Aceton (Egloff, 1982). Um bei der Aufarbeitung Hydrolysen durch Säure- oder Basenkatalyse bzw. durch endogen vorhandene Enzyme zu verhindern, sollte bei neutralem pH-Wert unter Enzyminhibierung gearbeitet werden. Neben der inhibierenden Wirkung von Glucono- $\delta$ -lacton auf  $\beta$ -Glucosidasen (Heyworth und Walker, 1962; Hartmann-Schreier, 1987) erzielt man auch durch den Zusatz von Methanol eine sehr wirksame Enzyminhibierung (Schreier, 1984).

Da die so erhaltenen Extrakte in der Regel komplexe Zusammensetzung aufweisen, schließt sich an die Extraktion ein erster Reinigungsschritt an. Die damit einhergehende Anreicherung der gebundenen Aromastoffprekursoren erfolgt im allgemeinen durch Festphasenextraktion an Umkehrphasen oder Polystyrolharzen (XAD-2) (Williams *et al.*, 1982; Gunata *et al.*, 1985). Die Prekursoren werden dabei über ihren unpolaren Aglykonanteil adsorbiert, störende unpolare „freie“ Aromastoffe und polare Begleitstoffe (Zucker, Aminosäuren, Salze) werden durch Behandlung mit Diethylether und Wasser effektiv abgetrennt; die Elution der Prekursoren erfolgt anschließend mit Methanol.

### *Reinigung der Vorläufer*

Die so resultierenden Rohextrakte können jetzt auf verschiedene Weise gereinigt werden. Einerseits besteht die Möglichkeit, die Prekursoren vor weiteren chromatographischen Schritten mittels Peracetylierung, Persilylierung oder Permethylierung zu derivatisieren (Bishop, 1964; Dutton, 1973 und 1974). Andererseits können die Prekursoren aber auch direkt in nativem Zustand durch den kombinierten Einsatz verschiedenster Trenntechniken weiter aufgetrennt werden. Hierzu gehören flüssigchromatographische Methoden wie die klassische Säulenchromatographie (LC) an verschiedenen stationären Phasen (Kieselgel, Aluminiumoxid), die adsorptive Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (SEC) und die präparative Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) an modifizierten Kieselgelen (RP-8, RP-18, CN, DIOL).

In den letzten Jahren gewannen auch verteilungschromatographische Techniken zur Reinigung von polaren Prekursoren, die auf dem System der Gegenstrom-Verteilungschromatographie („Countercurrent Chromatographie“, CCC) beruhen, an Bedeutung. Dabei werden die Einzelkomponenten einer Mischung aufgrund unterschiedlicher Verteilung zwi-



schen zwei nicht mischbaren Flüssigkeitsphasen entsprechend dem Nernst'schen Verteilungssatz und dem Prinzip der multiplikativen Verteilung nach Craig aufgetrennt (Conway, 1990; Thiébaud und Rosset, 1993; Marston und Hostettmann, 1994; Winterhalter *et al.*, 1998). Man unterscheidet bei den Countercurrent-Techniken nach ihrer Funktionsweise – zur Mischung und Entmischung des Zweiphasen-Lösungsmittelsystem - zwischen hydrostatischen (Ausnutzung der Schwerkraft) und hydrodynamischen (Ausnutzung der Zentrifugalkraft) Verfahren. Zu ersteren zählt man die „Droplet Countercurrent Chromatography“ (DCCC) und die „Rotation Locular Partition Chromatography“ (RLCCC), zu letzteren die „High Performance Centrifugal Partition Chromatography“ (HPCPC) und die „Multilayer Coil Countercurrent Chromatography“ (MLCCC). Die neueren Entwicklungen im Bereich der Gegenstrom-Verteilungschromatographie konzentrieren sich sowohl auf „high speed“ Trennungen als auch auf Isolierung von Verbindungen im Gramm-Maßstab (Degenhardt und Winterhalter, 2001).

### *Strukturaufklärung und Charakterisierung*

Die anschließende Strukturaufklärung der so teilweise oder vollständig gereinigten Prekursoren kann wiederum auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durch geeignete Derivatisierungsverfahren (siehe oben) können die nichtflüchtigen, polaren Prekursoren der Kapillargaschromatographie (HRGC) zugänglich gemacht und durch Kopplung mit empfindlichen und selektiven Detektionsmethoden (z.B. Massenspektrometrie) charakterisiert werden. Daneben lassen sich die Prekursoren aber auch in nativem Zustand mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und entsprechender Detektion [Ultraviolett (UV), „Electric Light Scattering Detector“ (ELSD), Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)] analysiert werden. Neben der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS), deren analytische Möglichkeiten in Kapitel 1.3.2 (Teil B, Ergebnisse und Diskussion) schon dargelegt worden sind, kommt der Detektion mittels ELSD für Routinemessungen – in der optimalen Ausstattung noch in Serienschaltung mit einem UV-Detektor – besondere Bedeutung zu.

Im Folgenden soll die Funktionsweise des „Electric Light Scattering Detektors“ (ELSD) kurz erläutert werden. Im ELSD wird der Säuleneffluent in einer Venturidüse durch Zuführung eines Gasstroms versprüht, in der sich anschließenden Vernebelungskammer werden große Tropfen abgeschieden, und das aus kleineren Tropfen bestehende Aerosol gelangt in das beheizte Verdampferrohr. Dort wird das Lösungsmittel verdampft und die als Mikropartikel vorliegenden Analytmoleküle werden vom Gasstrom in die Detektionskammer transportiert und mit polychromatischem Licht bestrahlt. Die Intensität des entstehenden Streulichts wird mit Hilfe eines Photomultipliers in einem Winkel von 45° bis 120° gemessen. Dieser Detektor

spielt zur universellen, unspezifischen Detektion von höhersiedenden Verbindungen, die z.B. Zuckereinheiten beinhalten (wie die hier zu analysierenden Prekursoren), eine wichtige Rolle. Der Brechungsindexdetektor (RI) als Alternative zum ELSD scheidet oft wegen seiner zu geringen Empfindlichkeit und der Inkompatibilität mit Fließmittelgradienten für komplexe Trennaufgaben aus.

Durch Freisetzung der Aglykone mittels Säure- oder Enzymzusatz lassen sich sowohl das Aglykon als auch die Zuckereinheit nochmals getrennt voneinander analysieren, um beispielsweise Aufschluss über die Konfiguration eines chiralen Aglykons mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) zu erhalten. Bei diesen Methoden ist jeweils erforderlich, die erhaltenen Analyseergebnisse mit den Daten entsprechender Referenzverbindungen abzugleichen, d.h. ggf. durch die Synthese authentischer Referenzen abzusichern.

Eindeutige Aussagen über die Struktur einer isolierten oder synthetisierten Verbindung erlangt man schließlich nur durch spektroskopische Untersuchungen, wobei hier neben der Tandemmassenspektrometrie vor allem der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR) besondere Bedeutung zukommt. Neben den eindimensionalen Meßmethoden stehen zweidimensionale Techniken (HMQC, HMBC, COSY) sowie spezielle Methoden wie TOCSY-Experimente zur Verfügung, um die genaue Konstitution einer Verbindung zu ermitteln. Die Möglichkeiten, die die Kernresonanzspektroskopie speziell zur Identifizierung von Prekursoren, bei denen das Aglykon an eine Zuckereinheit gebunden ist, bereitstellt, sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Von besonderer Bedeutung für die Strukturaufklärung von glykosidisch gebundenen Vorläufern ist neben den COSY-Methoden ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ - korrelierte Messungen) und der NOE-Differenzspektroskopie (Änderung der Intensitäten bei Entkopplungsexperimenten, liefert Aussagen zu stereochemischen Eigenschaften von Molekülen) der sog. Glykosilierungseffekt. Eine Glykosilierung wirkt sich auf die chemische Verschiebung bestimmter  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des Aglykons sowie des Zuckerrestes aus: Normalerweise erfahren die Resonanzen derjenigen Kohlenstoffatome, welche an der glykosidischen Bindung direkt beteiligt sind, eine Tieffeldverschiebung, während gleichzeitig die benachbarten Kohlenstoffatome in geringerem Maße hochfeldverschoben werden. Die Tieffeldverschiebung des *O*-glykosidisch gebundenen Kohlenstoffatoms des Aglykons bewegt sich zwischen 7 und 10 ppm (Kasai *et al.*, 1977; Mizutani *et al.*, 1980; Paulsen *et al.*, 1985). Das Ausmaß der Tieffeldverschiebung des Zucker-Kohlenstoffatoms ist von der Struktur des Aglykons abhängig und nimmt normalerweise in der Reihenfolge primärer, sekundärer und tertiärer Alkohol ab

(Gorin und Mazurek, 1976; Kasai *et al.*, 1977; Kasai *et al.* 1979; Mizutani *et al.*, 1980). Die Glykosilierung einer Zucker-Hydroxygruppe macht sich in entsprechenden Verschiebungen bemerkbar.

Tab. 7: Zusammenstellung ein- und zweidimensionaler NMR Methoden und ihre Aussagefähigkeit im Hinblick auf Strukturinformation bei der Identifizierung von an Zuckereinheiten gebundenen Aromastoffen (nach Pawan, 1992, verändert).

Strukturinformation	NMR Methode
Anzahl der Zuckereinheiten	- Integriertes 1D $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum - $^{13}\text{C}$ NMR-Spektrum - 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY <sup>a</sup> - 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY <sup>a</sup>
Konstitution der Monosaccharide	- Chemische Verschiebungen im $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR - Vicinale Kopplungskonstanten im $^1\text{H}$ -NMR - 2D COSY - TOCSY <sup>b</sup> Experimente - $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ COSY
Konfiguration am anomeren C-Atom	- Chem. Verschiebungen + Kopplungskonst. im $^1\text{H}$ -NMR - Chem. Verschiebungen im $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungskonst. - NOE <sup>c</sup> -Messungen
Art der Verknüpfung, Position von Seitengruppen	- Chemische Verschiebungen im $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR - NOE-Messungen - Long-range Messungen

<sup>a</sup> COSY = Correlated spectroscopy; <sup>b</sup> TOCSY = Total correlation spectroscopy; <sup>c</sup> NOE = Nuclear Overhauser effect (enhancement).

Bei phenolischen Verbindungen führt eine Glykosilierung normalerweise zu einer Hochfeldverschiebung des ipso-Kohlenstoffatoms, während die Resonanzen der Kohlenstoffatome in ortho- und para-Stellung zum glykosilierten Kohlenstoffatom zu tieferem Feld verschoben werden (Agrawal und Bansal, 1989). Durch den Vergleich der Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum eines Glykosids mit denen des freien Aglykons bzw. Zuckers lassen sich sowohl die Verknüpfungsstelle zwischen Aglykon und Zuckereinheit als auch diejenigen zwischen eventuell vorhandenen Zuckeruntereinheiten (z.B. bei Disaccharidglykosiden) bestimmen.

Neben dem Glykosilierungseffekt spielen für die Bestimmung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom auch die vicinalen H,H-Kopplungskonstanten  $J_{\text{H,H}}$ , die neben Substituenteneinflüssen im Wesentlichen vom Molekülbau abhängen, eine wichtige Rolle. So besit-

zen die Kopplungskonstanten  $J_{1H,2H}$  von trans-diaxialen Protonen H-1<sub>axial</sub>/H-2<sub>axial</sub> in Pyranosen Werte zwischen 6,9 und 8,3 Hz ( $\beta$ -D-Glucose,  $\beta$ -D-Xylose,  $\beta$ -D-Galactose und  $\alpha$ -L-Arabinopyranose), während Kopplungen der anomeren Formen H-1<sub>äquatorial</sub>/H-2<sub>axial</sub> bei Werten zwischen 3,5 und 3,8 Hz und diejenigen der anomeren Formen H-1<sub>axial</sub>/H-2<sub>äquatorial</sub> bei Werten zwischen 1,1 und 1,2 Hz liegen. Die Kopplungskonstanten von benachbarten diäquatorialen Protonen H-1<sub>äquatorial</sub>/H-2<sub>äquatorial</sub> betragen ungefähr 2,0 Hz ( $\alpha$ -L-Rhamnose,  $\alpha$ -L-Mannopyranose) (Massiot *et al.*, 1990).

### 2.2.3 Isolierung von Zucker-gebundenen Aromavorstufen aus Rohkaffee

#### 2.2.3.1 Aglykon-Analytik mittels Simultaner Destillation-Extraktion (SDE)

Um einen Überblick über die in Rohkaffee enthaltenen gebundenen Aromaprekursoren zu erhalten, wurde mittels zweistufiger Simultaner Destillation-Extraktion (SDE) und anschließender Analytik der erhaltenen Extrakte mittels HRGC-MS zwischen den originär „frei“ vorhandenen Aromastoffen und den infolge Säurekatalyse freigesetzten unterschieden. Dazu wurde eine definierte Menge an geschroteten grünen Bohnen (Provenienz Äthiopien K1) in der ersten Stufe der SDE bei pH 7,0 / 110°C für zwei Stunden (originär „frei“ vorhandene Aromastoffe) und anschließend in der zweiten Stufe der SDE bei pH 2,5 / 110°C für weitere zwei Stunden (durch Säurekatalyse freigesetzte Aromakomponenten) in einer modifizierten Likens-Nickerson Apparatur (Schultz *et al.*, 1977) extrahiert. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der HRGC-MS-Analytik der erhaltenen Extrakte im Vergleich.

Im Gegensatz zu Arbeiten, die in den vergangenen Jahren in unserem Arbeitskreis an diversen Früchten und Blättern durchgeführt worden sind und sich ebenfalls mit der Isolierung und Identifizierung von Aromastoffprekursoren beschäftigen (z.B. Aromastoff-Glykokonjugate in Papaya- und Quittenfrüchten, Winterhalter, 1988a; Glykokonjugate von Aromastoffen in Himbeeren, Pabst, 1991; Aromastoff-Glykokonjugate in Brombeeren, Humpf, 1992), waren bei der HRGC-MS-Analyse eines SDE-Extraktes (nach Freisetzung der gebundenen Komponenten durch Säurekatalyse) aus Rohkaffee nur relativ wenige Verbindungen zu detektieren.

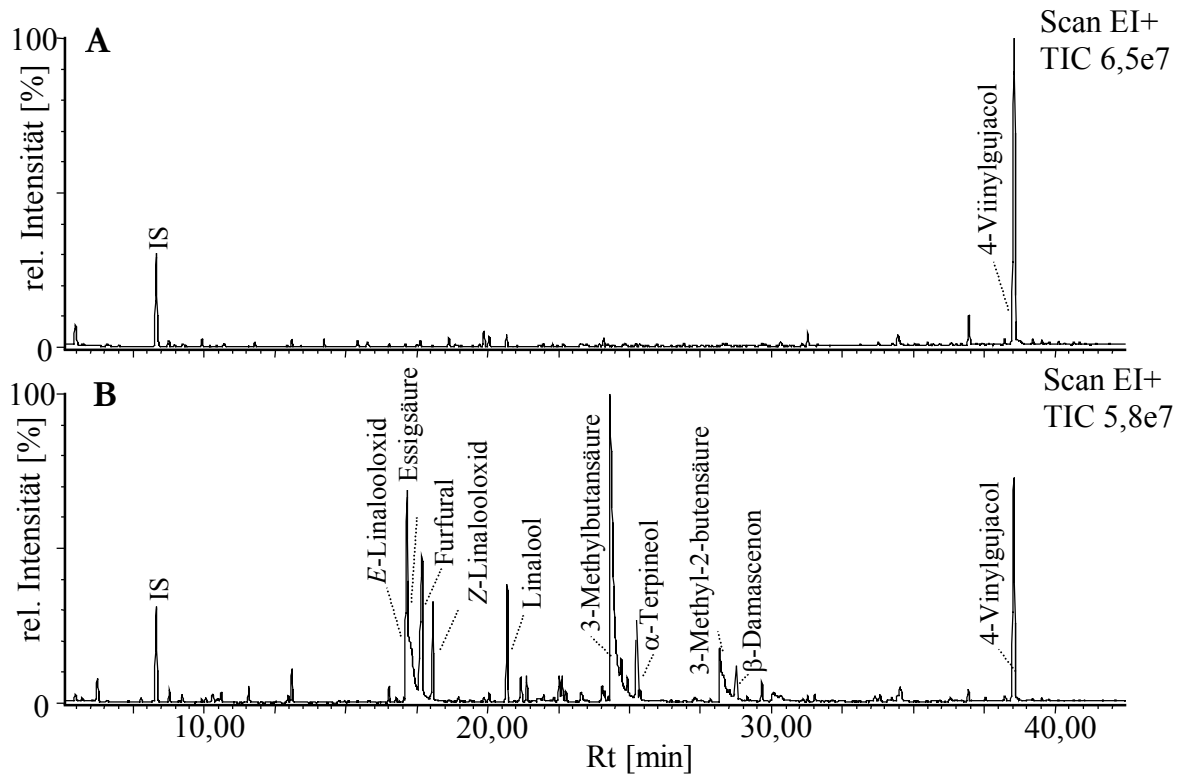


Abb. 31: HRGC-MS Chromatogramme von SDE-Extrakten aus Rohkaffee; **A**: Extrakt 1. Stufe (bei pH 7,0) zeigt die originär vorhandenen Aromakomponenten; **B**: Extrakt 2. Stufe (bei pH 2,5) zeigt die infolge Säurebehandlung freigesetzten Aromastoffe; IS = Interner Standard (2-Heptanon) zur halbquantitativen Auswertung; Identifizierung mittels Referenzmassenspektren und linearen Retentionsindices. Kapillarsäule HRGC-MS #1, Temperaturprogramm HRGC-MS #1.

Neben dem Erhitzungsprodukt Furfural (Entstehung z.B. durch Einwirkung von Säure und Temperatur auf Pentosen, Ames *et al.*, 2001) wurden aus der Reihe der Terpene die Monoterpenalkohole Linalool und  $\alpha$ -Terpineol sowie die beiden furanoiden Linalooloxide (*E*- und *Z*-), aus der Gruppe der  $C_{13}$ -norisoprenoiden Verbindungen  $\beta$ -Damascenon und schließlich die kurzkettigen Säuren Essigsäure, 3-Methylbuttersäure und 3-Methyl-2-butensäure nachgewiesen.

Für die detektierten Linalooloxide bzw. für  $\alpha$ -Terpineol sind glykosidisch gebundene Formen u.a. in schwarzem Pfeffer (Menon *et al.*, 2001), Trauben (Oliveira *et al.*, 2000) und Piment (Kikuzaki *et al.*, 2000) beschrieben. Die beiden freigesetzten Aglykone *E*- und *Z*-Linalooloxid können aber auch sekundär aus dem von Williams *et al.* (1980) erstmals beschriebenen Hotrienol gebildet werden. Beim Erhitzen von Hotrienol entstehen ausschließlich die furanoiden Linalooloxide. Als weiterer Vorläufer wird das instabile 6,8-Epoxy-linalool diskutiert

(Winterhalter, 1988a), aus dem allerdings auch die pyranoiden Linalooloxide entstehen können. Hinsichtlich des Auftretens von  $\alpha$ -Terpineol ist zu berücksichtigen, dass diese Verbindung unter dem Einfluss von Säure aus Linalool (säurekatalysierte Umlagerung) entstehen kann (Winterhalter, 1988a).

Daneben sind als Minorkomponenten Geraniol, Nerol und 2-Phenylethanol festgestellt worden; diese Aglykone wurden jedoch wegen ihrer geringen Konzentration in den weiteren Studien nicht berücksichtigt. Auch 4-Vinylguajacol, das als Produkt des Phenylpropanstoffwechsels anzusehen ist und unter den gegebenen Analysenbedingungen wahrscheinlich durch Decarboxylierung im Injektor des Gaschromatographen aus Ferulasäure entstanden ist (Kováčik *et al.*, 1969), wurde in die Untersuchungen über Aromastoffvorläufer nicht miteinbezogen, da – wie aus der Abbildung ersichtlich ist – sich die Konzentration des „freien“ 4-Vinylguajacols (bzw. Ferulasäure) nur unwesentlich von der des freigesetzten Anteils unterschied.

Für die Untersuchungen Zucker-gebundener Aromastoffvorläufer in Rohkaffee sind schließlich von uns Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure ausgewählt worden. Linalool-Glykoside sind in der Natur weit verbreitet (Stahl-Biskup, 1987). Auch in unserem Arbeitskreis sind bereits Mono- und Disaccharidglykoside von Linalool z.B. in der Lulo Frucht (*Solanum vertissimum* D.) und in Himbeeren (*Rubus idaeus* L.) nachgewiesen worden (Suarez *et al.*, 1991; Pabst *et al.*, 1991a). Bezüglich der beiden genannten C<sub>5</sub>-Säuren sind keine Aromastoff-Prekursoren beschrieben, bei denen die Säuren funktionell an ein Mono-, Di- oder Oligosaccharid gebunden sind.

### 2.2.3.2 Herstellung eines Rohextraktes

Die Anreicherung der an Zuckereinheiten gebundenen Aromastoffvorläufer aus einem Lösungsmittlextrakt erfolgt üblicherweise an RP-18 oder XAD-2 Material. Dementsprechend wurde eine definierte Menge mit einer Schrotmühle zerkleinerter grüner Kaffeebohnen (Provenienz Äthiopien K1) nach dem Entfetten mit Petrolether (Sdp. 30-50°C) zweimal hintereinander während 24 h mit einer aus 70 % Methanol und 30 % Wasser (v/v) bestehenden Extraktionslösung behandelt. Die Suspension zeigte einen pH-Wert von 6 bis 6,5, auf eine zusätzliche Enzyminhibierung wurde deshalb verzichtet. Nach Abtrennen des Extraktes durch Filtration wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt; die verbleibenden Rückstände wurden

mittels Lyophilisation vollständig vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Pulver ist mit wenig Wasser wieder aufgenommen worden; die Lösung wurde auf eine vorkonditionierte XAD-2-Säule aufgebracht. Nach dem Auswaschen von polaren Substanzen (z.B. Zucker, Aminosäuren, Salze) mit Wasser sowie anschließender Diethyletherextraktion zur Entfernung verbliebener Anteile an freien Aromastoffen wurde ein (Glykosid-)Rohextrakt durch Elution mit Methanol gewonnen. Nach Abtrennen des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfer erfolgte Lyophilisierung.

### 2.2.3.3 Enzymatische Hydrolyse

Um die mittels SDE erhaltenen Ergebnisse im Hinblick auf die Bindungsart der Vorläufer näher zu untersuchen, wurden mit verschiedenen Enzympräparaten Hydrolysen durchgeführt. Aus früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises (Pabst, 1991; Humpf, 1992; Roscher, 1998) und anderen Studien (Gunata *et al.*, 1985; 1988; 1990) geht hervor, dass nicht alle Enzyme Prekursoren, bei denen der Nichtzuckeranteil über eine glykosidische oder eine Esterbindung mit der Zuckereinheit verknüpft ist, in gleichem Ausmaß hydrolysieren. Aus der Art des verwendeten Enzymsystems können im Übrigen auch Rückschlüsse auf die Art der Verknüpfung zwischen Aglykon und Zuckereinheit gezogen werden.

Verwendet wurden einerseits Enzympräparate, die im Wesentlichen nur eine Aktivität aufwiesen ( $\alpha$ -Mannosidase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase; Tabelle 8) und andererseits technische Enzymmischungen (Rohapect® VRF, MB, D5L, 10L, B1L, MA, PL; Tabelle 8). Bei diesen Rohapect®-Mischungen handelt es sich um Pektinasen, die bei der kommerziellen Fruchtsaftherstellung zur Klärung von Säften verwendet werden und – je nach Art der Mischung – neben pektinolytischen Aktivitäten diverse, nicht näher spezifizierte „Nebenaktivitäten“ (z.B. Glucosidasen, Esterasen) besitzen. Solche Rohapect®-Mischungen wurden in der Vergangenheit schon mehrfach erfolgreich in unserem Arbeitskreis zur Spaltung von Glykosiden verwendet (Pabst *et al.*, 1991b; Humpf, 1992; Roscher, 1998).

Tab. 8: Enzyme und Enzymmischungen zur enzymatischen Hydrolyse gebundener Prekursoren in Rohkaffee und die für ausgewählte freigesetzte Aromastoffe mittels HRGC-MS-Analytik erhaltenen Ergebnisse.

Enzympräparat	Bedingungen	Linalool <sup>c</sup>	3-Methylbutansäure <sup>c</sup>	3-Methyl-2-butensäure <sup>c</sup>
$\alpha$ -Mannosidase	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	-	-
$\beta$ -Galactosidase	PP <sup>b</sup> pH 5,5	-	+	+
$\beta$ -Glucosidase	PP <sup>b</sup> pH 7,0	-	++	++
$\beta$ -Glucuronidase	PP <sup>b</sup> pH 5,5	-	++	++
RHP <sup>a</sup> MB	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	++	+
RHP <sup>a</sup> VRF	PP <sup>b</sup> pH 5,5	++	+++	+++
RHP <sup>a</sup> D5L	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	+	+
RHP <sup>a</sup> 10L	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	++	+
RHP <sup>a</sup> B1L	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	++	++
RHP <sup>a</sup> MA	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	++	++
RHP <sup>a</sup> PL	PP <sup>b</sup> pH 5,5	+	+	-

<sup>a</sup> RHP = Rohapect®; <sup>b</sup> PP = Phosphatpuffer; <sup>c</sup> Konzentrationsbereiche pro 100 mg pulverisiertem (Glykosid-) Rohextrakt (halbquantitative Abschätzung über internen Standard 2-Heptanon ohne Berücksichtigung von Responsefaktoren): - = nicht detektiert, + = 10 - 25  $\mu$ g, ++ = 25 - 50  $\mu$ g, +++ = > 50  $\mu$ g.

Für die enzymatische Hydrolyse wurde eine definierte Menge des lyophilisierten (Glykosid-) Rohextraktes in einem dem jeweiligen Enzymsystem angepassten Puffersystem mit dem Enzym versetzt. Nach Zeit- und Temperatur-definierter Inkubation erfolgte die Extraktion mit nachfolgender HRGC-MS-Analyse der freigesetzten Aromastoffe. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verwendeten Enzympräparate und die Ergebnisse der HRGC-MS-Analytik der Diethyletherextrakte (halbquantitative Auswertung, für die „Zielkomponenten“ Linalool, 3-Methylbutansäure, 3-Methyl-2-butensäure).

Wie die Zusammenstellung in Tabelle 8 zeigt, ergaben sich Unterschiede im Hinblick auf die enzymatisch-hydrolytische Freisetzung der Zielkomponenten Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure. Als besonders geeignet erwies sich Rohapect® VRF; dieses Enzympräparat ist deshalb im Verlauf der weiteren Reinigungsschritte zur Kontrolle der einzelnen Fraktionen verwendet worden.



#### **2.2.3.4 Vorfraktionierung des Rohextraktes mittels „Countercurrent Chromatographie“ (MLCCC) und diskontinuierlicher Kieselgel-Säulenchromatographie (LC-RP18)**

Für eine erste Reinigung des (Glykosid-) Rohextraktes standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Zunächst wurden die Vorreinigung mittels MLCCC und die diskontinuierliche Chromatographie an Kieselgel parallel durchgeführt und miteinander verglichen. Bei der MLCCC ist von Vorteil, dass die zu trennenden Komponenten nur mit Lösungsmittel und Teflon in Berührung kommen, d.h. potentielle Artefaktbildung durch Kontakt mit Glas- oder metallischen Oberflächen vermieden wird. Aufgrund fehlender adsorptiver Effekte läuft die MLCCC nahezu verlustfrei ab, da am Ende der Chromatographie auf der stationären Phase (Flüssigkeit) befindliche Substanzen leicht wiedergewonnen werden können. Dagegen zeichnet sich die Säulenchromatographie dadurch aus, dass bei entsprechend großen Glassäulen einem Up-scaling nahezu keine Grenzen gesetzt sind, wodurch in einem Arbeitsgang eine große Menge einer komplexen Mischung aufgereinigt werden kann.

Eine Vorfraktionierung des (Glykosid-) Rohextraktes (verwendet wurden 3 g) und Abtrennung eines Großteils störender Begleitsubstanzen wurde mit dem Einsatz der präparativen MLCCC mit dem Lösungsmittelsystem Chloroform–Methanol–Wasser erreicht. Auf den Einsatz eines UV-Detektors wurde verzichtet, da die Zielsubstanzen nicht im UV-Bereich detektierbar waren. Die Überprüfung der gesammelten Fraktionen erfolgte off-line mittels HPLC-UV/ELSD an einer Umkehrphase (das Gerät war mit der Kombination UV und ELSD ausgestattet, im Folgenden wird deshalb diese Versuchsanordnung in der Formulierung beibehalten). Fraktionen, die gleiche Komponenten beinhalteten, wurden vereinigt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand lyophilisiert. Anschließend sind die lyophilisierten Extrakte mittels enzymatischer Hydrolyse und HRGC-MS untersucht worden. Abbildung 32 zeigt, in welchen Fraktionen der MLCCC die Vorläufer der interessierenden Aromastoffe enthalten waren.

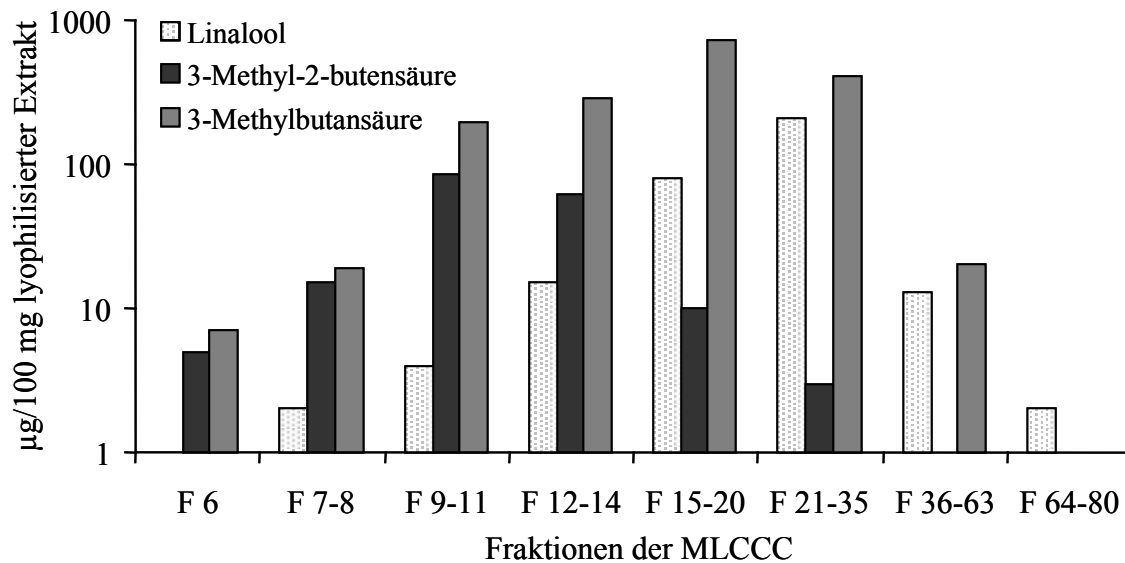


Abb. 32: Verteilung der Vorläufer von Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure in den Fraktionen der MLCCC; die Graphik zeigt das Ergebnis der Analytik der Extrakte aus den enzymatischen Umsetzungen mittels HRGC-MS; insgesamt wurden 150 Fraktionen (zu je 20 ml) gesammelt.

Parallel zur Vorfraktionierung des (Glykosid-) Rohextraktes mittels MLCCC erfolgte eine LC-Reinigung im präparativen Maßstab an Kieselgel. Dazu wurden 30 g des lyophilisierten (Glykosid-) Rohextraktes (10-fache Menge im Vergleich zur MLCCC) mit einer definierten Menge an trockenem Kieselgel vermischt und auf eine schon vorbereitete Kieselgelsäule (trocken, nicht angeschlämmt) aufgegeben. Danach erfolgte diskontinuierlich die Elution mit einem Lösungsmittelgradienten (Hexan–Chloroform-Dichlormethan-Ethylacetat–Methanol–Wasser) von unpolar nach polar. Auch hier wurden die gesammelten Fraktionen mittels HPLC-UV/ELSD analysiert, Fraktionen mit vergleichbarer Komponentenverteilung wurden vereinigt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand lyophilisiert.

Anschließend untersuchte man die Extrakte mittels enzymatischer Hydrolyse und HRGC-MS. Abbildung 33 zeigt, in welchen Fraktionen der diskontinuierlichen Kieselgelfraktionierung die Vorläufer der interessierenden Aromastoffe enthalten waren.

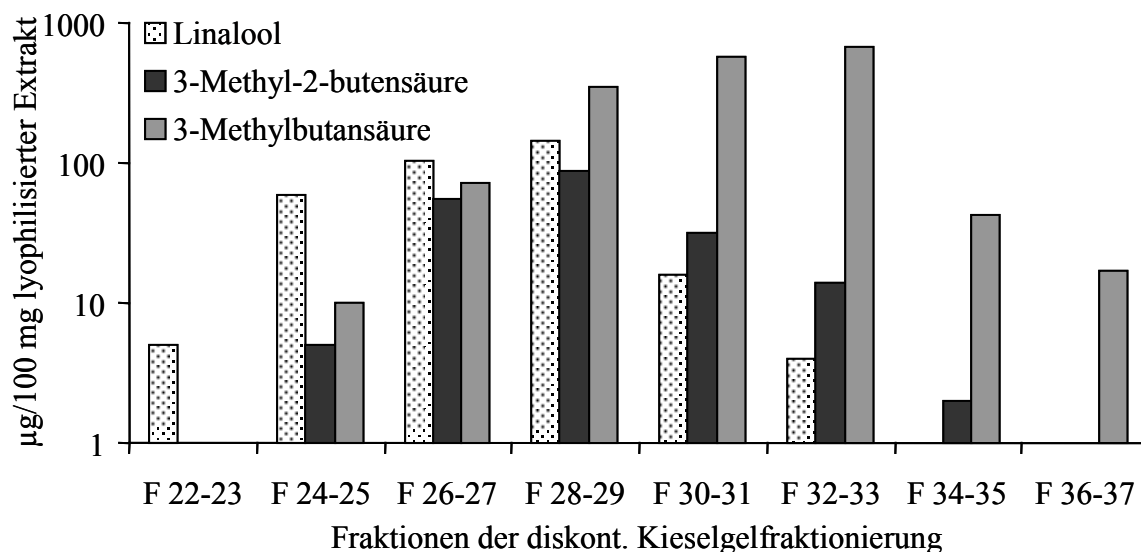


Abb. 33: Verteilung der Vorläufer von Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure in den Fraktionen der diskontinuierlichen Kieselgelfraktionierung; die Graphik zeigt das Ergebnis der Analytik der Extrakte aus den enzymatischen Umsetzungen mittels HRGC-MS; insgesamt wurden 37 Fraktionen (zu je 250 ml) gesammelt.

Wie die Abbildungen 32 und 33 zeigen, sind sowohl mit der MLCCC als auch mit der diskontinuierlichen Fraktionierung an Kieselgel Fraktionen erhalten worden, in denen Vorläufer von Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure angereichert waren. Während bei der MLCCC die Elution des/der Linaloolprekursor(s) im Vergleich zu den Prekursor(en) der beiden C<sub>5</sub>-Säuren nach späteren Fraktionen hin verschoben war, eluierten die Linaloolvorläufer bei der Kieselgelfraktionierung in den vorderen Fraktionen.

Insgesamt ist jedoch bei keiner der beiden Varianten eine ausreichende Trennung der Prekursor(en) der drei Zielaromastoffe erzielt worden. Trotzdem gelang es, einen großen Teil störender Begleitsubstanzen wie Coffein, Chlorogensäuren und Farbstoffe abzutrennen. Da die für die MLCCC verwendete Suspension des (Glykosid-) Rohextraktes eine sehr viskose und klebrige Konsistenz aufwies, ließen sich trotz Verwendung der präparativen Anlage nur 3 g des Rohextraktes in einem Durchgang (Dauer 8 h) auftrennen. Bei der diskontinuierlichen Kieselgelfraktionierung (Dauer 10 h) hingegen wurden in einem Ansatz 30 g des Rohextraktes gereinigt. Ausgehend von den vereinigten Fraktionen F28-29 (Kieselgelfraktionierung) sind dann weitere Reinigungsschritte durchgeführt worden.

Da mit den beiden ersten Vorreinigungsschritten die Prekursor(en) der Zielverbindungen Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure zwar von störenden Begleitsubstanzen

abgetrennt worden sind, die Trennung der einzelnen Vorläufer jedoch nur unvollständig erfolgt war, wurde im Anschluss an die Reinigung mittels Kieselgel eine „reversed phase“ Chromatographie im präparativen Maßstab an RP-18 Material durchgeführt. Auch bei diesem Analysenschritt wurden die gesammelten Fraktionen mittels HPLC-UV/ELSD analysiert, Fraktionen mit vergleichbarer Komponentenverteilung wurden vereinigt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand lyophilisiert. Anschließend sind die Extrakte mittels enzymatischer Hydrolyse und HRGC-MS untersucht worden. Abbildung 34 zeigt, in welchen Fraktionen die Vorläufer der interessierenden Aromastoffe enthalten waren.

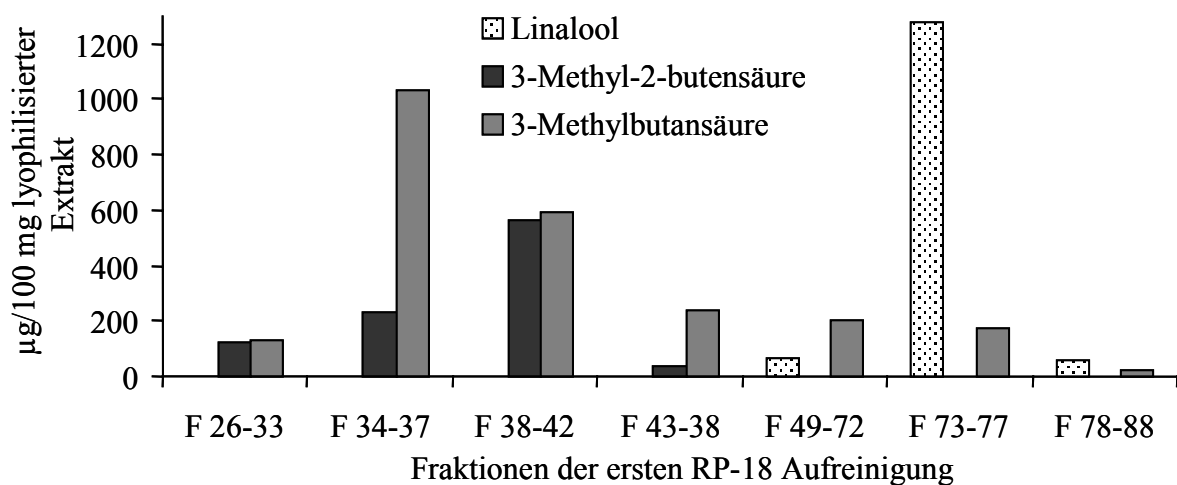


Abb. 34: Verteilung der Vorläufer von Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure in den Fraktionen der LC-RP-18 (<sup>LC</sup>RP-18) Chromatographie; die Graphik zeigt das Ergebnis der Analytik der Extrakte aus den enzymatischen Umsetzungen mittels HRGC-MS; insgesamt wurden hier 145 Fraktionen gesammelt.

Wie aus Abbildung 34 hervorgeht, ist mit dem ersten Reinigungsschritt an RP-18 Material eine Trennung zwischen dem/den Linalool-Prekursor(en) und denen der C<sub>5</sub>-Säuren erzielt worden. Für die weiteren Reinigungsschritte wurde an dieser Stelle für den/die Linalool-Prekursor(en) die Fraktion 73-77 (151 mg), für den-/diejenigen der 3-Methylbutansäure die Fraktion 34-37 (144 mg) und für den/die Vorläufer der 3-Methyl-2-butensäure die Fraktion 38-42 (121 mg) ausgewählt.

### 2.2.3.5 Entwicklung geeigneter Bedingungen zur Analyse von Aromastoffprekursoren mittels (HPLC-) Tandemmassenspektrometrie anhand von synthetisiertem Linalyl- $\beta$ -D-glucopyranosid

Die HPLC in Kopplung mit der Tandemmassenspektrometrie stellt ein analytisches Werkzeug dar, mit dem polare Strukturen – wie die hier zu charakterisierenden Prekursoren – in nativem Zustand analysiert werden können (siehe auch Kapitel 1.3.2, Teil B Ergebnisse und Diskussion). Neben der HRGC-MS-Analytik des (Glykosid-) Rohextraktes und der lyophilisierten Fraktionen nach enzymatischer Freisetzung der Aglykone sollte auch die HPLC-MS/MS eingesetzt werden, um schon im Verlauf der Reinigungsschritte einerseits die Prekursoren in den Extrakten zu lokalisieren und andererseits Informationen über die strukturelle Zusammensetzung der Vorläufer zu gewinnen. Wie oben erwähnt, stehen dabei verschiedene Ionisationstechniken (ESI negativ, ESI positiv, APCI) zur Verfügung.

Als Referenzverbindung für die Entwicklung geeigneter Analysenparameter bei der HPLC-MS/MS wurde Linalyl- $\beta$ -D-glucopyranosid ausgewählt, das im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurde. Neben der Orthoester-Methode (Paulsen, 1982), die zur Synthese der Glykoside von Steroid- und Triterpenalkoholen benutzt wird, der Oxyzolin-Methode (Lé-Nguyèn, 1984), die trans-Glucosamide liefert, und der Methode nach Rosemund (Hörster, 1979), die Phenolglucoside bildet, wird hauptsächlich die Koenigs-Knorr-Methode (Koenigs und Knorr, 1901; Ishag *et al.*, 1985; Paulsen *et al.*, 1985) zur Synthese von  $\beta$ -D-Glucosiden angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Referenzglucosid nach einer abgewandelten Koenigs-Knorr-Methode synthetisiert (Abbildung 34). Als Edukt diente kommerziell erhältliches 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosylbromid ( $\alpha$ -D-Acetobromglucose). Die Acetylreste dienen dabei als Schutzfunktion, um das Aglykon Linalool selektiv am C<sub>1</sub> des Pyranrings zu binden. Nach Wulff und Röhle (1974) ist bei den peracetylierten 1-Brom-halogenosen die Nachbarbeziehung der 2-Acyloxy-Gruppe mit dem C<sub>1</sub> für die stereoselektive Bildung von  $\beta$ -D-Glucosiden aus  $\alpha$ -D-Acetobromglucose verantwortlich. Die Reaktion wurde in Gegenwart des halogenbindenden Katalysators Silberoxid im wasserfreien Medium (Chloroform) durchgeführt. Die Entacetylierung des gebildeten 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranids fand durch Einwirkung einer Natriummethanolat-Lösung statt. Unter diesen Bedingungen sind die Acetale stabil, die Esterbindungen können aber hydrolysiert werden.

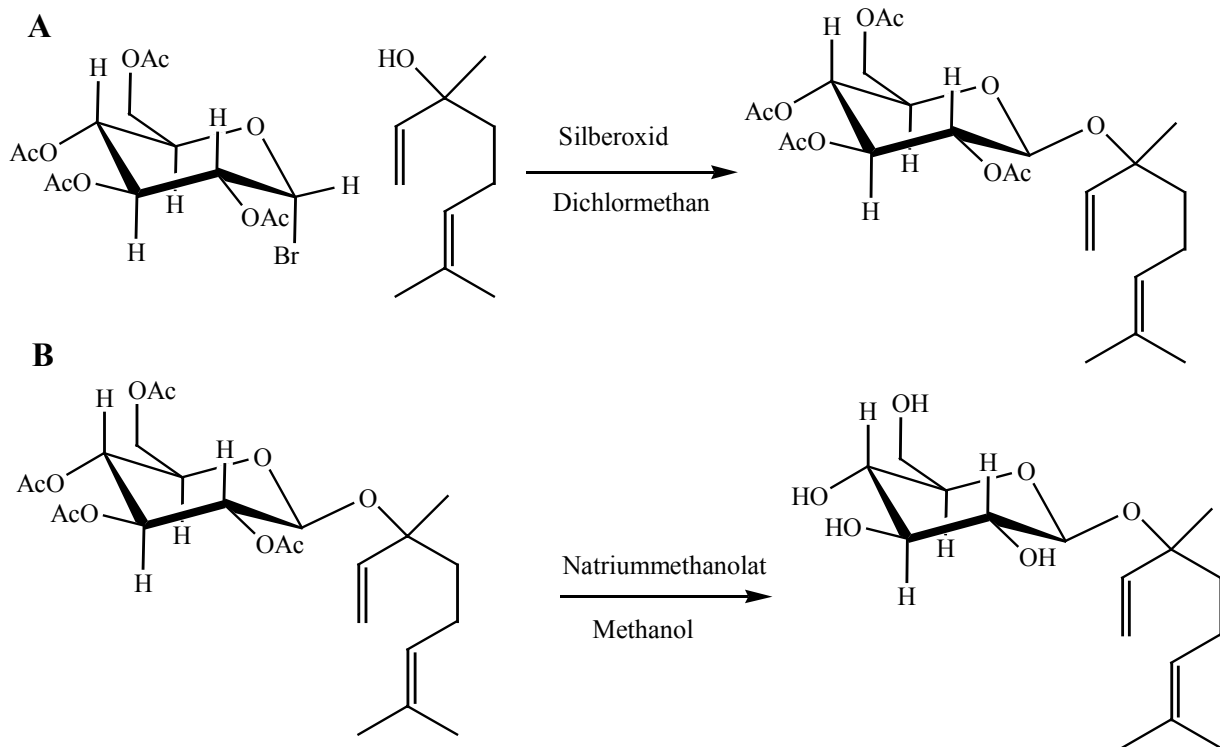


Abb. 34: Synthese von Linalyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid. **A**: Umsetzung von  $\alpha$ -D-Aceto-*rom*glucose mit Linalool in Anwesenheit des halogenbindenden Katalysators Silberoxid; **B**: Entacetylierung des Glucosids unter Aufrechterhaltung der Acetalbindung.

Das so synthetisierte Linalyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid wurde zur Entwicklung und Optimierung von Analysenbedingungen für die Tandemmassenspektrometrie verwendet. Verglichen wurden einerseits die Ionisation mittels Elektrospray (ESI) / positive Detektion und die Ionisation mittels ESI / negative Detektion als auch in beiden Modi die Verwendung von den Fließmittelsystemen Wasser–Acetonitril und Wasser (5 mM Ammoniumacetat  $\text{NH}_4\text{OAc}$ )–Acetonitril (5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ). Als optimal für die Produktionen-Experimente erwies sich die Kombination aus ESI mit negativer Detektion und einem Fließmittelsystem – bestehend aus Wasser (5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) und Acetonitril (5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) - bei einer Stoßenergie von 17 eV zur Aufnahme des Tochterionenspektrums (Abbildung 35).

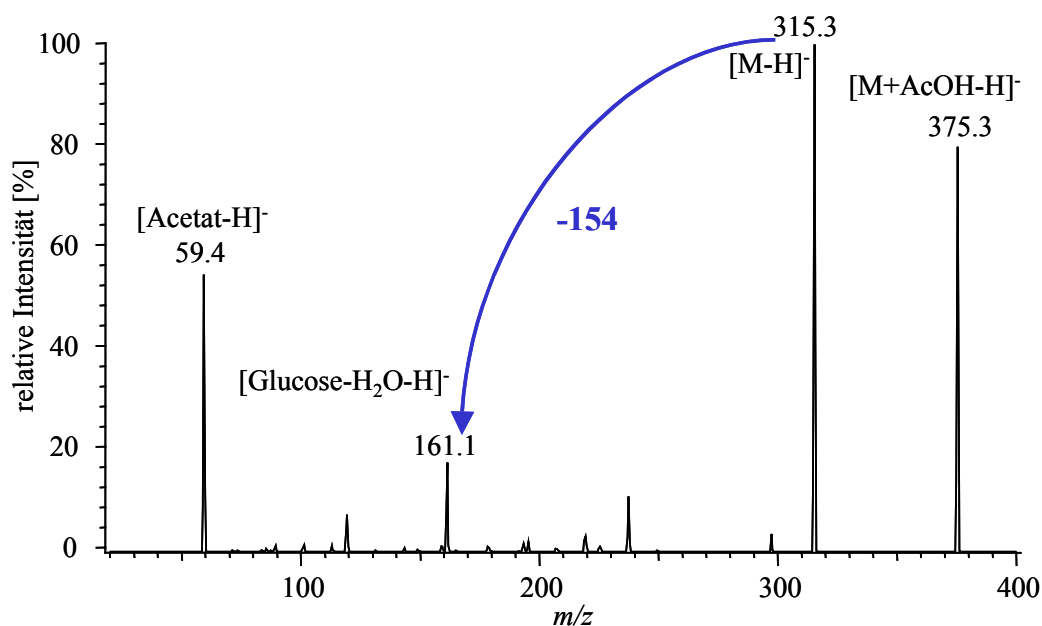


Abb. 35: ESI-Tochterionenspektrum von Linalyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid; Aufnahme im ESI negativ Modus, Prekursorion  $m/z$  375,3; Kollisionsenergie 17eV (1,8 mTorr Argon), Fließmittelsystem Wasser (5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ )–Acetonitril (5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ), „Loop“-Injektion; M = Molekülonenpeak.

Wie das Massenspektrum von Linalyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid zeigt, ist unter den angegebenen Bedingungen im „Full scan“-Modus ein Signal bei  $m/z$  375,3 detektiert worden, das als Acetat-Addukt des intakten Moleküls anzusehen ist. Dieses Addukt wurde als Prekursorion für die Tochterionen-Experimente benutzt; es zeigten sich dann bei einer Kollisionsenergie von 17 eV Argon unter Abspaltung der Acetateinheit das deprotonierte Molekülion  $m/z$  315,3 (Molekularmasse des Glucosids 316,4 g/mol), bei  $m/z$  161,1 die dehydratisierte und deprotonierte Glucoseeinheit und bei  $m/z$  59,4 die Acetateinheit aus dem Lösungsmittelsystem. Gleichzeitig wurde als Neutralverlust die Abspaltung der Linalool-Einheit (Verlust von  $m/z$  154, entsprechend der Molekularmasse von Linalool mit 154,15 g/mol) beobachtet. Die verwendeten Analysenbedingungen lieferten somit folgende Aussagen über das Glucosid: (i) im Full Scan Modus kann das Acetat-Addukt des intakten Moleküls detektiert werden, (ii) im Produktion-Scan Modus werden unter Anwendung einer bestimmten Kollisionsenergie das deprotonierte Molekül sowie die fragmentierte Zuckereinheit erfasst, und (iii) im Tochterionen-Modus wird die Abspaltung des Aglykons als Neutralverlust beobachtet.

Die (HPLC)-Tandemmassenspektrometrie wurde unter den beschriebenen Bedingungen im folgenden sowohl während der einzelnen Reinigungsschritte der Prekursoren als auch zur Strukturaufklärung der gereinigten Aromastoffvorläufer eingesetzt.

## 2.2.4 Isolierung und Identifizierung von zwei glykosidisch gebundenen Linalool-Prekursoren

### 2.2.4.1 Fraktionierung und Reinigung mittels „reversed phase“-Chromatographie

Die weitere Reinigung der bei der <sup>LC</sup>RP-18<sub>I</sub> erhaltenen Fraktion 73-77 wurde mittels präparativer HPLC an RP-8-Material (einmal präparative Säule) und RP-18-Material (zunächst präparative Säule, danach analytische Säule) durchgeführt (Abbildung 36). In Vorversuchen ist jeweils ermittelt worden, mit welcher der zur Verfügung stehenden Säulen (RP-8, RP-18, DIOL präparativ, RP-18, DIOL oder CN analytisch) sich eine maximale Auflösung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Komponenten erzielen ließ. Grundsätzlich war an dieser Stelle das RP-Material den DIOL- und CN-Phasen vorzuziehen.

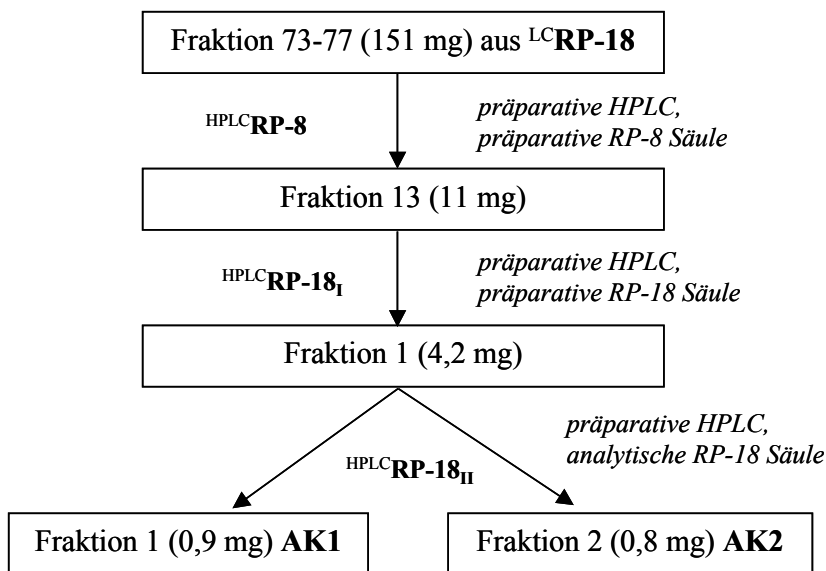


Abb. 36: Schema der Reinigungsschritte zur Isolierung von Linalool-Prekursoren durch Kombination verschiedener „reversed phase“-Chromatographieschritte.

Auf jeder Reinigungsstufe wurden die erhaltenen Fraktionen mittels HPLC-UV/ELSD kontrolliert, Fraktionen mit vergleichbarer Zusammensetzung wurden vereinigt, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Anschließend erfolgte die HRGC-MS-Kontrolle nach enzymatischer Aglykon-Freisetzung.



Nach Reinigung von F 73-77 aus <sup>LC</sup>RP-18 mittels einer präparativen RP-8 HPLC-Säule (<sup>HPLC</sup>RP-8) wurde eine Fraktion (F 13) erhalten, in der bei der Rechromatographie an einer analytischen RP-18 Säule (HPLC) nur eine Verbindung detektiert wurde (Abbildung 37, Peak bei  $R_t = 32,3$  min), die keine UV-Aktivität bei 254 nm zeigte und somit als potentieller Vorläufer von Linalool eingestuft wurde. Die zeitliche Verschiebung der beiden Detektorsignale zueinander verdeutlicht den Aufbau des verwendeten HPLC-UV/ELSD Systems. Die beiden Detektoren sind in Reihe geschaltet (1. Detektor UV-Spektralphotometer, 2. Detektor „Electric Light Scattering Detector“), so dass die Verbindungen vom ELSD zeitlich gering verzögert detektiert werden. Die Kontrolle des Extraktes mittels enzymatischer Hydrolyse und nachfolgender HRGC-MS-Analytik bestätigte die Freisetzung von Linalool aus der gereinigten Fraktion.

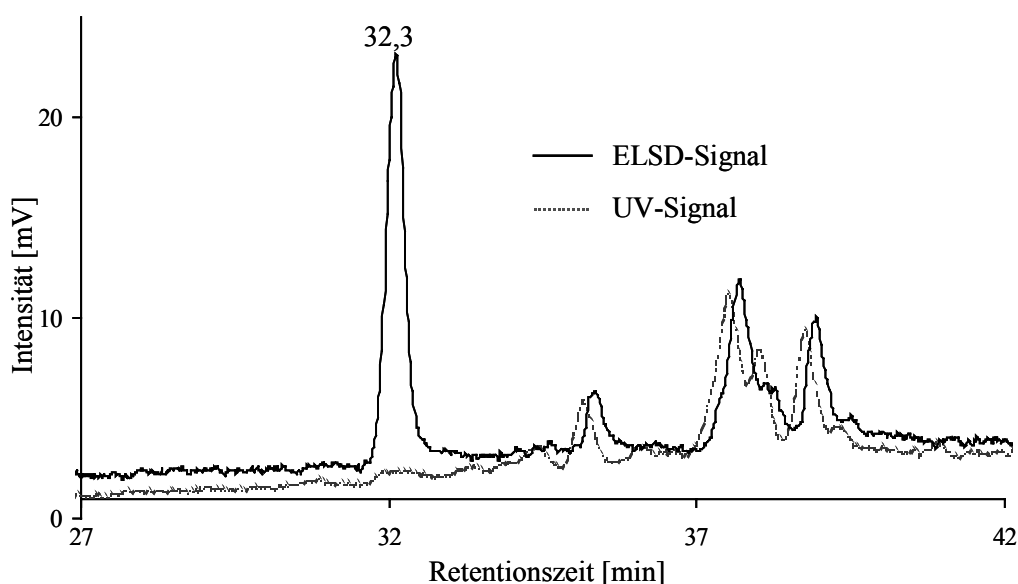


Abb. 37: Rechromatographie der Fraktion F 13 aus <sup>HPLC</sup>RP-8 an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #3) mittels HPLC-UV-ELSD; Signal bei 32,3 min konnte nur mit ELSD detektiert werden, zeigte bei 254 nm also keine UV-Aktivität und wurde als potentieller Vorläufer von Linalool eingestuft.

Auch die Fraktion F1 (enthält Verbindung mit  $R_t = 32,3$  min aus <sup>HPLC</sup>RP-8) aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> wurde mit einem sehr „flachen“ Wasser–Acetonitril–Gradienten (Analyt. Gradient #4) rechromatographiert. Es zeigte sich, dass bei der Reinigung an RP-8 Material zwei Verbindungen coeluierten (Abbildung 38), die erst in diesem Schritt getrennt werden konnten. Aufgrund der geringen Menge, die von F1 in <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> isoliert werden konnte, wurde die endgültige Reinigung der potentiellen Vorläufer von Linalool im analytischen Maßstab durchgeführt. Man erhielt so 0,9 mg von Fraktion 1 (= AK1) und 0,8 mg von Fraktion 2 (= AK2). Die Charaktere-

risierung der isolierten Vorläufer erfolgte anhand von Messungen mittels Tandemmassenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie.

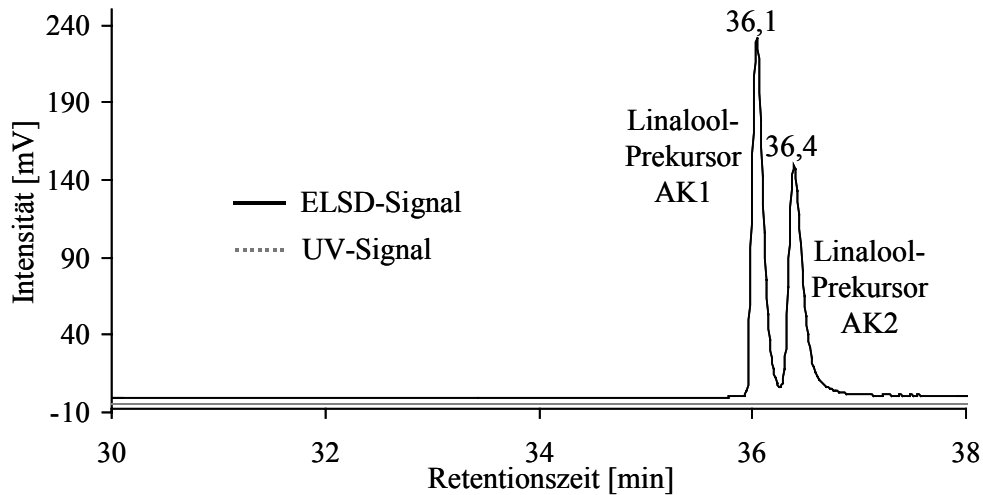


Abb. 38: Rechromatographie der Fraktion F1 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #4) mittels HPLC-UV/ELSD; Signale bei 36,1 und 36,4 min konnten nur mit ELSD detektiert werden, zeigten bei 254 nm also keine UV-Aktivität und wurden als potentielle Vorläufer von Linalool eingestuft.

#### 2.2.4.2 Enantiomerenanalytik von glykosidisch gebundenem Linalool mittels Multidimensionaler Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS)

Die Enantiomerenanalytik von in den beiden Prekursoren gebundenem Linalool erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse der Fraktion F1 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> mittels MDGC-MS. Als achirale Vorsäule diente eine polare Polyethylenglykolphase (DBWAX, Säulenummer #3), als chirale Phase zur Auftrennung der Enantiomere wurde eine modifizierte Cyclodextrinphase (Trennsäule #4) verwendet. Das MDGC-System wurde zur Detektion der Eluenten der zweiten Säule mit dem Massenspektrometer gekoppelt, wodurch die Identität der detektierten Verbindungen strukturselektiv zugeordnet werden konnte. Abbildung 39 zeigt die massenspektrometrischen Chromatogramme der Referenz (racemische Mischung aus *R*- und *S*-Linalool) und des Lösungsmittelextraktes aus der enzymatischen Umsetzung. Die Elutionsreihenfolge wurde anhand von enantiomerenreinen Referenzen mit (*R*) vor (*S*) bestimmt.

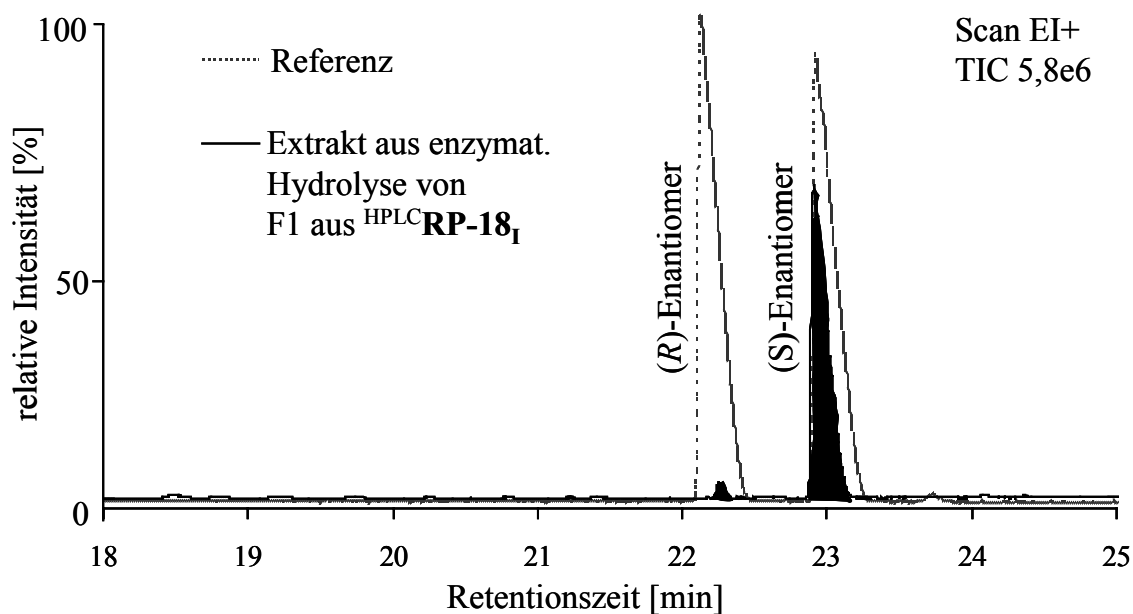


Abb. 39: MDGC-MS Chromatogramme (übereinanderliegend) der racemischen Referenz von Linalool und des Extraktes aus der enzymatischen Umsetzung von Fraktion F1 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> (Spur ist schwarz unterlegt); als chirale Phase wurde eine modifizierte Cyclodextrinphase verwendet (Säule #4, Temperaturprogramm #5); das Enantiomerenverhältnis für das freigesetzte Linalool wurde mit 4 % *R*- und 96 % *S*-Enantiomer bestimmt.

Wie Abbildung 39 zeigt, wurde aus der Fraktion F1 der <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> fast ausschließlich *S*-Linalool durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt. Der geringe Anteil an *R*-Enantiomer (4 %) ist durch Umlagerung des *S*-Enantiomers (96 %) zu erklären, bedingt durch den schwach sauren pH-Wert (5,5) während der enzymatischen Umsetzung (Dauer 24 h) (Kreis *et al.*, 1993). Da in der Fraktion F1 der <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> die beiden Linalool-Prekursoren nahezu zu gleichen Teilen vorlagen (siehe auch Abbildung 38), wurde beiden Vorläufer die Konfiguration der Linalooleinheit mit (*S*) zugeordnet.

#### 2.2.4.3 Charakterisierung der intakten Glykoside mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)

Zur Charakterisierung der isolierten intakten Glykokonjugate von Linalool wurde die Massenspektrometrie in Verbindung mit der HPLC und der Elektrosprayionisierung (ESI) im negativen Detektionsmodus herangezogen. Zur chromatographischen Auftrennung der Frakti-

on F 13 aus <sup>HPLC</sup>RP-8 wurde ein Lösungsmittelsystem aus Wasser (5 mM NH<sub>4</sub>OAc) und Acetonitril (5 mM NH<sub>4</sub>OAc) an einer RP-18-Säule verwendet. Wie Abbildung 40B verdeutlicht, ist auf diese Weise ein der HPLC-UV/ELSD Analytik vergleichbares Chromatogramm erhalten worden (vgl. dazu Abbildung 37, ELSD-Chromatogramm). Die mittels ELSD detektierten Verbindungen ließen sich unter den verwendeten Bedingungen gut ionisieren und detektieren. Zusätzlich wurde noch die Information des Massenspektrums erhalten. Das mit Abstand beherrschende Signal des Massenspektrums der Linaloolprekursoren (auch hier Coelution, R<sub>t</sub> = 21,1 min) war *m/z* 507,2.

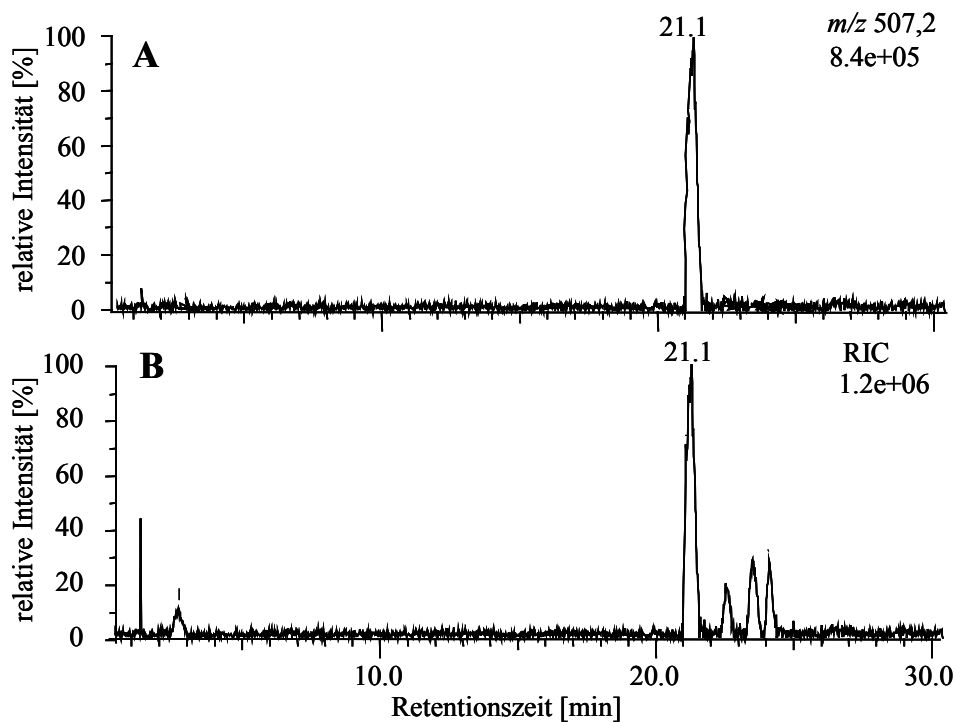


Abb. 40: HPLC-ESI-MS Chromatogramm der Fraktion F 13 aus <sup>HPLC</sup>RP-8 an einer RP-18 Säule [Fließmittelsystem Wasser (5 mM NH<sub>4</sub>OAc) und Acetonitril (5 mM NH<sub>4</sub>OAc), ESI neg, Full Scan Modus, Gradient 2]; **B**: RIC (reconstructed ion chromatogram), **A**: Ionenspur *m/z* 507,2, das Hauptsignal des Massenspektrums der koeluiierenden Linaloolprekursoren bei R<sub>t</sub> 21,1 min.

In Anlehnung an die Methodenentwicklung zur Charakterisierung von Aromastoffkonjugaten mittels Tandemmassenspektrometrie mit der synthetisierten Referenzverbindung Linalyl-*O*-β-D-glucopyranosid wurde von dem Prekursorion *m/z* 507,2 ein Produktionenspektrum aufgenommen. Im Gegensatz zur Referenzverbindung (17 eV zur Erzeugung des Produktionenspektrums) musste mit höherer Kollisionsenergie (30 eV) gearbeitet werden, um eine vergleichbare Fragmentierung des/der Moleküle zu erhalten. Abbildung 41 zeigt das Produktionenspektrum des Prekursorions *m/z* 507,2. Das Produktionen Scan-Experiment wurde neben

der Fraktion F 13 aus <sup>HPLC</sup>**RP-8** auch mit den beiden Fraktionen F 1 und F 2 aus <sup>HPLC</sup>**RP-18II** durchgeführt; es zeigte sich, dass beide Linaloolprecursoren ein nahezu identisches Produktionenspektrum lieferten (Abbildung 41, gezeigt ist das Produktionenspektrum der Fraktion F 1 aus <sup>HPLC</sup>**RP-18II**).

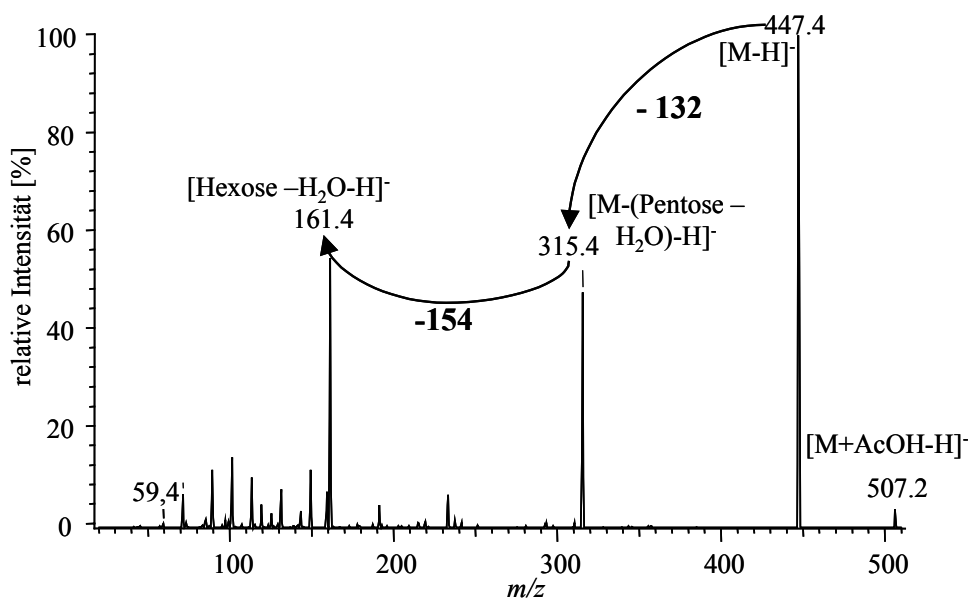


Abb. 41: Produktionenspektrum der Verbindung aus Fraktion F 1 aus <sup>HPLC</sup>**RP-18II** (HPLC-MS/MS, ESI negativ, Precursorion  $m/z$  507,2, CID 1,8 mTorr Argon, 30 eV, Lösungsmittelsystem Wasser (5 mM NH<sub>4</sub>OAc) und Acetonitril (5 mM NH<sub>4</sub>OAc), loop-Injektion); AcOH = Essigsäure, M = Molekülenpeak.

Das erzeugte Produktionenspektrum entsprach im Bereich von  $m/z$  20 bis  $m/z$  320 demjenigen der synthetisierten Referenzverbindung Linalyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, zusätzlich war das Acetat-Addukt des Moleküliens bei  $m/z$  507,2 und der Quasimolekülenpeak [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  447,4 zu erkennen. Wie bei der Referenzverbindung war auch hier die Abspaltung einer Einheit von -154 zu beobachten; dies entspricht einer Linaloleinheit im Molekül. Der Verlust von 132 Masseneinheiten wurde auf eine zusätzliche Zuckeruntereinheit im Molekül zurückgeführt, es entsprach einer zusätzlichen Pentose-Untereinheit. Demnach setzten sich beide Linalool-Precursoren aus dem Monoterpenalkohol und einem Disaccharid – bestehend aus einer Hexose und einer Pentose – zusammen. Da beide Linalool-Precursoren sehr ähnliche chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften zeigten, waren die Unterschiede in beiden Molekülen in der Konfiguration der Zuckeruntereinheiten zu suchen. Weitere strukturelle Aufklärung lieferte die Kernresonanzspektroskopie.

#### 2.2.4.4 Charakterisierung der intakten Glykoside mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Aus den experimentellen Daten der Tandemmassenspektrometrie ließ sich der strukturelle Grundkörper der isolierten Linalylglykoside ermitteln. Demnach bestand die Zuckereinheit von **AK1** und **AK2** aus zwei Monosacchariden (jeweils eine Hexose und eine Pentose). Zur vollständigen Strukturaufklärung wurden sowohl mit den freien Glykosiden **AK1** und **AK2** als auch mit den peracetylierten Derivaten **AK1<sub>ac</sub>** und **AK2<sub>ac</sub>** ein- und zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt. In Tabelle 8 und 9 sind die Ergebnisse der <sup>1</sup>H- und der <sup>13</sup>C-Messungen im Vergleich zu ausgewählten Literaturdaten dargestellt; die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von COSY, HMQC, HMBC und sel-1D TOCSY Experimenten.

Die <sup>1</sup>H sowie die <sup>13</sup>C NMR Spektren der beiden Terpen-Glykoside **AK1** und **AK2** zeigten Übereinstimmung in den Resonanzen der Aglykone sowie der Hexose-Einheit, welche als Glucose identifiziert wurde (Tabellen 8 und 9). Für beide Untereinheiten (Linalool, Hexose) sind die oben beschriebenen Glykosilierungseffekte beobachtet worden. Im Vergleich zu unsubstituierten Glucoseresten wiesen die C-6'-Resonanz des Zuckers eine signifikante Tieffeldverschiebung auf, während gleichzeitig das C-5'-Signal zu höherem Feld verschoben war. Hieraus folgte, dass die terminalen Pentosereste mit dem Glucose-Kohlenstoffatom C-6' verknüpft waren. Gleichzeitig waren die Signale der Protonen 6a' und 6b' zu höherem Feld im Vergleich zu einer an dieser Position unterivatisierten Glucose verschoben (Glykosilierungseffekte). Der Vergleich der Daten von freiem und gebundenem Linalool in **AK1** und **AK2** zeigte eine Tieffeldverschiebung der Resonanzen an den C-Atomen C-3, welche mit dem Zucker verbunden waren (jeweils 79,0 ppm) und Hochfeldverschiebung der benachbarten C-Atome C-2 (143,4 bzw. 143,3 ppm für **AK1** bzw. **AK2**; freies Linalool: 146,3 ppm), C-4 (jeweils 41,0 ppm für **AK1** bzw. **AK2**; freies Linalool: 43,41 ppm) und C-10 (22,8 bzw. 22,6 ppm für **AK1** bzw. **AK2**; freies Linalool: 27,6 ppm). Die Abschirmung von Kohlenstoffatom C-3 setzte sich auch hier über die konjugierte Doppelbindung zu C-1 fort und machte sich in einer Tieffeldverschiebung der Resonanz von C-Atom C-1 (114,7 bzw. 114,6 ppm für **AK1** bzw. **AK2**; freies Linalool: 112,01 ppm) bemerkbar.

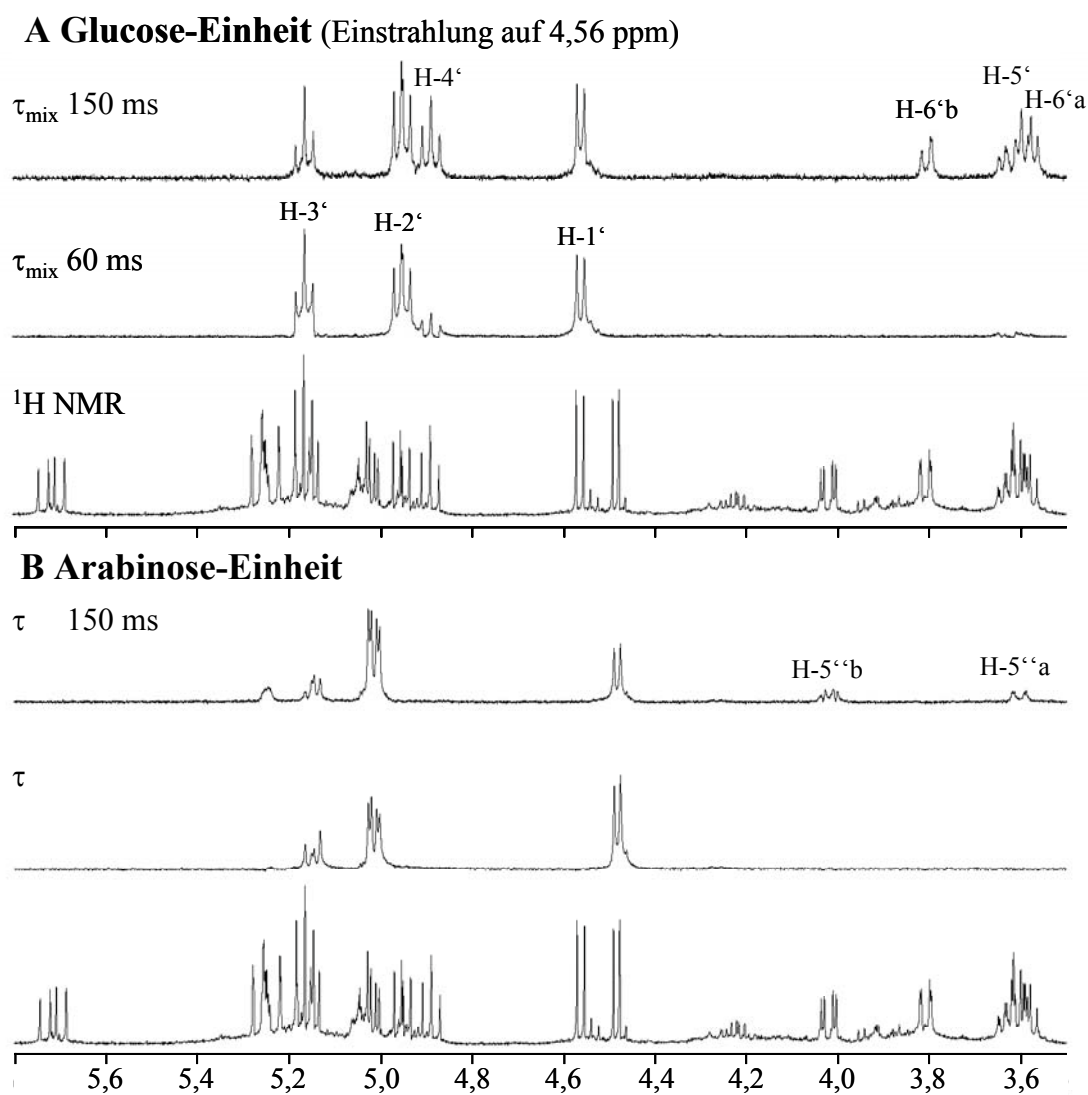


Abb. 42: TOCSY Experimente zur Zuordnung der Protonensignale der Verbindung **AK1<sub>ac</sub>**; **A**: Einstrahlung auf  $\delta$  4.56 ppm mit  $\tau_{\text{mix}}$  60 und 150 ms (H-1 Proton der Glucose-Einheit); **B**: Einstrahlung auf  $\delta$  4.48 ppm mit  $\tau_{\text{mix}}$  60 und 150 ms (H-1 Proton der Arabinose-Einheit);

Die Zuordnung der Protonensignale der jeweiligen Zuckereinheiten erfolgte anhand von sel-1D TOCSY Messungen durch Einstrahlung bei der Verbindung **AK1<sub>ac</sub>** auf 4,56 ppm ( $\tau_{\text{mix}}$  60 und 150 ms) sowie auf 4,48 ppm ( $\tau_{\text{mix}}$  60 und 150 ms) und bei der Verbindung **AK2** auf 4,13 ppm ( $\tau_{\text{mix}}$  120 ms) sowie auf 4,82 ppm ( $\tau_{\text{mix}}$  120 ms). Abbildung 42 verdeutlicht die Zuordnung der Protonenresonanzen am Beispiel der Verbindung **AK1<sub>ac</sub>**.

Die  $\beta$ -Konfiguration der Glucosereste in **AK1** und **AK2** folgte aus den Kopplungskonstanten  $J_{H1',H2'}$  (8,0 bzw. 7,9 Hz) der anomeren Protonen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Tabelle 8). Die Struktur einer Glucoseeinheit wurde durch die Kopplungskonstanten  $J_{2',3'}$ ,  $J_{3',4'}$  und  $J_{4',5'}$  mit 9,5 bis 9,8 Hz der acetylierten Verbindungen **AK1<sub>ac</sub>** bzw.  $J_{2',3'}$ ,  $J_{3',4'}$  und  $J_{4',5'}$  mit 9,0 Hz bei **AK2** bestätigt.

Tab. 8:  $^1\text{H-NMR}$ -Daten der freien und acetylierten Glykoside **AK1** und **AK2** bzw. **AK1<sub>ac</sub>** sowie Linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosid und Linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)-*O*- $\beta$ -D-apiofuranosid.

Protonen	<b>AK1</b>	<b>AK1<sub>ac</sub></b>	Referenz <sup>a</sup>	<b>AK2</b>	Referenz <sup>b</sup>
Aglykon					
1 <sub>cis</sub>	5,14 (1,5; 11,0)	5,26 (d ; 1,0; 10,9)	5,11 (dd ; 1,1 ; 10,9)	5,14 (1,5; 11,0)	5,19 (d ; 10,5)
1 <sub>trans</sub>	5,19 (1,5; 17,0)	5,20 (d ; 1,0; 17,5)	5,14 (dd; 1,2; 17,8)	5,19 (1,5 ; 17,5)	5,26 (d; 18,0)
2	5,87 (11,0; 17,0)	5,72 (dd ; 10,9; 17,5)	5,77 (dd; 10,9; 17,7)	5,87 (11,0, 17,5)	5,85 (dd; 10,5; 18,0)
4	1,48	1,53 (s)	1,57	1,48	1,64 (m)
5	1,95	1,95 (m)	2,15 (m)	1,95	1,99 (m)
6	5,07	5,03 (t)	5,1 (m)	5,07	5,18 (m)
8	1,62	1,66 (s)	1,65 (s)	1,62	1,67 (s)
9	1,54	1,57 (s)	1,59 (s)	1,54	1,59 (s)
10	1,27	1,34 (s)	1,39 (s)	1,26	1,36 (s)
Glucose					
1'	4,15 ( $^3J_{1',2'}$ 8,0)	4,56 ( $^3J_{1',2'}$ 8,1)	4,52 (d; 7,6)	4,13 ( $^3J_{1',2'}$ 7,9)	4,5 (d; 7,9)
2'	2,93 ( $^3J_{2',3'}$ ~ 9,0)	4,95 ( $^3J_{2',3'}$ 9,8)	5,34 (7,7)	2,93 ( $^3J_{2',3'}$ 9,0)	3,2 (t; 8,4)
3'	3,09 ( $^3J_{3',4'}$ ~ 9,0)	5,16 ( $^3J_{3',4'}$ 9,5)	5,39 (8,7)	3,07 ( $^3J_{3',4'}$ 9,0)	3,4 (t; 8,9)
4'	3,04 ( $^3J_{4',5'}$ ~ 9,0)	4,87 ( $^3J_{4',5'}$ 9,5)	5,09 (dd; 8,9; 10,0)	2,95 ( $^3J_{4',5'}$ 9,0)	3,34 (t; 9,0)
5'	3,17 ( $^3J_{5',6a'}$ 6,2; $^3J_{5',6b'}$ 1,7)	3,61	3,37 (ddd; 1,9; 7,0; 10,6)	3,10 ( $^3J_{5',6b'}$ 1,7)	3,49 (m)
6'a	3,46 ( $^2J_{6'a,6'b}$ 11,1)	3,58 (dd; 1,7; $^2J_{6'a,6'b}$ 10,5)	3,84 (dd; 1,9; 10,6)	3,35 ( $^2J_{6'a,6'b}$ 11,1)	3,35 (m)
6'b	3,85 ( $^2J_{6'a,6'b}$ 10,0)	3,81 (dd; 7,2; $^2J_{6'a,6'b}$ 10,5)	3,46 (dd; 7,0; 10,6)	3,78 ( $^2J_{6'a,6'b}$ 11,1)	3,78 (m)
Arabinose-einheit			Apiose-einheit		
1''	4,21 ( $^3J_{1'',2''}$ 6,2)	4,48 (d; $^3J_{1'',2''}$ 6,8)	4,28 (d; 6,7)	4,82 ( $^3J_{1'',2''}$ 2,8)	5,06 (d; 3,0)
2''	3,35	5,15 ( $^3J_{2'',3''}$ 9,2)	5,55 (dd; 6,7; 9,1)	3,70	3,95 (d; 3,0)
3''	3,63	5,02 ( $^3J_{3'',4''}$ 9,2)	5,16 (dd; 3,5; 9,1)	-	-
4''	3,36	5,25 ( $^3J_{4'',5''a}$ 2,0;	5,23 (1,9; 3,5)	-	-





C-Atome	AK1	AK1 <sub>ac</sub>	Referenz <sup>a</sup>	AK2	Referenz <sup>b</sup>	Referenz <sup>c</sup>
2'	73,5	71,4	75,17	73,5	74,00	71,5
3'	76,8	73,0	78,08	76,8	76,60	73,0
4'	70,1	69,2	72,30	70,3	70,70	69,4
5'	75,2	73,1	76,37	75,2	75,20	73,2
6'	68,0	67,6	69,38	67,8	68,60	67,0
		Arabinose-Einheit			Apiose-Einheit	
1''	102,9	100,4	104,84	109,2	109,80	106,1
		(1J <sub>CH</sub> 161)				
2''	72,3	69,0	71,67	76,0	77,50	76,2
3''	70,4	70,2	74,06	78,8	80,10	84,0
4''	66,9	67,5	69,23	73,2	74,30	72,5
5''	64,3	63,0	66,30	63,3	64,40	63,1
		Acetylrest		-		Acetylrest
CH <sub>3</sub>	-	20,5-20,9	-	-	-	20,4-21,0
-O-C=O	-	161,1-170,3	-	-	-	161,3-170,5

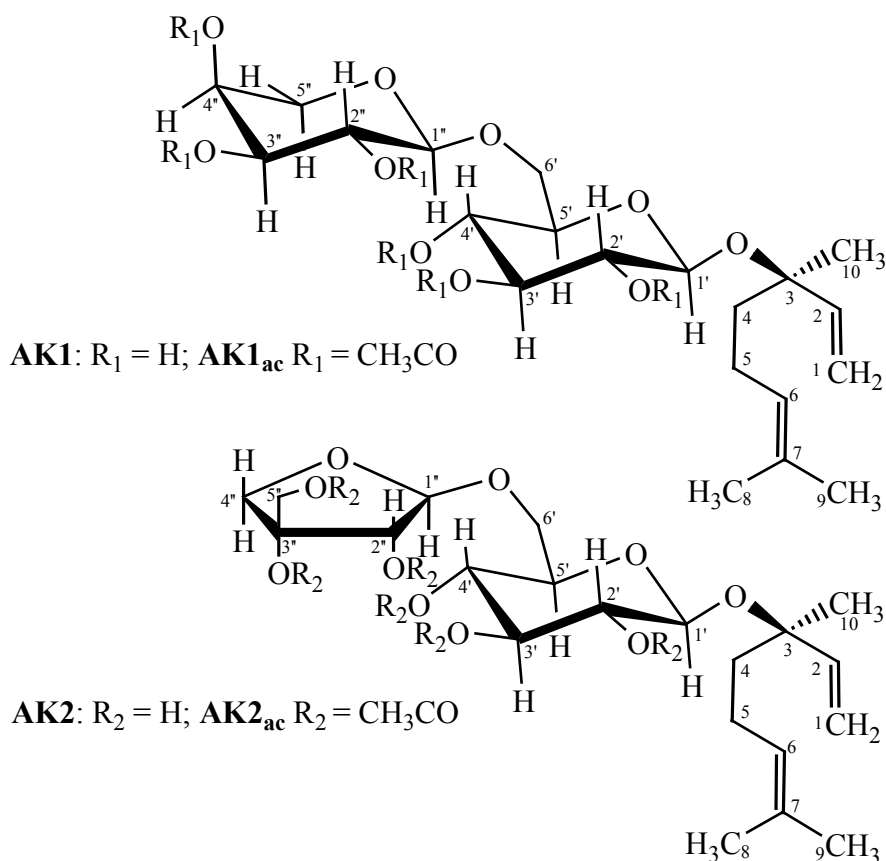
<sup>a</sup> Linalyl-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranosid, gemessen in D<sub>2</sub>O bei 50 MHz (Pabst, 1991); <sup>b</sup> Linalyl-3-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranosid, gemessen in D<sub>2</sub>O bei 360 MHz (Mbairaroua *et al.*, 1994); <sup>c</sup> peracetyliertes Linalyl-3-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranosid, gemessen in CDCl<sub>3</sub> bei 360 MHz (Mbairaroua *et al.*, 1994).

Unterschiede in den NMR-Daten zwischen **AK1** und **AK2** traten hinsichtlich der Werte für die Pentose-Untereinheiten auf. Für **AK1** konnte anhand der <sup>13</sup>C NMR Daten der Pentose-Einheit die pyranoiden Form einer Arabinose abgeleitet werden. Die Bestimmung der vicinalen Kopplungskonstanten in der Arabinose-Einheit konnten nur mit Hilfe des acetylierten Derivates bestimmt werden, in der freien Pentoseeinheit kam es zu starken Kopplungen. Das Vorliegen einer Pyranose wurde neben den <sup>13</sup>C-Signalen von **AK1** auch durch die Kopplungskonstanten von **AK1<sub>ac</sub>** bestätigt mit  $J_{H2'',H3''} = 9,2$  Hz (axiale Stellung) und  $J_{H3'',H4''} = 3,6$  Hz (äquatoriale Stellung). Die L-Konfiguration der Pentose wurde durch den Vergleich mit Literaturdaten ermittelt (Mizutani *et al.*, 1980; Pabst 1991a; Watanabe *et al.*, 1994). Die Kopplungskonstante  $J_{H-1'',H-2''}$  (6,8 Hz) der Arabinopyranose wies im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **AK1<sub>ac</sub>** mit einem Wert von 6,8 Hz auf eine diaxiale Stellung der Protonen H-1'' und H-2'' hin, ein zusätzlicher Vergleich mit Literaturdaten (Tabelle 10) bestätigte das Vorhandensein einer  $\alpha$ -Konfiguration am anomeren C-Atom des C<sub>5</sub> Zuckers (Mizutani *et al.*, 1980).

Tab. 10:  $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Protons H-1 der Zuckereinheit verschiedener Methylarabino-  
side (nach Joseleau *et al.*, 1977).

Verbindung	H-1 [ppm]	Kopplungskonstante $J_{\text{H1,H2}}$ [Hz]
Methyl- $\alpha$ -L-arabinofuranose	4,91	1,8
Methyl- $\beta$ -L-arabinofuranose	4,86	4,5
Methyl- $\alpha$ -L-arabinopyranose	4,26	7,5
Methyl- $\beta$ -L-arabinopyranose	4,83	2,8

Für die Pentoseeinheit in **AK2** wurde strukturell eine  $\beta$ -D-Apiofuranose (3-C-Hydroxymethyl-D-glycero-tetrose) ermittelt. Bei der terminalen Apiose betrug die Kopplungskonstante zwischen dem anomeren Proton H-1'' und H-2''  $^3J_{1'',2''} = 2,8$  Hz, die Kopplungskonstante  $^2J_{4'',a,4'',b}$  ergab einen Wert von 9,3 Hz. Ein Vergleich mit entsprechenden Literaturdaten (Tabelle 8 und 9) bestätigte die Auswertung.

Abb. 43: Strukturen der isolierten Verbindungen **AK1** [3(*S*)-Linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\alpha$ -L-arabinofuranosid] und **AK2** [3(*S*)-Linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-apiofuranosid] und der entsprechenden acetylierten Derivate **AK1<sub>ac</sub>** und **AK2<sub>ac</sub>**.

Für die beiden aus Rohkaffee isolierten Linalyldisaccharide wurden somit die Strukturen als 3(S)-Linalyl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\alpha$ -L-arabinofuranosid für **AK1** und 3(S)-Linalyl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-apiofuranosid für **AK2** ermittelt (Abbildung 43).

Das Linalyldisaccharid **AK1** ist in dieser Form u.a. bereits beschrieben in *Gardenia jasminoides* (Watanabe *et al.*, 1994), *Bupleurum falcatum* (Ono *et al.*, 1999), Passionsfrüchten (Chasagne *et al.*, 1996) und Wein (Voirin *et al.*, 1992; Marino *et al.*, 1995). Auch der Monoterpenvorläufer **AK2** ist als Inhaltsstoff von *Pluchea indica* (Uchiyama *et al.*, 1989) und Wein dokumentiert (Voirin *et al.*, 1992; Marino *et al.*, 1995). Die beiden isolierten Disaccharide kommen also verteilt über verschiedene Pflanzengattungen in der beschriebenen Form vor. Im Hinblick auf Aromastoffvorläufer in Rohkaffee stellt die Strukturermittlung der Verbindungen **AK1** und **AK2** neben den unten aufgeführten weiteren drei Prekursoren jedoch einen wichtigen Schritt zur Aufklärung von Vorstufen dar, aus denen im Verlauf der Kaffeeverarbeitung wichtige Aromastoffe entstehen können.

## 2.2.5 Isolierung und Identifizierung von Prekursoren von 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure

### 2.2.5.1 Fraktionierung und Reinigung mittels „reversed-phase“-Chromatographie

Die Reinigung der Vorläufer von 3-Methylbutansäure erfolgte an „reversed phase“-RP-18 Material mittels präparativer HPLC. Ausgehend von der Fraktion 34-37 aus dem ersten „reversed phase“-Schritt (<sup>LC</sup>RP-18) sind zwei gebundene Vorläufer der Säure in einem Schritt in ausreichender Reinheit isoliert worden (Abbildung 44).

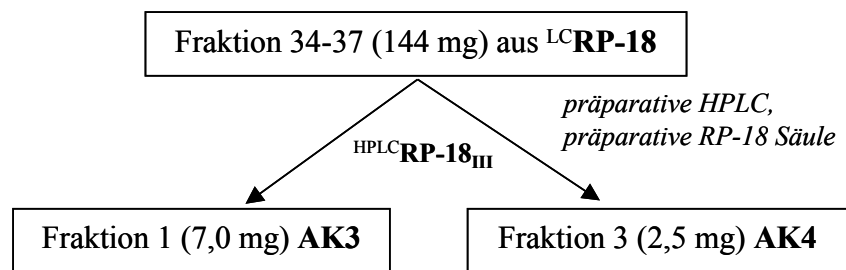


Abb. 44: Reinigung der Prekursoren von 3-Methylbutansäure an RP-18-Material.

Obwohl die Verbindungen in den Fraktionen F1 und F3 bei der Reinigung mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Säule (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>III</sub>) chromatographisch nicht vollständig getrennt werden konnten, wurden die beiden potentiellen Vorläufer der 3-Methylbutansäure durch die beim Aufsammeln der Verbindungen sehr schmalen Cut-Bereiche in ausreichender Reinheit erhalten.

Abbildung 45 zeigt die Rechromatographie einer Mischung der gereinigten Verbindungen AK3 und AK4 an einer analytischen RP-18-Säule, aufgetrennt mit einem sehr „langsamen“ Gradienten (Analyt. Gradient #4). Das Chromatographieverhalten der beiden Vorläufer ließ den Rückschluss zu, dass sich die Strukturen der beiden Prekursoren weitgehend gleichen. Die Charakterisierung erfolgte mittels Tandemmassenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie.

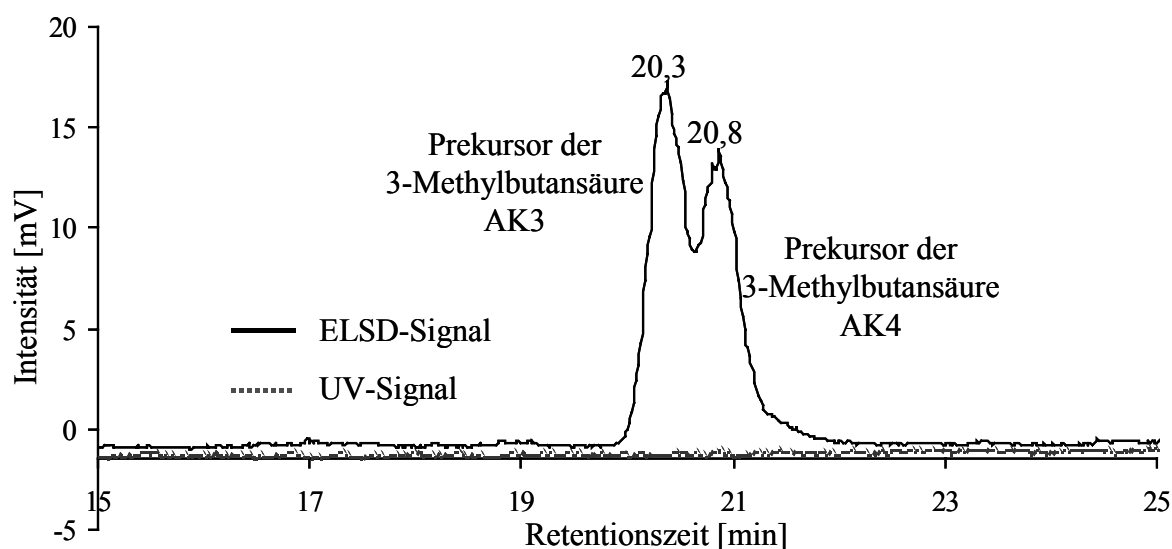


Abb. 45: Rechromatographie einer Mischung der Fraktion F1 und F3 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>III</sub> an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #4) mittels HPLC-UV/ELSD; Signale bei 20,3 und 20,8 min konnten nur mit ELSD detektiert werden, zeigten bei 254 nm also keine UV-Aktivität und wurden als potentieller Vorläufer (**AK3** und **AK4**) von 3-Methylbutansäure eingestuft.

Die Reinigung des Vorläufers der 3-Methyl-2-butensäure erfolgte ausgehend von Fraktion F38-42 aus <sup>LC</sup>RP-18 ebenfalls an RP-18 Material. Um den Prekursor in ausreichender Reinheit zu gewinnen, mussten zwei chromatographische Schritte – ein präparativer (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>IV</sub>) und ein analytischer (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>V</sub>) – nacheinander durchgeführt werden (Abbildung 46).

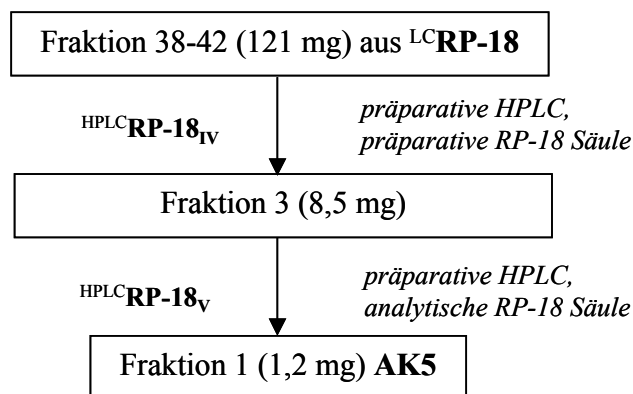


Abb. 46: Zweistufige Reinigung des Prekursors von 3-Methyl-2-butensäure an RP-18-Material.

Ausgehend von 121 mg (von Fraktion F 38-42) wurden auf diese Weise 1,2 mg an reinem Vorläufer gewonnen. Der zunehmende Reinheitsgrad des Prekursors ist in Abbildung 47 anhand der HPLC-UV/ELSD-Chromatogramme dargestellt (aus Gründen der Übersichtlichkeit ist jeweils nur das ELSD-Signal abgebildet).

Stellte der potentielle Prekursor in F 38-42 (Abbildung 47A) noch eine Minorkomponente dar, so wurde die Verbindung in Fraktion 3 der <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>IV</sub> schon als Hauptkomponente nachgewiesen (Abbildung 47B) und schließlich im analytischen Maßstab vollständig gereinigt (Abbildung 47C). Da für die einzelnen Stufen der Reinigung die Wasser–Acetonitril-Gradienten jeweils neu optimiert wurde, kam es zu Verschiebungen der Retentionszeit.

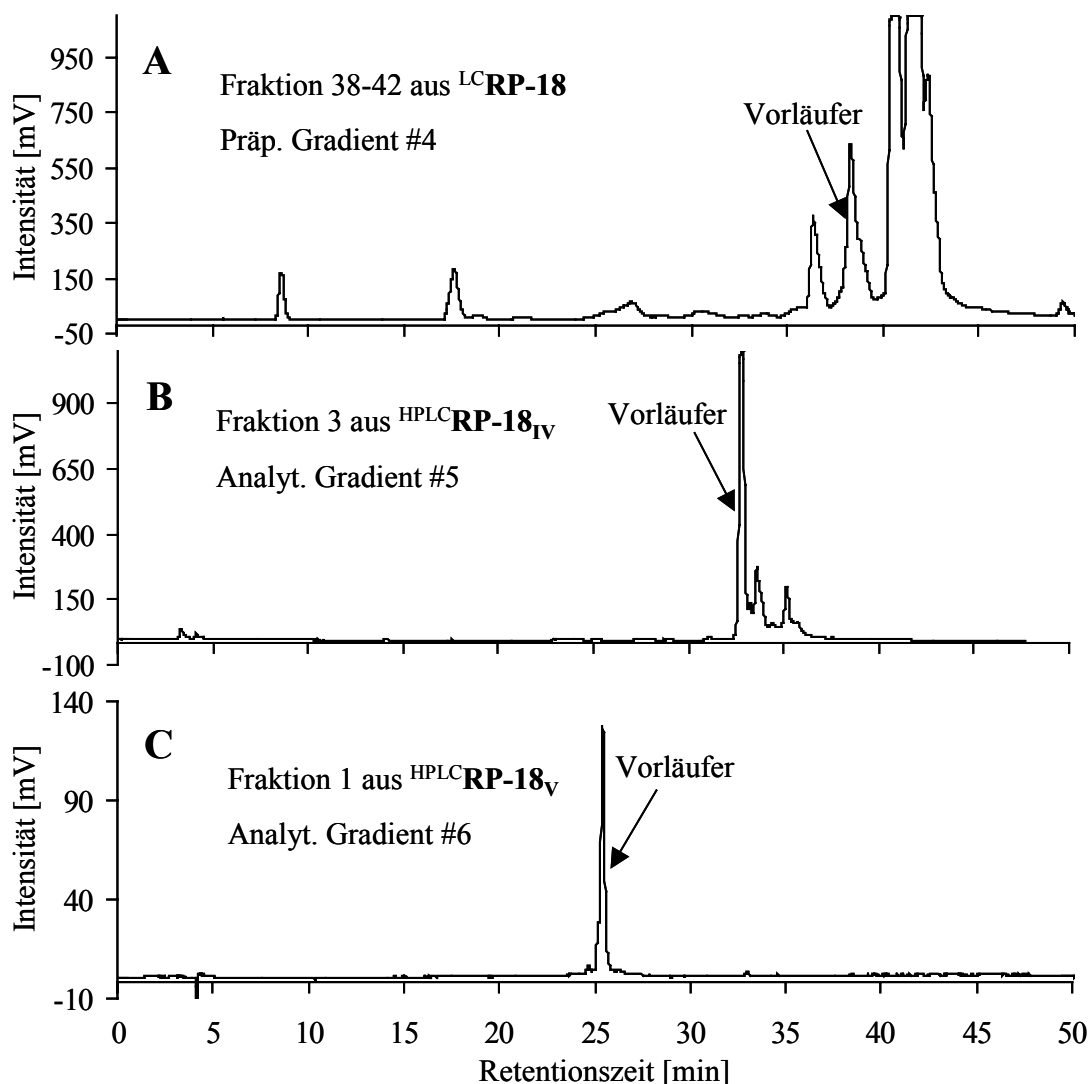


Abb. 47: Darstellung des zunehmenden Reinheitsgrades des Precursors von 3-Methyl-2-butensäure im Verlauf der Reinigung an RP-18-Material, dargestellt anhand der HPLC-ELSD-Chromatogramme; die Verschiebungen in der Retentionszeit des Vorläufers sind durch die Verwendung verschiedener, für die jeweiligen Reinigungsschritte optimierter Wasser-Acetonitril-Gradienten zu erklären.

### 2.2.5.2 Charakterisierung der intakten Ester mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS)

Während der Reinigung der Konjugate von 3-Methylbutensäure wurde versucht, mittels HPLC-ESI-MS und -MS/MS Verbindungen zu detektieren, die bei der Fragmentierung einen Verlust von 102 Masseneinheiten (entsprechend der Molekularmasse von 3-Methylbutensäure)

zeigten. In Abbildung 48 sind die Produktionenspektren der Fraktionen F 1 (Bild **A**) und F 2 (Bild **B**) aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>III</sub> dargestellt, die beide nach Anwendung einer Kollisionsenergie von 20 eV erhalten worden sind.

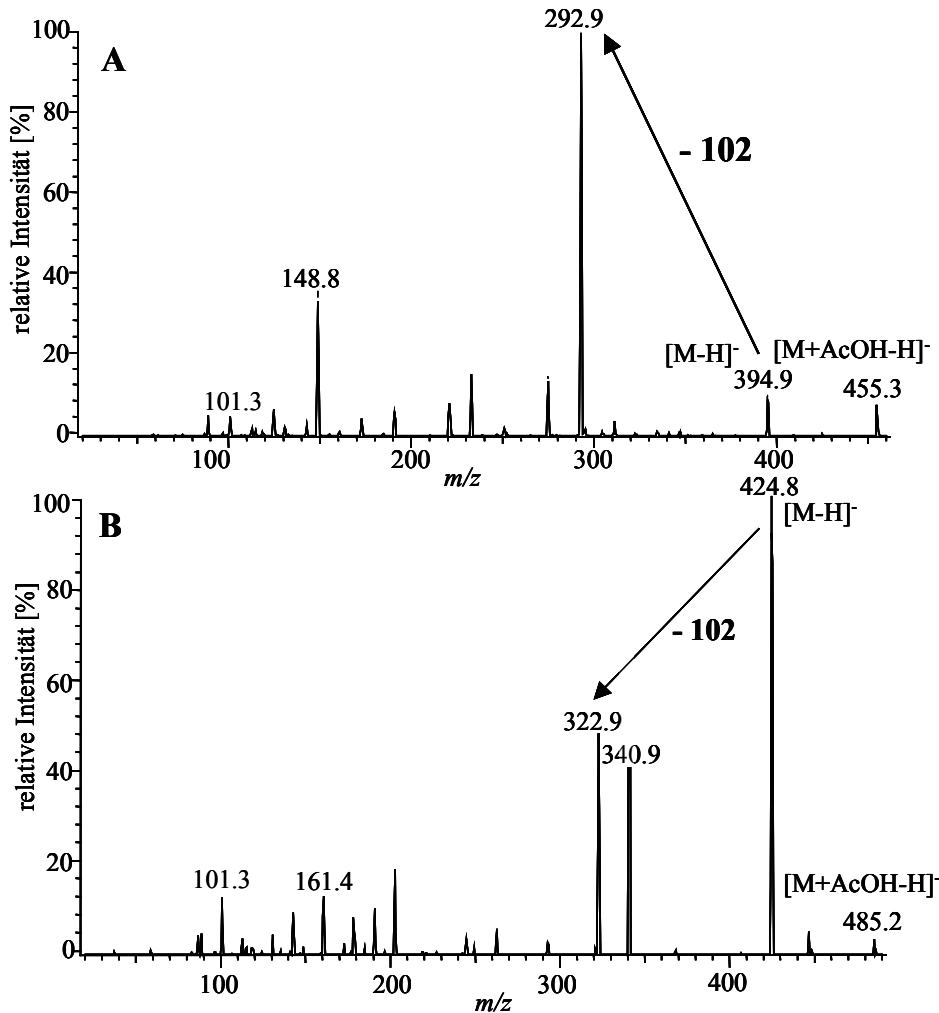


Abb. 48: Produktionenspektren der Verbindungen aus Fraktion F 1 (**AK3**, **A**) und F 3 (**AK4**, **B**) aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>III</sub> (HPLC-MS/MS, ESI negativ, Prekursorion  $m/z$  455,3 in **A**,  $m/z$  485,2 in **B**, CID 1,8 mTorr Argon, 20 eV, Lösungsmittelsystem Wasser (5 mM NH<sub>4</sub>OAc) und Acetonitril (5 mM NH<sub>4</sub>OAc), „loop“-Injektion); AcOH = Essigsäure, M = jeweiliger Molekülionenpeak.

Im Gegensatz zur nahezu identischen Fragmentierung der beiden Linaloolprekursoren im Tochterionen-Modus zeigten die beiden Konjugate von 3-Methylbutansäure sowohl Unterschiede hinsichtlich der Molekularmasse (**AK3** Quasimolekülionenpeak bei  $m/z$  394,9, **AK4** Quasimolekülionenpeak bei  $m/z$  424,8) als auch in Bezug auf Qualität und Intensität des Fragmentierungsmusters (Abbildung 48). Für beide Verbindungen konnte wieder ein Acetat-Addukt bei  $m/z$  455,3 (**AK3**) bzw.  $m/z$  485,2 (**AK4**) detektiert werden, wobei nach Abspal-



tung der Acetat-Einheit (bei jeweils 20 eV) die Intensität des Quasimoleküliions von **AK3** mit 12 % und diejenige von  $m/z$  485,2 (**AK4**) mit 100 % Intensität zu beobachten war. Des Weiteren tauchte im Produktionenspektrum von **AK4** ein Signal bei  $m/z$  340,9 auf, das möglicherweise als Ammonium-Addukt einer Disaccharideinheit anzusehen war. Der Quasimolekülionenpeak der freien Säure mit  $m/z$  101,3 war mit einer Intensität von 8 % (**AK3**) bzw. 15 % (**AK4**) zu beobachten.

Im Falle der beiden Konjugate der Säuren handelte es sich – wie bei den Linalool-Prekursoren – bei den Zuckereinheiten wahrscheinlich um Disaccharide. Für **AK4** war – wie auch bei der synthetisierten Referenzverbindung und bei den beiden Linalool-Prekursoren – ein Signal bei  $m/z$  161,4 detektierbar. Der Unterschied in den beiden Konjugaten der 3-Methylbutansäure hinsichtlich der Molekularmasse von 30 g/mol wurde der Einheit HCOH zugeordnet. Dies kann damit erklärt werden, dass es sich bei der zweiten Untereinheit des Zuckerteils (erster Teil jeweils Hexose) beider Konjugate im Falle von **AK3** um eine Pentose und im Falle von **AK4** um eine Hexose handelte. Wie auch bei den beiden Linalool-Prekursoren lieferten die folgenden Ergebnisse der Kernresonanzspektroskopie weitere Aufschlüsse.

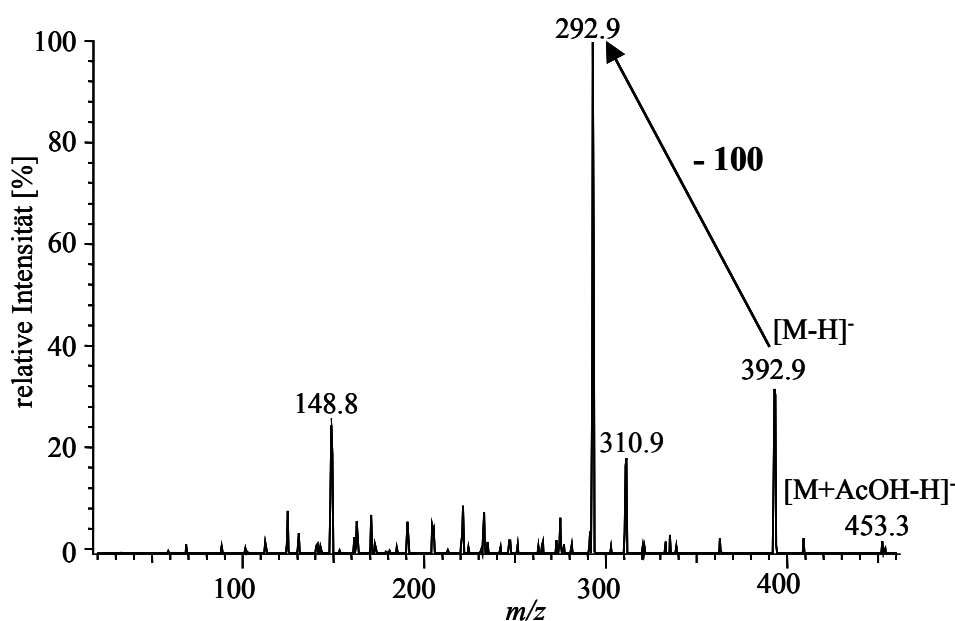


Abb. 49: Produktionenspektrum der Verbindung aus Fraktion F 1 (**AK5**) aus <sup>HPLC</sup>**RP-18<sub>v</sub>** (HPLC-MS/MS, ESI negativ, Prekursorion  $m/z$  453,3 CID 1,8 mTorr Argon, 20 eV, Lösungsmittelsystem Wasser (5 mM NH<sub>4</sub>OAc) und Acetonitril (5 mM NH<sub>4</sub>OAc), „loop“-Injektion); AcOH = Essigsäure, M = Molekülionenpeak.

Zur Charakterisierung des Konjugates der 3-Methyl-2-butensäure wurde ebenfalls die Tandemmassenspektrometrie in Verbindung mit der ESI-Ionisierung und Detektion im negativen Modus herangezogen. Schon während der Reinigung des Vorläufers wurde versucht, mittels der Kopplung aus ESI-MS und HPLC aus den entsprechenden Extrakten Verbindungen herauszufiltern, die bei nachgeschalteten Tochterionen - Experimenten den Verlust von 100 Masseneinheiten (entsprechend der Molekularmasse von 3-Methyl-2-butensäure) zeigten. In Abbildung 49 ist das Produktionenspektrum eines Tochterionen-Experimentes aus Fraktion F 1 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>v</sub> dargestellt; eingesetzt wurde hierbei – wie bei den beiden Konjugaten der 3-Methylbutansäure – eine Kollisionsenergie von 20 eV.

Ausgehend vom Prekursorion  $m/z$  453,3 (Acetat-Addukt) sind im Produktionenspektrum das Quasimolekülion  $m/z$  392,9, die deprotonierte und von der Säure abgespaltene Zuckereinheit des Konjugates mit  $m/z$  292,2 sowie das Ammonium-Addukt der Zuckereinheit mit  $m/z$  310,9 beobachtet worden. Das Produktionenspektrum war nahezu deckungsgleich mit demjenigen des isolierten Konjugates der 3-Methylbutansäure, abgesehen von den um zwei Einheiten differierenden Quasimolekülionen  $[M-H]^-$  ( $m/z$  394,9 bei Vorläufer von 3-Methylbutansäure,  $m/z$  392,9 bei Konjugat von 3-Methyl-2-butensäure) und den entsprechenden Acetat-Addukten  $[M+AcOH-H]^+$  ( $m/z$  455,3 bei Vorläufer von 3-Methylbutansäure,  $m/z$  453,3 bei Konjugat von 3-Methyl-2-butensäure). Diese Differenzen entsprechen exakt der Differenz der Molekularmasse von 3-Methylbutansäure (102,13 g/mol) der von 3-Methyl-2-butensäure (100,12 g/mol). Zu diesem Zeitpunkt der Analyse war es offensichtlich, dass es sich bei den Konjugaten **AK3** und **AK5** jeweils um dieselbe Zuckereinheit – bestehend aus einer Hexose und einer Pentose - handelte. Zur weiteren Ermittlung der exakten Struktur des Konjugates **AK5** wurde ebenfalls die Kernresonanzspektroskopie herangezogen.

### 2.2.5.3 Charakterisierung der intakten Ester mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Aus den experimentellen Daten der Tandemmassenspektrometrie ließen sich die strukturellen Grundkörper der isolierten Zuckerester ermitteln. Demnach bestanden die Zuckereinheiten von **AK3**, **AK4** und **AK5** aus zwei Monosacchariden (jeweils eine Hexose und eine Pentose im Falle von **AK3** und **AK5**, zwei Hexoseeinheiten im Falle von **AK4**). Zur vollständigen Strukturaufklärung wurden ein- und zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt. In den Tabellen 11 und 12 sind die Ergebnisse der <sup>1</sup>H- und der <sup>13</sup>C- Messungen im Vergleich zu

ausgewählten Literaturdaten dargestellt; die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von COSY, HMQC, HMBC, und sel-1D TOCSY Experimenten (zusätzlich NOE-Messungen bei **AK5**).

Die detektierten Tieffeldverschiebungen der Signale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren für die anomeren Protonen der Glucoseeinheiten von **AK3** und **AK5** (5,34 bzw. 5,36 ppm) im Vergleich zu denjenigen von **AK2** und **AK3** mit glykosidischen Bindungen (4,15 bzw. 4,13 ppm) deuteten auf eine Esterbindung hin (Loveys and Millborrow, 1981). Im Falle von **AK4** zeigten die Protonen 6'a und 6'b der Glucose mit 4,24 bzw. 4,01 ppm ebenfalls eine Verschiebung zu tieferem Feld, verglichen mit den beiden Protonen an Position 6 einer freien Glucoseeinheit (3,83 bzw. 3,65 ppm). Dies wies auf eine Veresterung der Glucoseeinheit von **AK4** in Position 6 hin. Im Hinblick auf die Acyleinheiten der drei Zuckerester waren die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Daten von **AK3** und **AK4** weitgehend übereinstimmend, die Werte von **AK5** im  $^{13}\text{C}$ -NMR der C=O-Einheit mit 164,2 ppm, des C-2 Atoms mit 115,1 ppm und des C-3 Atoms mit 159,2 ppm bestätigten das Vorhandensein einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Struktur (Kalinowski *et al.*, 1984).

Tab. 11:  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Ester **AK3**, **AK5** und **AK4** im Vergleich zu Literaturdaten.

Protonen	<b>AK3</b>	<b>AK5</b>	<b>AK4</b>	Referenz <sup>a</sup>
Acyleinheit	3-Methylbutanoyl	3-Methyl-2-butanoyl	3-Methylbutanoyl	Octanoyl
2	2,24 (d; 7,0)	5,72 (s)	2,19 (m)	2,4-2,6 (m)
3	2,00 (m)	-	1,99 (m)	1,5-1,7 (m)
4	0,90 (d; 7,0) <sup>b</sup>	1,91 (s)	0,90 (d; 6,7) <sup>b</sup>	1,2
5	0,91 (d; 7,0) <sup>b</sup>	2,13 (s)	0,90 (d; 6,7) <sup>b</sup>	
6	-	-	-	
7	-	-	-	1,4 (m)
8	-	-	-	0,7-1 (m)
	Glucose-Einheit			
1'	5,34 ( $J_{1',2'}$ 8,2)	5,36 (d; $J_{1',2'}$ 8,4)	5,17	5,34 (d)
2'	3,09 ( $J_{2',3'}$ ~ 9,0)	3,05 ( $J_{2',3'}$ ~ 9,0)	3,20 ( $J_{1',2'}$ 3,7; $J_{2',3'}$ 9,7)	3,49 (dd; $J_{1',2'}$ 3,7; $J_{2',3'}$ 9,8)
3'	3,23 ( $J_{3',4'}$ ~ 9,0)	3,23 ( $J_{3',4'}$ ~ 9,0)	3,48	3,71 (t)
4'	3,06 ( $J_{4',5'}$ ~ 9,0)	3,11 ( $J_{4',5'}$ ~ 9,0)	3,06 ( $J_{3',4'}$ 9,7)	3,38 (t; $J_{3',4'}$ 9,8)
5'	3,36	3,37	3,90	3,95-4,04 (m)
6'a	3,81 (dd; 2,0; $J_{6'a,6'b}$ 10,0)	3,83 (dd; 1,0; $J_{6'a,6'b}$ 10,0)	4,24 ( $J_{5',6'a}$ 5,0)	4,20 (dd; $J_{5',6'a}$ 5,2; $J_{6'a,6'b}$ 12,1)
6'b	3,38 (dd; $J_{6'a,6'b}$ )	3,39 (dd; 5,0; $J_{6'a,6'b}$ )	4,01 ( $J_{5',6'b}$ 6,0)	4,37 (dd; $J_{5',6'b}$ 5,2)

Protonen	AK3	AK5	AK4	Referenz <sup>a</sup>
	10,0)	10,0)		
	Apiose-Einheit		Fructose-Einheit	
1''	4,80 (d; 3,0)	4,79 (d; 3,1)	-	-
1ab''	-		3,38 (m)	3,57-3,63 (m)
2''	3,75 (d; 3,0)	3,75 (d; 3,1)	-	-
3''	-		3,88 (d)	4,16 (d)
4''	-		3,73 (t; $J_{3'',4''}$ 8,0)	3,97 (t; $J_{3'',4''}$ 8,8)
4''a	3,83 (d; $J_{4'',a,4''b}$ 9,2)	3,84 (d; $J_{4'',a,4''b}$ 9,3)	-	-
4''b	3,57 (d; $J_{4'',a,4''b}$ 9,2)	3,57 (d; $J_{4'',a,4''b}$ 9,3)	-	-
5''	-	-	3,58 (m; $J_{4'',5''}$ 8,0)	3,79-3,88 (m)
5''a	3,32 (d; $J_{5'',a,5''b}$ 11,3)	3,35 (d; $J_{5'',a,5''b}$ 11,6)	-	-
5''b	3,30 (d; $J_{5'',a,5''b}$ 11,3)	3,38 (d; $J_{5'',a,5''b}$ 11,6)	-	-
6''ab	-		3,55 (m)	3,72-3,79 (m)

<sup>a</sup> 6-O-Octanoylsaccharose, gemessen in D<sub>2</sub>O bei 300 MHz (Thevent *et al.*, 1999); <sup>b</sup> Signale vertauschbar.

Die <sup>1</sup>H-NMR Daten von **AK5** zeigten zwei Singulets bei 1,91 und 2,13 ppm der an der Doppelbindung der Säure befindlichen Methylgruppen sowie das Singulett eines olefinischen Protons mit 5,72 ppm. Zusätzlich war ein schwacher NOE-Effekt zwischen H-2 und H-4 zu beobachten. Diese Daten stimmten somit mit der mittels HRGC-MS ermittelten Struktur für den Säureanteil (3-Methyl-2-butensäure) in diesem Prekursor überein. Die Verknüpfung der Säure über die 1-Position der Glucose wurde durch ein deutliches HMBC-Signal zwischen dem Proton H-1' (5,36 ppm; d;  $J_{1',2'}$  8,4 Hz) und dem Carbonyl-Kohlenstoffatom der Säure bestätigt. Für die Bestimmung der Zuckereinheit gilt das in Kapitel 2.2.3.4 bezüglich der  $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid-Einheit Beschriebene. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Daten des Zuckeranteils dieser Verbindung stimmen - mit Ausnahme der Werte für das anomere C-Atom der Glucose - mit denen von **AK2** überein.

Tab. 12: <sup>13</sup>C-NMR-Daten der Ester **AK3**, **AK5** und **AK4** im Vergleich zu Literaturdaten.

C-Atome	AK3	AK5	AK4	Referenz <sup>a</sup>
Acyl-einheit	3-Methylbutanoyl	3-Methyl-2-butanoyl	3-Methylbutanoyl	Acyl-Einheit Octanoyl
C=O	171,1	164,2	172,3	177,1
2	42,5	115,1	42,3	34,1
3	25,0	159,2	25,1	31,4
4	22,2 <sup>b</sup>	27,0	22,1 <sup>b</sup>	28,6
5	22,2 <sup>b</sup>	20,1	22,1 <sup>b</sup>	28,4

C-Atome	AK3	AK5	AK4	Referenz <sup>a</sup>
6	-	-	-	24,7
7	-	-	-	22,4
8	-	-	-	13,7
Glucose-Einheit				
1'	93,9	93,5	91,5	92,3
2'	72,4	72,3	71,5	71,4
3'	76,3	76,4	72,7	72,7
4'	69,7	69,7	70,1	70,0
5'	76,2	76,2	70,0	70,7
6'	67,3	67,4	62,4	61,8
Apiose-Einheit		Fructose-Einheit		
1''	109,1	109,1	62,2	63,1
2''	75,8	75,7	103,9	104,1
3''	78,8	78,8	76,9	76,7
4''	73,3	73,2	74,5	74,5
5''	63,1	63,0	82,7	81,9
6''	-	-	62,6	63,6

<sup>a</sup> 6-O-Octanoylsaccharose, gemessen in D<sub>2</sub>O bei 75 MHz (Thevent *et al.*, 1999); <sup>b</sup> Signale vertauschbar.

Da die Säurereste der beiden Prekursoren **AK3** und **AK4** im Vergleich zu **AK5** eine gesättigte Alkylkette aufweisen, sind die Werte der Carbonylkohlenstoffatome mit 171,1 bzw. 172,3 ppm im Vergleich zu 164,2 ppm von **AK5** zu tieferem Feld verschoben. Durch die Symmetrie waren bei **AK3** und **AK4** die Signale der diastereotopen Protonen H-4 und H-5 (0,90 bzw. 0,91 ppm bei **AK3**, 0,90 und 0,90 ppm bei **AK4**) an den beiden terminalen Methylgruppen praktisch isochron. Auch für **AK3** und **AK4** wurde durch intensive HMBC-Kreuzsignale zwischen den Protonen von **AK3** H-1' (5,34 ppm) bzw. von **AK4** H-6'a (4,24 ppm) und H-6'b (4,01 ppm) und den Carbonylkohlenstoffatomen (171,1 bzw. 172,3 ppm) jeweils die Verknüpfung zwischen der Säure und der Glucose in Position 1 bei **AK3** und Position 6 bei **AK4** bestätigt. Bei **AK4** war durch die Veresterung der Glucose an Position 6' weiterhin eine starke Tieffeldverschiebung von C-6' und eine Hochfeldverschiebung von C-5' zu beobachten, was in Einklang zu Beobachtungen von Yoshimoto *et al.* (1980) steht.

Für die Bestimmung der Zuckereinheit von **AK3** gilt das in Kapitel 2.2.3.4 im Bezug auf die  $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid-Einheit Beschriebene. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C- Daten des Zuckeranteils dieser Verbindung stimmen mit denen von **AK2** (und **AK5**) überein, mit Ausnahme der Werte für das anomere C-Atom der Glucose. Die Zuckereinheit von **AK4** zeigte in

ihren NMR-Werten Übereinstimmung mit Literaturdaten von Acyl-6-*O*-Saccharose (Tabelle 11 und 12). Die Kopplungskonstante  $J_{1',2'}$  der Glucoseeinheit mit 3,7 Hz bestätigte das Vorliegen einer  $\alpha$ -Konfiguration. Mit Hilfe von TOCSY Experimenten (Einstrahlung auf 5,17 ppm,  $\tau_{\text{mix}}$  120 ms; Einstrahlung auf 3,73 ppm,  $\tau_{\text{mix}}$  120 ms) ließen sich die Signale der Protonenresonanzen der Glucose- und der Fructoseeinheit zuordnen. Im HMBC Experiment wurde ein deutliches Signal zwischen H-1' und C-2'' detektiert, die Kopplungskonstanten  $J_{2',3'}$ ,  $J_{3',4'}$  und  $J_{4',5'}$  mit je 9,7 Hz sowie  $J_{3'',4''}$  und  $J_{4'',5''}$  mit je 8,0 Hz bestätigten die diaxiale Anordnung der entsprechenden Protonen.

Somit wurden die Vorläufer **AK3**, **AK4** und **AK5** als (3-Methylbutanoyl)-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid, (3-Methylbutanoyl)-6-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranosid und als (3-Methyl-2-butenoyl)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid identifiziert. In Abbildung 50 sind die Strukturen der drei Prekursoren dargestellt.

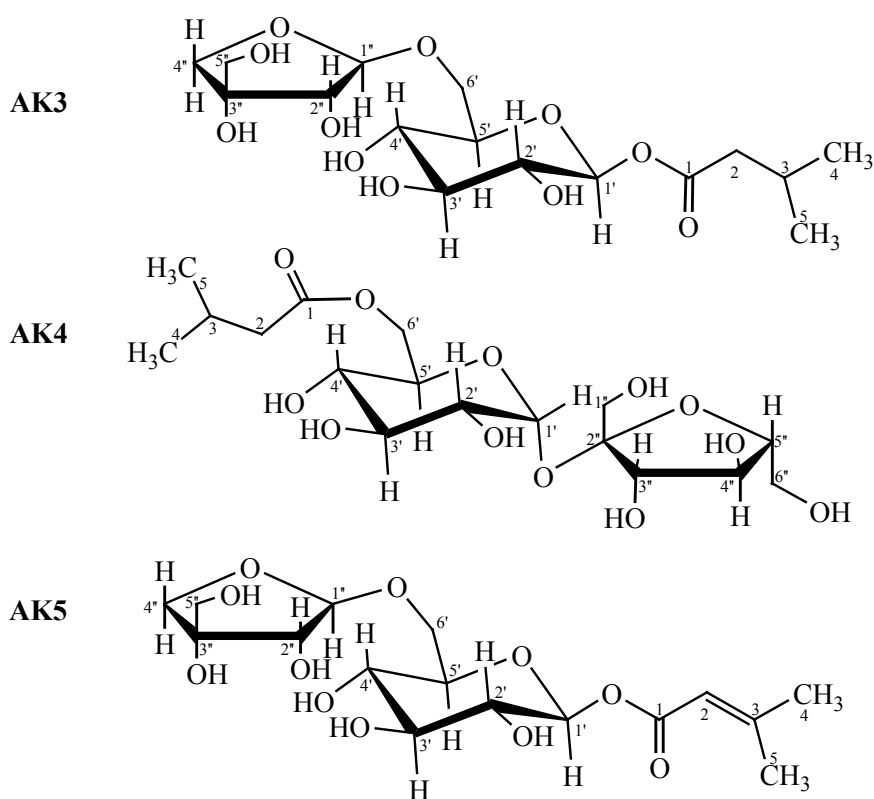


Abb. 50: Strukturen der isolierten Zuckerester (3-Methylbutanoyl)-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid **AK3**, (3-Methylbutanoyl)-6-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranosid **AK4** und (3-Methyl-2-butenoyl)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid **AK5**.

Wie oben schon erwähnt, hat man bisher nur wenige Aromastoffprekursoren beschrieben, bei denen das Aglykon mit einer Carboxyleinheit über eine Esterbindung an einen Zucker gebunden ist, wie z.B. beim 2,6-Dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-diensäure-glucoseester (Winterhalter *et al.*, 1997b; Bonnländer *et al.*, 1998; Miyase *et al.*, 1999b). Auch Saccharoseester sind als Bestandteile der Glykolipidfraktion in Oberflächenlipiden der Blätter von *Petunia hybrida* bekannt (Ohya *et al.*, 1996). Hierbei taucht auch die 3-Methylbutansäure als Acylrest auf, allerdings sind die Zuckereinheiten mehrfach bzw. peracyliert. Bezüglich 3-Methyl-2-butensäure sind in *Bupleurum falcatum* und *Vitis vinifera* Glykoside beschrieben, in denen die reduzierte Form der Säure, das Isopentenol, als Aglykon an  $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranose gebunden ist (Ono *et al.*, 1999 ; Baltenweck-Guyot *et al.*, 1997). Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit isolierten Aromastoffprekursoren in Form der acylierten Disaccharide (3-Methylbutanoyl)-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid **AK3**, (3-Methylbutanoyl)-6-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranosid **AK4** und (3-Methyl-2-butenoyl)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid **AK5** sind nach dem aktuellen Stand der Literatur noch nicht gefunden worden.

## 2.3 Untersuchungen zur Herkunft von Rohkaffee mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) von Coffein

In der Einleitung ist darauf hingewiesen worden, dass unter den aktuellen Fragestellungen lebensmittelchemischer Forschung, die sich mittels instrumenteller Analytik bearbeiten lassen, zunehmend Probleme der Herkunftsbestimmung von Lebensmitteln bzw. deren Inhaltsstoffe zu nennen sind. Aufgrund neuer technischer Entwicklungen haben hierzu Methoden der Analyse stabiler Isotope an Bedeutung gewonnen. Wir nutzten die uns zur Verfügung stehenden Möglichkeiten neuester Isotopenanalytik und versuchten, anhand einer Multielementanalyse von Coffein aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft einen Beitrag zu dieser aktuellen Forschungsentwicklung zu leisten. Das Vorgehen und die erzielten Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abschnitten zusammengestellt.

### 2.3.1 Herkunftsanalytik mittels Isotopenverhältnisbestimmung

Isotope unterscheiden sich nur in der Anzahl an Neutronen. Sie lassen sich einteilen in stabile und instabile (radioaktive) Isotope (Hoefs, 1973). Die Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff liegen als Mischungen von zwei oder mehreren Isotopen vor, die relativen Häufigkeiten [Atom-%] ihrer stabilen Isotope sind in Tabelle 13 aufgeführt (Way *et al.*, 1950; Nier, 1950; Garlick, 1969). Die Anteile sind als globale Mittelwerte zu verstehen, deren aktuelle genaue Anteile sich durch Isotopieeffekte und Isotopenfraktionierungsprozesse ergeben (siehe unten).

Die schweren Isotope bewegen sich im Gegensatz zu den leichten Hauptisotopen in einem Bereich von 1 Atom-% oder weniger. Von den drei stabilen Sauerstoff-Isotopen (Tabelle 13) wird aufgrund der größeren Massendifferenz und Häufigkeit des  $^{18}\text{O}$ -Isotops das  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis für Sauerstoff-Isotopenverhältnis-Messungen genutzt. Um die sehr kleinen Differenzen der Isotopenzusammensetzung auf geeignete Art ausdrücken zu können, liegt die Besonderheit von Isotopenverhältnis-Bestimmungen in relativen Angaben. Bei der sog. „ $\delta$ -Notierung“ wird das Isotopenverhältnis der Probe mit dem eines weltweiten Standards

verglichen:  $\delta_{\text{Probe}}$  in ‰ =  $\left( \frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000$ . So können Variationen in der zweiten und

dritten Dezimalstelle angezeigt werden. Das Isotopenverhältnis R repräsentiert den Quotien-



ten der Konzentration des schweren im Vergleich zum leichten Isotop sowohl des Standards

als auch der Probe ( $R = \frac{\text{Gehalt}_{\text{schweres Isotop}}}{\text{Gehalt}_{\text{leichtes Isotop}}}$ ), z. B.  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  oder  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  (Fritz und Fontes, 1980).

Die Isotopenverhältnisse der gebräuchlichen internationalen Isotopenstandards repräsentieren die Nullpunkte der entsprechenden  $\delta$ -Skalen. Je positiver bzw. weniger negativ ein  $\delta$ -Wert ist, desto reicher ist die Substanz an schwerem Isotop, ein negativer Wert zeigt eine Abreicherung des selteneren Isotops im Vergleich zum leichteren Hauptisotop an.

Tab. 13: Vorkommen der stabilen Isotope der Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff in der Natur (Way *et al.*, 1950; Nier, 1950; Garlick, 1969).

Element	Isotop	Isotopenhäufigkeit [Atom-%]	relative Isotopenmasse
Wasserstoff	$^1\text{H}$	99,9844	1,007825
	$^2\text{H}$ (D)	0,0156	2,014102
Kohlenstoff	$^{12}\text{C}$	98,8900	12,000000
	$^{13}\text{C}$	1,1100	13,003355
Sauerstoff	$^{16}\text{O}$	99,7630	15,994915
	$^{17}\text{O}$	0,0375	16,999130
	$^{18}\text{O}$	0,1995	17,999159

Einheitliche Standards für Analysen stabiler Isotope sind wichtig, um Ergebnisse verschiedener Laboratorien vergleichen zu können. Die Internationale Atomenergiebehörde in Wien (IAEA) und das Nationale Institut für Standards in den USA (NBS) koordinieren die Vorbereitung, Kalibrierung und Verteilung international anerkannter Standards (Fritz und Fontes, 1980). Der allgemein anerkannte Standard für Kohlenstoff ist PDB (Pee Dee Belemnite), ein fossiles Calciumcarbonat aus dem Skelett der Belemnitella americana der Pee Dee Formation in South Carolina (USA) bzw. das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis des  $\text{CO}_2$ -Gases ( $R_{\text{PDB}}$ : 0,0112372), das durch Reaktion dieses zerkleinerten Carbonats mit 100 %iger Phosphorsäure bei 25,2°C erhalten wird (Craig, 1957). Für Sauerstoff wird ebenfalls PDB als Standard eingesetzt, mittlerweile gebräuchlicher ist allerdings V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water), Umrechnungen untereinander sind möglich (Craig, 1957). V-SMOW ist ein Wasserstandard, dessen Isotopenzusammensetzung mit einem  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis von  $2,0052 \cdot 10^{-3}$  (Baertschi, 1976) sehr nahe an der des Ozeanwassers mit konstanter Isotopenzusammensetzung liegt (Dansgaard, 1964). Dieser Standard wird durch Mischen von destilliertem Ozeanwasser mit kleinen Anteilen anderer Wässer von der IAEA künstlich und definiert hergestellt. Neben V-SMOW vertreibt die IAEA noch weitere  $^{18}\text{O}$ -Standards, wie z.B.

NBS-1, SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation) und GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation). Für Wasserstoff-Messungen kommen nur Wasser-Standards zum Einsatz, deren Isotopenverhältnisse absolut bestimmt sind (Craig, 1961b; Gonfiantini, 1978). Das  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnis von V-SMOW wurde z.B. mit  $0,15576 \cdot 10^{-3}$  determiniert (Hageman *et al.*, 1970), und ist als Nullpunkt der  $\delta$ -Skalierung etabliert. In Tabelle 14 sind die international anerkannten Standards für Isotopenverhältnis-Messungen der Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff zusammengefasst.

Tab. 14: International anerkannte Standards für Isotopenverhältnis-Messungen der Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff (Craig, 1961b; Hageman *et al.*, 1970; Gonfiantini, 1978; Fritz und Fontes, 1980).

Isotopen- verhältnis	Standard			
	Verbindung	internationaler Name	Abkürzung	R-Wert <sup>a)</sup>
$^2\text{H}/^1\text{H}$	H <sub>2</sub> O	(Vienna) Standard Mean Ocean Water	(V-)SMOW	0,00015576
	„	Standard Light Antarctic Precipitation	SLAP	0,00008902
	„	Greenland Ice Sheet Precipitation	GISP	--
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	CaCO <sub>3</sub>	(Vienna) Pee Dee Belemnite	(V-)PDB	0,01123720
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	H <sub>2</sub> O	(Vienna) Standard Mean Ocean Water	(V-)SMOW	0,00200520
	„	Standard Light Antarctic Precipitation	SLAP	--
	„	Greenland Ice Sheet Precipitation	GISP	--
	CaCO <sub>3</sub>	(Vienna) Pee Dee Belemnite	(V-)PDB	--

<sup>a</sup> Definition R-Wert siehe oben.

Isotopieeffekte und Isotopenfraktionierungen führen zu charakteristischen Isotopengehalten und –mustern in natürlichen und synthetischen organischen Verbindungen. Somit können die individuellen Isotopenverhältnisse zur Herkunftsanalytik verwendet werden. Isotopieeffekte entstehen aufgrund von Unterschieden in den physikalischen und chemischen Eigenschaften von isotopisch verschiedenen Verbindungen gleicher Struktur (Isotopomere). Es wird zwischen thermodynamischen und kinetischen Isotopieeffekten unterschieden. Erstere bilden sich über Gleichgewichte heraus, Letztere werden durch die unterschiedlichen Reaktionsraten der unterschiedlichen Isotopenspezies hervorgerufen (Hoefs, 1973; Fritz und Fontes, 1980; Winkler, 1984; Schmidt *et al.*, 1998). Unter Isotopenfraktionierung versteht man die Verteilung von Isotopen zwischen zwei Substanzen mit verschiedenen Isotopenverhältnissen, z.B. bedingt durch physiko-chemische Prozesse wie Verdunstung und Kondensation (Hoefs, 1973).

Die primären Quellen jeglichen Kohlenstoffs in biologischem Material sind das CO<sub>2</sub> der Atmosphäre mit einem  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert zwischen -6,4 und -7,3 ‰ (abhängig vom Grad der Industrialisierung) und das Hydrogencarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) der Hydrosphäre, das aufgrund eines thermodynamischen Isotopieeffekts beim Lösen von CO<sub>2</sub> mit einem  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert von ungefähr 0 ‰ etwas angereicherter ist (Craig, 1957; Keeling, 1961; Deuser und Hunt, 1969; Keeling *et al.*, 1979; Deines, 1980). Während der Photosynthese kommt es beim Einbau von CO<sub>2</sub> in organisches Material zur biochemischen Diskriminierung von <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, so dass alle Pflanzen im Vergleich zu ihrer anorganischen Kohlenstoffquelle an <sup>13</sup>C abgereichert sind (negative  $\delta$ -Werte). Das Ausmaß der Diskriminierung ist abhängig vom Photosyntheseweg. C<sub>3</sub>-Pflanzen (sog. isotopisch „leichte“ Pflanzen) weisen  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte zwischen -34 und -24 ‰ auf, C<sub>4</sub>-Pflanzen (sog. isotopisch „schwere“ Pflanzen) zwischen -16 und -10 ‰. Werden C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen, die unter gleichen Umweltbedingungen wachsen, verglichen, dann ergibt sich eine durchschnittliche Differenz von 12 bis 14 ‰ im Kohlenstoff-Isotopengehalt. Die geringere Isotopenfraktionierung von C<sub>4</sub>-Pflanzen im Vergleich zu C<sub>3</sub>-Pflanzen liegt v.a. an verschiedenen starken Isotopendiskriminierungen der beteiligten Enzyme. Im dritten, selteneren Photosyntheseweg, dem Crassulaceen-Säurestoffwechsel (Crassulacean Acid Metabolism, CAM) ergeben sich <sup>13</sup>C-Abreicherungen mit  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werten von -30 bis -12 ‰, also zwischen denen der C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen (Wickman, 1952; Bender, 1971; Smith, 1971; De Niro und Epstein, 1978; O’Leary, 1981; Winkler, 1984).

Während des Sekundärmetabolismus treten weiterhin Isotopieeffekte auf, v.a. bei der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion, einer zentralen Reaktion ausgehend von den primären Assimilationsprodukten (Kohlenhydraten). Deswegen sind in allen drei Pflanzentypen die Kohlenhydrate als Primärprodukte des pflanzlichen Stoffwechsels die „schwersten“ Verbindungen, die sekundären Pflanzenprodukte sind als Folge kinetischer Isotopieeffekte im Sekundärmetabolismus mehr oder weniger abgereichert an <sup>13</sup>C (Abbildung 51). Für Proteine beträgt die Abreicherung an <sup>13</sup>C 2 ‰, für Lipide sogar 5 bis 10 ‰, da Acetyl-CoA ein für die Lipidsynthese erforderliches C<sub>2</sub>-Intermediat ist (Abbildung 51) (Abelson und Hoering, 1961; Whelan *et al.*, 1970; De Niro und Epstein, 1977; Melzer und Schmidt, 1987).

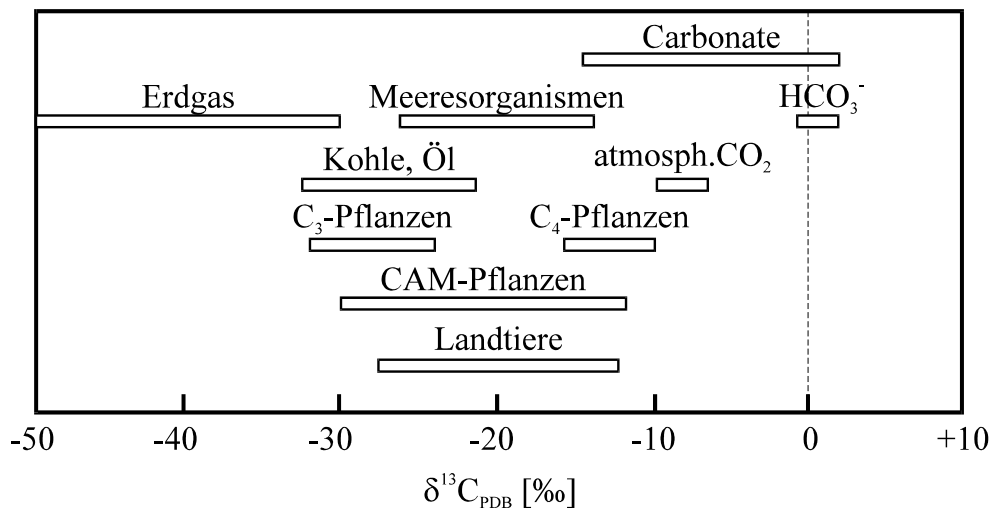


Abb. 51: Schwankungsbreite der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte des in der Natur vorkommenden Kohlenstoffs. Dargestellt sind sowohl die anorganischen Quellen, als auch das sich daraus ergebende biologische und fossile Material (Winkler, 1984).

Der Kreislauf des Wassers spielt für die Verteilung von Wasserstoff und Sauerstoff auf der Erde eine wichtige Rolle. Im Wasserkreislauf korrelieren die Isotopenfraktionierungen von Wasserstoff mit denen des Sauerstoffs (Friedman, 1953; Brenninkmeijer *et al.*, 1982; Yakir *et al.*, 1990). Die Isotopenverhältnisse von Deuterium und schwerem Sauerstoff im Wasser auf der ganzen Welt weisen einen linearen Zusammenhang zueinander in Form von  $\delta^2\text{H} = 8 \cdot \delta^{18}\text{O} + 10$  auf (Friedman, 1953; Craig, 1961a). Dies bezieht sich auf die sogenannten meteorologischen bzw. natürlichen Wässer, d.h. Flüsse, Seen, Regen, Schnee, Gletscher, die den meteorologischen Kreislauf (Verdunstung, Kondensation, Niederschlag) durchlaufen haben (Epstein und Mayeda, 1953; Hoefs, 1973).

Ozeanwasser weist eine konstante Isotopenzusammensetzung auf (Variation von  $< 1$  ‰ für Wasserstoff;  $0,1$  ‰ für Sauerstoff). Für natürliches Wasser ergeben sich systematische geographische Isotopen-Variationen von  $400$  ‰ auf der  $\delta^2\text{H}$ -Skala und von  $80$  ‰ auf der  $\delta^{18}\text{O}$ -Skala, abhängig von klimatischen und anderen ökologischen Faktoren, hauptsächlich durch thermodynamische Isotopieeffekte bei Verdunstungs- und Kondensationsvorgängen hervorgerufen (Epstein und Mayeda, 1953; Hoefs, 1973). Den größten Anteil daran haben die unterschiedlichen Dampfdrücke  $p$  der fünf verschiedenen Isotopomere von Wasser:  $p(\text{H}_2^{16}\text{O}) > p(\text{HD}^{16}\text{O}) > p(\text{H}_2^{18}\text{O}) > p(\text{HD}^{18}\text{O}) > p(\text{D}_2^{18}\text{O})$ . Unter dem Einfluss der Sonne verdunstet in Küstennähe Meerwasser, wobei bevorzugt die leichten Wassermoleküle ( $^1\text{H}$  bzw.  $^{16}\text{O}$ ) in die Gasphase überwechseln, so dass Wasserdampf im Vergleich zur flüssigen Phase immer ärmer ist an schweren Isotopen ( $^2\text{H}$  und  $^{18}\text{O}$ ) (Gilfilian, 1934). Die Isotopenzusammensetzung der daraus resultierenden Niederschläge steht in Beziehung zu den kli-

matischen Verhältnissen, v.a. der Temperatur (sog. Temperatureffekt), aber auch zur Luftfeuchtigkeit und zur Niederschlagsmenge. Die Fraktionierung im Wasserkreislauf hängt zudem von geographischen Parametern (Abbildung 52) wie Ausdehnung, Höhe (sog. Höheneffekt) und Entfernung zur Küste (sog. Kontinentaleffekt) ab.

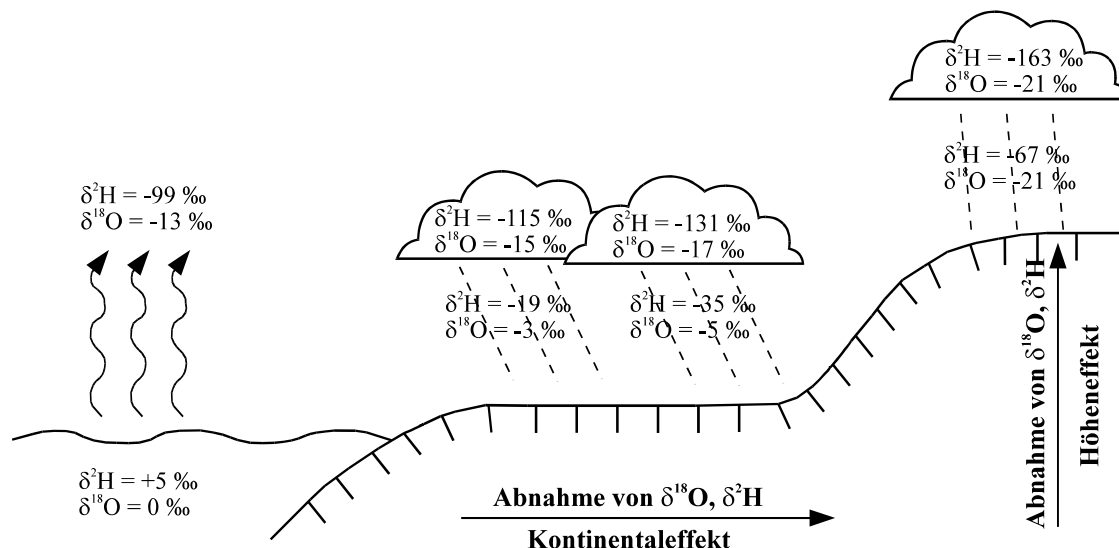


Abb. 52: Auswirkung des Kontinental- und des Höheneffekts auf die Wasserstoff- und Sauerstoff-Isotopenzusammensetzung in natürlichem Wasser (Hoefs, 1973).

Diese Fraktionierung ist umso ausgeprägter, je kühler die äußeren Temperaturen sind. Das leichte Wasser wird als Regen in höher gelegenen Gebieten abgelagert, und macht deswegen Wasser in hohen Lagen leicht (Friedman, 1953). Der Gehalt an schweren Isotopen in frischem Wasser nimmt nicht nur mit der Höhe, sondern auch mit wachsender Entfernung vom Meer bzw. mit zunehmender Lage im Inland (Kontinentaleffekt) ab (Dansgaard, 1954). Im Landesinneren wirkt sich zusätzlich die Luftfeuchtigkeit aus: es resultieren niedrige  $\delta$ -Werte in regenreichen Monaten bzw. hohe Werte in trockenen Monaten (Dansgaard, 1964). Die Erdrotation trennt die Isotope wie in einer Zentrifuge (Erdrotationseffekt).

Das Ergebnis dieser komplexen Vorgänge ist ein globales geographisches Muster des natürlichen Isotopengehalts im hauptsächlich dem Meer entstammenden Regenwasser. In Landpflanzen beeinflusst ein weiterer Effekt die Isotopenzusammensetzung des Wassers: Durch Evapotranspiration kommt es zu einer erheblichen Fraktionierung innerhalb der Pflanze (Gonfiantini *et al.*, 1965), unabhängig vom Photosyntheseweg und von der Wasseraufnahme durch die Wurzel (Ziegler *et al.*, 1976), aber erneut beeinflusst von den klimatischen Bedingungen des Standorts der Pflanzen.

Die Wasserstoff-Quelle für das gesamte organische Material bildet die Hydrosphäre. Ausschlaggebend sind nicht die Ozeane, sondern die natürlichen Wässer auf der Erde, die letztendlich das Grundwasser bilden. Eine Schwankungsbreite für Wasserstoff von -350 bis +50 ‰ wird beobachtet, atmosphärischer Wasserstoff hat vergleichbare  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte von -200 bis +25 ‰ (Hoefs, 1973). Zudem kommt eine große Wasserstoff-Isotopenfraktionierung durch lebende Organismen zustande (Friedman, 1953). Während der Photosynthese kommt es für die primären Assimilationsprodukte aufgrund von Wasserstoff-Isotopieeffekten zu einer Deuteriumabreicherung bis zu -180 ‰ gegenüber dem aufgenommenen Wasser, wobei  $\text{C}_3$ -Pflanzen analog zur Kohlenstoff-Isotopenverteilung stärker diskriminieren ( $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte für organisch gebundenen Wasserstoff von -132 ‰) als  $\text{C}_4$ -Pflanzen (mittlere Abreicherungen an  $^2\text{H}$  von -91 ‰ auf der  $\delta^2\text{H}$ -Skala). CAM-Pflanzen reichern nur bei Wasserstress Deuterium an, zusätzlich spielt der höhere Deuterium-Gehalt des Grundwassers an ariden Standorten, an denen CAM-Pflanzen evolutionsbedingt häufig anzutreffen sind, eine Rolle (Ziegler *et al.*, 1976). Im Sekundärmetabolismus resultieren Substanzklassen mit verschiedenen Deuteriumgehalten: Proteine weichen in ihrer Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung nicht stark von den Kohlenhydraten ab, wohingegen Lipide beträchtliche Deuteriumabreicherungen zeigen (Abbildung 53): n-Alkylipide diskriminieren gegenüber Deuterium um 113 bis 262 ‰ relativ zum Grundwasser, während die Abreicherung an Deuterium von Isoprenoidlipiden sogar 142 bis 376 ‰ beträgt (Smith *et al.*, 1970; Estep und Hoering, 1980; Schmidt *et al.*, 1998). Die Variation innerhalb einer Verbindungsklasse ist geringer (kleiner als 50 ‰) als zwischen den verschiedenen Lipiden eines Organismus (bis 150 ‰ sind gängig) (Sessions, *et al.* 1999).

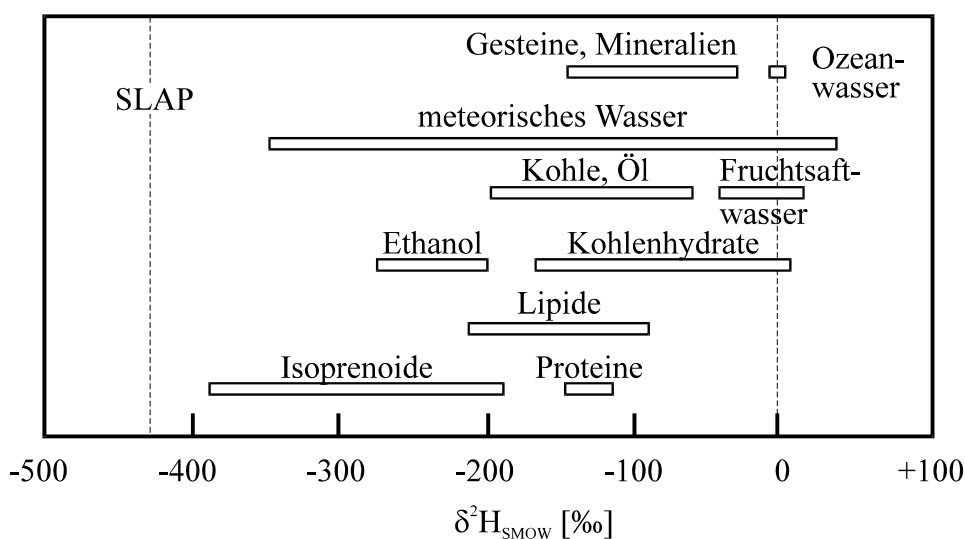


Abb. 53: Schwankungsbreite der  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte des in der Natur vorkommenden Wasserstoffs, anorganisch und organisch (Winkler, 1984).

Der Metabolismus des Elements Sauerstoff mit der größten Häufigkeit auf der Erde ist sehr komplex. Außerdem besitzt es mehrere anorganische Quellen, die die  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte organisch gebundenen Sauerstoffs beeinflussen: Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ;  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Wert von  $\sim 41\text{‰}$  (Craig, 1954) bzw. Bicarbonat, molekularer (Luft-)Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ;  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Wert von  $23,5\text{‰}$  (Kroopnick und Craig, 1972) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Im natürlichen Wasser variieren die Anteile an Sauerstoff-Isotopen durch Fraktionierung im globalen Wasserkreislauf, wie oben dargestellt, allerdings im Vergleich zu den Wasserstoff-Isotopen aufgrund der geringen Massendifferenz weniger stark ausgeprägt. Zwar ist für intrakontinentales Wasser ein Bereich von  $-50$  bis  $+30\text{‰}$  detektiert worden, in mittleren Klimazonen bewegt sich natürliches Wasser allerdings zwischen  $-15$  und  $+5\text{‰}$  (Hillaire-Marcel, 1986; Schmidt *et al.*, 1998). Beim Einbau des Sauerstoffs in organisches Material aus diesen Quellen kommt es zusätzlich zu Isotopieeffekten. Für Kohlenhydrate als primäre Assimilationsprodukte ergeben sich somit  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte (Abbildung 54) von  $25\text{‰}$ , von  $17\text{‰}$  für Proteine, sogar von  $5$  bis  $11\text{‰}$  für Lipide, um  $0\text{‰}$  für Verbindungen, die Sauerstoffatome aus dem Wasser enthalten, und um  $+10\text{‰}$  für Produkte aus Hydroxylierungsreaktionen, wie Phenole (Hillaire-Marcel, 1986; Schmidt *et al.*, 1998).

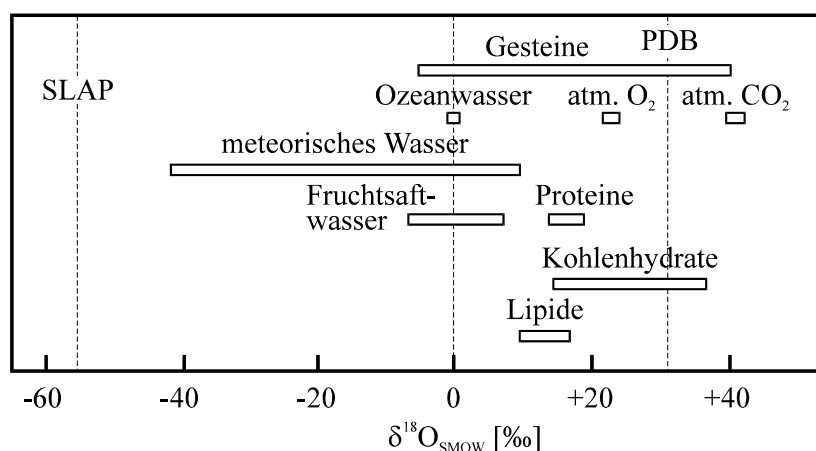


Abb. 54: Schwankungsbreite der  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte des in der Natur vorkommenden Sauerstoffs (Winkler, 1984).

In Tabelle 15 sind die  $\delta$ -Werte von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff zusammengefasst, bezogen auf die Standards PDB (für Kohlenstoff) und V-SMOW (für Wasserstoff und Sauerstoff) der anorganischen Quellen und des biologischen Materials für  $\text{C}_3$ -Pflanzen ( $\text{C}_4$ -Pflanzen).

Tab. 15: Gegenüberstellung der  $\delta$ -Werte von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff, bezogen auf die Standards PDB (für Kohlenstoff) und V-SMOW (für Wasserstoff und Sauerstoff) der anorganischen Quellen und des biologischen Materials für C<sub>3</sub>-Pflanzen (C<sub>4</sub>-Pflanzen). Kohlenhydrate von CAM-Pflanzen können bis zu  $\delta^2\text{H}$ -Werten von +50 ‰ angereichert sein (Schmidt *et al.*, 1998).

$\delta$ -Werte [‰] <sub>Standard</sub>	Kohlenstoff	Wasserstoff	Sauerstoff
primäre Quelle(n)	CO <sub>2</sub> : -7 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> : $\pm 0$	H <sub>2</sub> O: -350 bis +50	H <sub>2</sub> O: -15 bis +5 CO <sub>2</sub> : +41 O <sub>2</sub> : +23,5
biologisches Material	-35 bis -5	-400 bis +100	-5 bis +40
Kohlenhydrate	-30 bis -21 (-15 bis -9)	-170 bis -30 (-100 bis $\pm 0$ )	+20 bis +40
Fettsäuren, Isoprenoide	-32 bis -28 (-16 bis -12)	-400 bis -200	+5 bis +10
Aminosäuren	-29 bis -25 (-14 bis -11)	-300 bis -100 (geschätzt)	-5 bis +10
Aromaten, Phenylpropane	-32 bis -26 (-21 bis -14)	-150 bis -70	$\pm 5$ bis +15

Für die Bestimmung globaler Isotopenverhältnisse, die für die Herkunft und Authentizität von biologischem Material charakteristisch sind, hat sich die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) durchgesetzt. Die Voraussetzung für diese analytische Technik liegt in der Überführung der organischen Moleküle in einfache Gase. Die instrumentell-analytischen Grundlagen der EA-IRMS sind in Kapitel 2.3.1.2 erläutert. Aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Bestimmung von Isotopenverhältnissen sind von van Trigt *et al.* (2001) beschrieben. Die Arbeitsgruppe verwendet für die Untersuchungen zur Isotopenverhältnisbestimmung von Wasser die sogenannte Laserspektrometrie (van Trigt *et al.*, 2001). Mit dieser Methode, die auf einem Infrarot-Laser Direkt-Absorptions-Spektrometer basiert, ist es im Gegensatz zur IRMS möglich, kondensierbare Gase (wie z.B. Wasserdampf) direkt zu vermessen.



### 2.3.2 Instrumentell-analytische Grundlagen

Durch on-line Kopplung des Isotopenverhältnis-Massenspektrometers an einen Elementaranalysator (EA) ist es möglich, Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnisse einer Vielzahl organischer und anorganischer Verbindungen in natürlicher Häufigkeit zu bestimmen. Im EA werden die eingesetzten Substanzen vollständig in die Messgase umgewandelt.

Die Voraussetzung für einwandfreie Ergebnisse ist größtmögliche Reinheit der Verbindungen, da diese 'totalverbrannt' bzw. 'totalpyrolysiert' werden und sich somit jede kleinste Verunreinigung auf das Isotopenverhältnis auswirkt. In Abbildung 55 ist schematisch das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte IRMS-Systems dargestellt. An das Massenspektrometer sind über ein T-Stück die Referenzgaszuleitung sowie die Elementaranalysatoren (EA: Verbrennung bzw. Pyrolyse) angeschlossen.

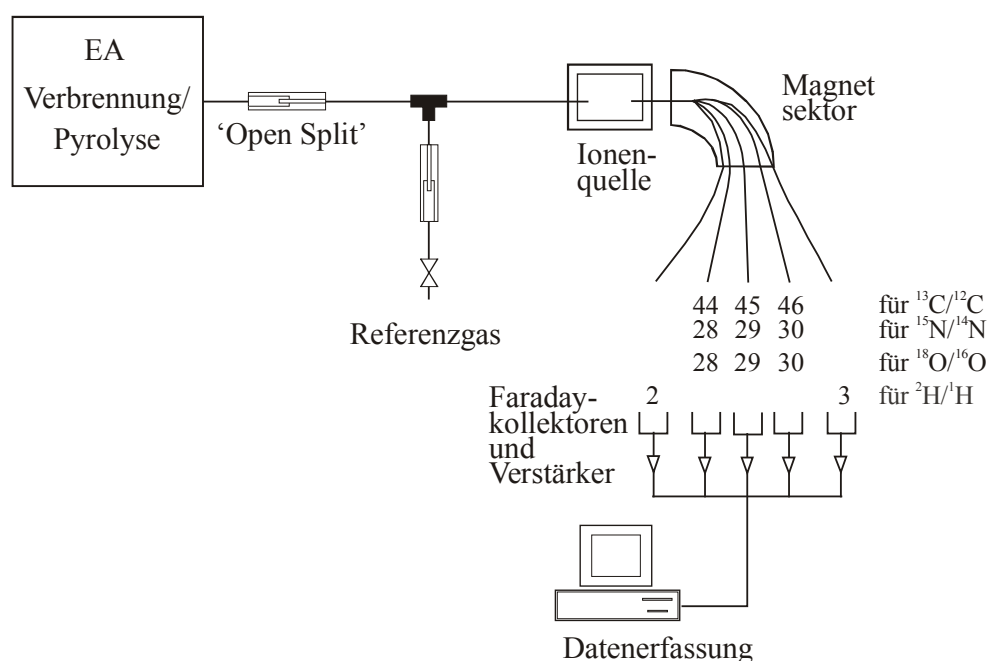


Abb. 55 Schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten IRMS-Systems; das Massenspektrometer ist über ein T-Stück mit der Referenzgaszuleitung sowie den Elementaranalysatoren (EA: Verbrennung bzw. Pyrolyse) verbunden.

Bei der Verbrennungstechnik zur Messung der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse werden organische oder anorganische Proben in Zinnkapseln in die heiße Zone des mit Wolframoxid, Quarzwolle und Kupfer gefüllten Quarzreaktors eingebracht (Abbildung 56).

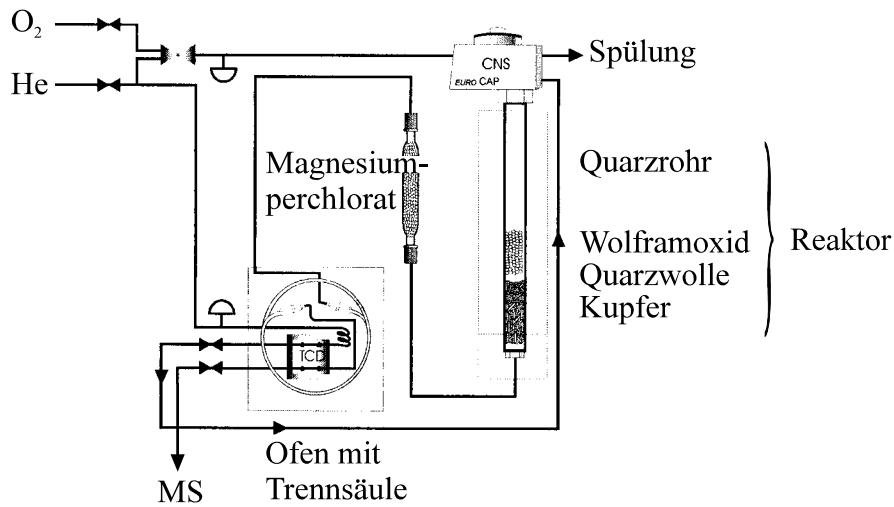


Abb. 56: Aufbau eines Elementaranalysators zur Bestimmung von Kohlenstoff-Isotopenverhältnissen (Oxidation); der Reaktor besteht aus einem mit Wolframoxid, Quarzwolle und Kupfer gefüllten Quarzrohr.

Die gesamte Probenmenge wird im Heliumstrom mit elementarem Sauerstoff sofort bei  $1000^\circ\text{C}$  verbrannt. Die erhaltenen Gase  $\text{CO}_2$ , ( $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$ ) und  $\text{H}_2\text{O}$  werden im Heliumstrom durch den Reduktionsofen aus Kupfer geleitet, der den überschüssigen Sauerstoff entfernt und die Stickoxide zu Stickstoff umwandelt. Anschließend durchläuft der Gasstrom eine Wasserfalle (Magnesiumperchlorat) zur Entfernung des bei der Oxidation entstandenen Wassers. Die Auftrennung der Verbrennungsgase erfolgt auf einer gepackten GC-Säule (Molekularsieb) im Ofen bei konstanter Temperatur ( $95^\circ\text{C}$ ).

Die Sauerstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnisse werden mittels einer pyrolytischen Technik im Hochtemperaturofen (HTO) bestimmt. Die Einwaage der Proben erfolgt in Silberkartuschen. Der Reaktor besteht aus einem Keramikrohr, in das ein Glaskohlenstoffrohr eingeführt ist. Das innere Rohr ist mit nickelbelegter Kohle, Glaskohlenstoffsplittern und Nickelwolle (Abbildung 57) gefüllt. Bei  $1460^\circ\text{C}$  reagieren die in der Probe enthaltenen Sauerstoff- und Wasserstoffatome mit der Kohlenstoff-Füllung zu  $\text{CO}$  und  $\text{H}_2$ .

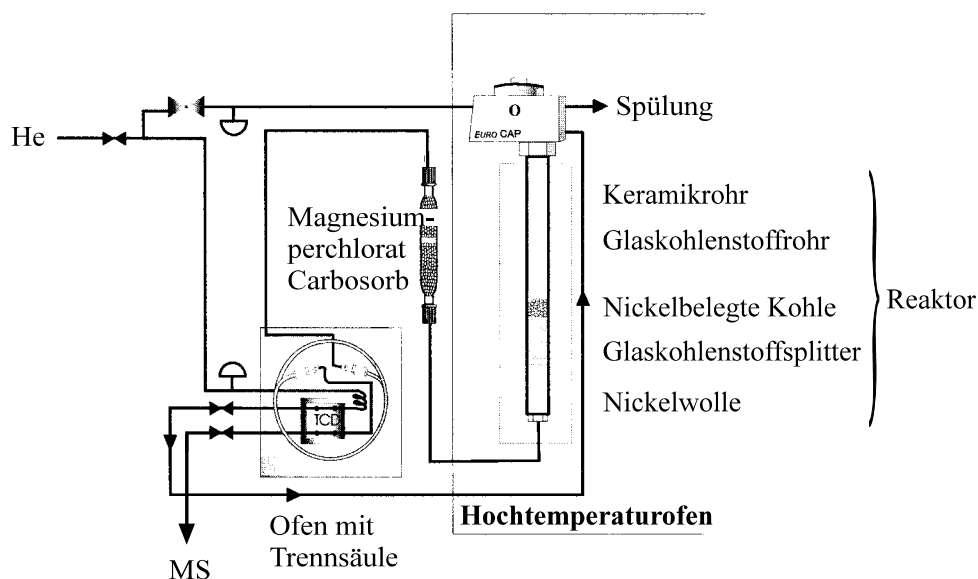


Abb. 57: Aufbau eines Elementaranalysators zur Bestimmung von Sauerstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnissen (Pyrolyse).

Im Heliumträgergasstrom werden die Pyrolysegase durch chemische Gasabsorbentien - Carbosorb (anionisches Adsorptionsmaterial) zur Entfernung von  $\text{CO}_2$ , Sauerstoff, etc. sowie Magnesiumperchlorat zur Entfernung von Wasser - gereinigt. Eine chromatographische Trennung von  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  sowie  $\text{H}_2$  vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgt wie bei Kohlenstoff-Messungen auf einer gepackten GC-Säule (Molekularsieb) im Ofen bei konstanter Temperatur ( $95^\circ\text{C}$ ). Die durch das Molekularsieb getrennten Messgase ( $\text{CO}_2$  für Kohlenstoff-,  $\text{CO}$  für Sauerstoff- bzw.  $\text{H}_2$  für Wasserstoff-Isotopenverhältnis-Bestimmungen) werden über einen sog. „Open Split“ in die Ionenquelle des IRMS eingeführt. Nach Trennung der mittels Elektronenstoß ionisierten Moleküle im Sektorfeld des Massenanalysators werden die Masse-Ladungsverhältnisse  $m/z$  44 ( $^{12}\text{CO}_2$ ) und  $m/z$  45 ( $^{13}\text{CO}_2$ ) für Kohlenstoff-,  $m/z$  28 ( $\text{C}^{16}\text{O}$ ) und  $m/z$  30 ( $\text{C}^{18}\text{O}$ ) für Sauerstoff- und  $m/z$  2 ( $^1\text{H}_2$ ) und  $m/z$  3 ( $^1\text{H}^2\text{H}$ ) für Wasserstoff-Isotopenverhältnissen detektiert. Die erhaltenen Ergebnisse werden automatisch auf das vorher eingeführte Referenzgas (separate Referenzgaszufuhr) bezogen und somit direkt  $\delta$ -Werte in ‰ errechnet.

Bei Kohlenstoff-Isotopenverhältnis-Messungen erfolgt die Standardisierung der Messergebnisse durch Bezug der erhaltenen Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse auf den international anerkannten Standard PDB. Da der Standard schon seit längerem erschöpft ist, wird die Standardisierung durch den Einsatz eines gravimetrisch definierten  $\text{CO}_2$ -Referenzgases gewährleistet, das auf einen bestimmten  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert zertifiziert ist ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert:  $-24,9$  ‰). Dieses

Verfahren ist anerkannt; das zertifizierte CO<sub>2</sub>-Referenzgas wird als Primärstandard international akzeptiert. Analog geht die Standardisierung von Wasserstoff-Isotopenverhältnis-Messungen relativ zu SMOW vonstatten (zertifizierter  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Wert des H<sub>2</sub>-Referenzgases: -200 ‰). Für Wasserstoff-Isotopenverhältnis-Messungen ist diese Vorgehensweise zwar (noch) nicht anerkannt, es wurde allerdings gezeigt, dass diese Methodik reproduzierbar ist (Hör, 2001).

Für Sauerstoff-Isotopenverhältnis-Messungen ist im Gegensatz zur <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Analytik kein gravimetrisch definiertes, auf einen internationalen Standard zertifiziertes Referenzgas erhältlich. Die Standardisierung der Messergebnisse durch Bezug der erhaltenen Sauerstoff-Isotopenverhältnisse auf den international anerkannten Standard SMOW erfolgt also indirekt. Anstelle eines zertifizierten Referenzgases wird ein CO-Referenzgas unbekannter Sauerstoff-Isotopenzusammensetzung als Standard eingesetzt. Der unbekannte  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Wert dieses Referenzgases wird durch Messung des anorganischen Isotopenstandards BaCO<sub>3</sub> (zertifizierter  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Wert von -15,3 ‰) mittels EA-IRMS ermittelt und in regelmäßigen Abständen überprüft. Anschließend werden die untersuchten Substanzen, die automatisch auf das eingesetzte Referenzgas bezogen werden, auf SMOW umgerechnet (Ruff, 2001). Zusätzlich werden die Ergebnisse durch interne und externe Laborstandards, deren  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte extern bestimmt werden, kontrolliert. Um Schwierigkeiten durch die Verwendung des metastabilen CO als Standard auszuschließen, wird zusätzlich die zeitliche Entwicklung der  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte dieses Gases beobachtet (Ruff, 2001).

### 2.3.3 Biosynthese von Coffein

Das Alkaloid Coffein, dessen Vorkommen in 13 verschiedenen Pflanzenordnungen beschrieben ist, stellt eine der Schlüsselkomponenten in zahlreichen Untersuchungen über die Biosynthese und den Metabolismus von Purinbasen dar (Scheline, 1991; Suzuki *et al.*, 1992; Ashihara und Crozier, 2001). Im Mittelpunkt dieser Studien stehen dabei die Genera *Camellia*, *Coffea*, *Cola*, *Paullinia*, *Ilex* und *Theobroma*. Der Coffeingehalt in Samen von verschiedenen *Coffea* Spezies variiert von 0,4 bis 2,4 % (Mazzafera und Carvalho, 1992). Das Alkaloid kann daher leicht aus relativ wenig Rohmaterial (100 – 200 g Samen) durch geeignete Extraktionsbedingungen im Gramm-Maßstab isoliert werden.

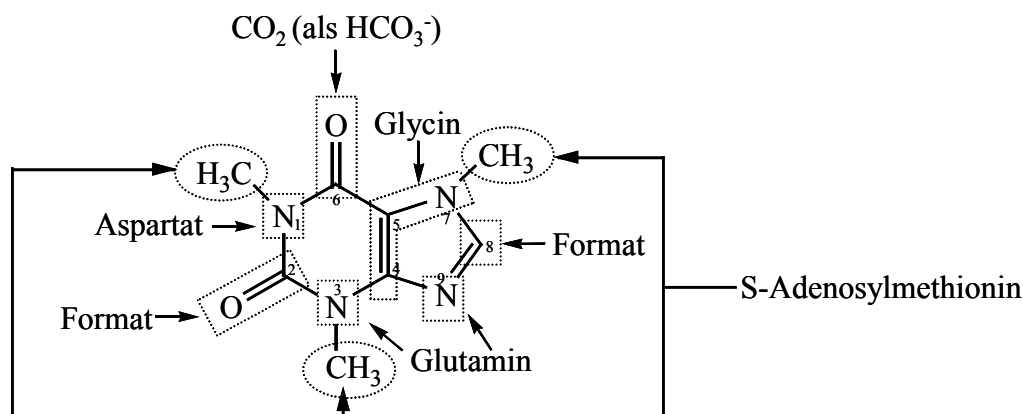


Abb. 58: Biogenetische Herkunft der Kohlen-, Sauer- und Stickstoffatome im Gerüst des Coffeins, ausgehend vom Purinring.

Purinalkaloide wie Coffein (Abbildung 58) entstehen als Sekundärmetabolite aus Purinnukleotiden, die ihrerseits primär die Vorläufer der Nucleinsäuren darstellen (Wagner und Backer, 1992). Das Grundgerüst der Purinalkaloide wird deshalb schon während der Biosynthese der Nucleotide gebildet, deren Ablauf bereits in den 50er Jahren geklärt worden ist (Buchanan, 1986). Der Purinring setzt sich aus mehreren kleinen Molekülen zusammen, die Biosynthese findet „de novo“ statt, ausgehend von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (Abbildung 59) (Atkins *et al.*, 1982; Hirose und Ashihara, 1984).

Aus der Darstellung dieses Biosyntheseweges wird ersichtlich, aus welchen Bausteinen das Coffein-Grundgerüst aufgebaut ist (Abbildung 58). Demzufolge entstammt das N-1 Stickstoffatom aus Aspartat, die Kohlenstoffatome C-4, C-5 und C-7 aus Glycin, die Stickstoffatome N-3 und N-9 sind auf die Amidfunktion der Seitenkette von Glutamin zurückzuführen, die Kohlenstoffatome C-2 und C-8 leiten sich aus aktivierten Derivaten von Tetrahydrofolat und das Kohlenstoffatom C-6 aus Kohlendioxid (Henderson und Peterson, 1973) ab. Im weiteren Verlauf der Biosynthese wird aus gebildeten Inosinmonophosphat (IMP) Adenosin (AMP) und Guaninmonophosphat (GMP) synthetisiert, die beide wiederum als Grundlage zum Aufbau der Nucleinsäuren dienen (Nygaard, 1972).

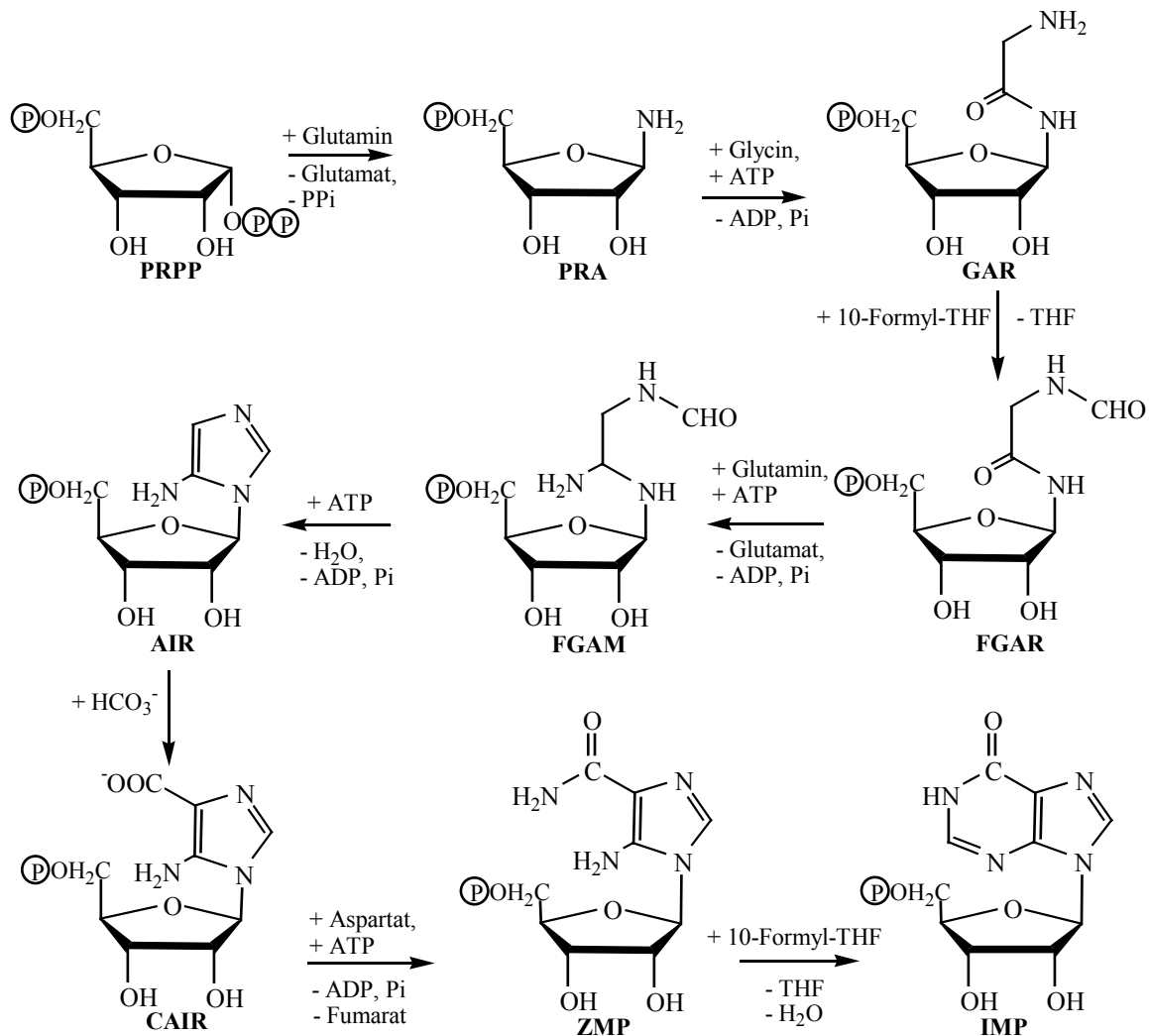


Abb. 59: „De novo“ Syntheseweg von Purinalkaloiden in Pflanzen; PRPP = 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, PRA = 5-Phosphoribosylamin, GAR = Glycinamidribonukleotid, FGAR = Formylglycinamidribonukleotid, FGAM = Formylglycinamidinribonukleotid, AIR = 5-Aminoimidazolribonukleotid, CAIR = 5-Aminoimidazol-4-carboxylatribonukleotid, ZMP = 5-Aminoimidazol-4-carboxyamidribonukleotid, IMP = Inosin-5'-monophosphat, THF = Tetrahydrofolates (nach Atkins *et al.*, 1982; Hirose und Ashihara, 1984).

Durch Desaminierungen in katabolischen Sekundärreaktionen entstehen aus den Nucleinsäuren bzw. den Monophosphaten die Vorstufen von Coffein, d.h. Xanthosinmonophosphat (XMP), Xanthosin und Xanthin. Durch Methylierung entstehen daraus 7-Methylxanthin (Weg I) bzw. 3-Methylxanthin (Weg II), wobei der Weg über 7-Methylxanthin den Hauptweg darstellt und über Theobromin zum Coffein führt (Abbildung 60) (Ogutuga und Northcote, 1970); der Zweig über Paraxanthin ist nur als eine unbedeutende Nebenreaktion beschrieben.

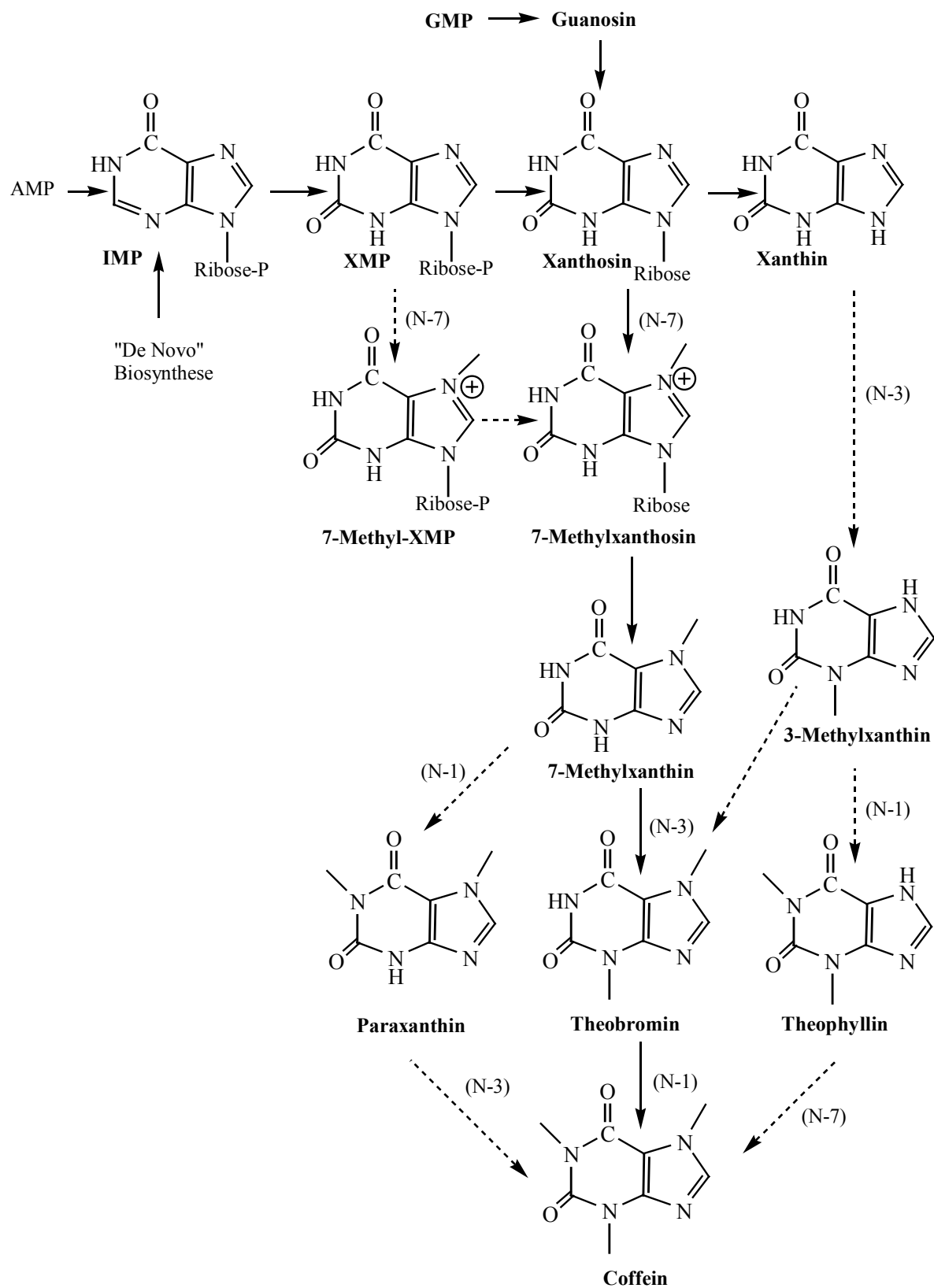


Abb. 60: Biosynthesewege für Purinalkaloide in Tee und Kaffee, durchgezogene Pfeile kennzeichnen den Hauptweg; N-1, N-3 und N-7 zeigen die Position des jeweils methylierten Stickstoffatoms an (Hirose und Ashihara, 1984).

Die Methylierung kann auf der Stufe der Nukleotide, der Nucleoside und der Nucleobasen stattfinden. Als Methyl donor fungiert hierbei überwiegend S-Adenosylmethionin (Suzuki, 1972; Konishi *et al.*, 1972); das entstehende S-Adenosylhomocystein kann regeneriert werden (Edwards, 1996).

Mit der von uns verwendeten Methodik der Bestimmung von Isotopenverhältnissen mittels Isotopenverhältnismassenspektrometrie lassen sich für die einzelnen Elemente des Coffeins (in unserem Fall Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff) nur globale Werte ermitteln, d.h. eine etwaige Zuordnung bzw. ein Rückschluss auf die einzelnen Bausteine des Coffeinmoleküls ist nicht möglich.

### **2.3.4            Herkunftsanalytik von Rohkaffee**

Zur Herkunftsanalytik von Kaffee sind verschiedene Verfahren beschrieben. Dabei muss zwischen geographischer und genotypischer Herkunft unterschieden werden. Martin *et al.* (1998) analysierten verschiedene Arabica- und Robusta-Sorten auf den Gehalt an Chlorogensäuren, Coffein, Trigonellin, Aminosäuren, Polyphenole und den Wassergehalt unter Anwendung der „principal component analysis“ (PCA). Auf dieser Grundlage war es möglich, zwischen Arabica- und Robusta- Sorten zu unterscheiden. Guerrero und Suárez (2001) erweiterten diesen Ansatz um analytische Verfahren, bei denen der Gehalt an organischen Säuren als potentiell Unterscheidungsmerkmal zwischen verschiedenen Genotypen (*Coffea arabica*-Sorten und *Coffea canephora*-Varietäten) herangezogen wurde: Mittels HPLC hat man in den einzelnen Typen die absoluten Gesamtmengen an Chlorogensäuren ermittelt und statistisch ausgewertet (Guerrero und Suárez, 2001).

Auch zur Unterscheidung von Rohkaffee bezüglich dessen geographischer Herkunft sind verschiedene Analysenansätze vorhanden. Krivan *et al.* (1993) beschrieben die Unterscheidung unterschiedlicher Kaffeeproben hinsichtlich ihrer Herkunft anhand einer Multielementanalyse. Dabei wurden mit diversen Verfahren [„Instrumental Neutron Activation Analysis“ (INAA), „Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry“ (GFAAS), „Flame Atomic Absorption Spektrometrie“ (FAAS), „Combustion Elemental Analysis“] die Mengen an Barium, Brom, Kohlenstoff, Calcium, Chrom, Kupfer, Cäsium, Eisen, Wasserstoff, Kalium, Lanthan, Magnesium, Mangan, Stickstoff, Natrium, Rubidium, Strontium und Zink bestimmt. Anhand umfangreicher Datenvergleiche ergab sich dann eine Diskrepanz zwischen den Kaffeeproben unterschiedlicher Provenienz. Des Weiteren publizierten Bicchi *et al.* (1995)



feeproben unterschiedlicher Provenienz. Des Weiteren publizierten Bicchi *et al.* (1995) eine Methode zur Unterscheidung von Kaffeeproben verschiedener geographischer Herkunft anhand des Gehaltes an Chlorogensäuren.

Eine Reihe von Arbeitsgruppen benutzten analytische Techniken unter Einbeziehung von stabilen Isotopen zur Unterscheidung von Kaffee unterschiedlicher geographischer Herkunft. Bereits 1982 ermittelten Dunbar und Wilson die  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ - und  $^{18}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse von sechs verschiedenen natürlichen und einer synthetischen Coffeinprobe. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Elementaranalysatoren mussten zur damaligen Zeit die Proben „off-line“ mit physiko-chemischen Methoden in die entsprechenden Messgase überführt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an Proben war die Aussagefähigkeit der erhaltenen Werte allerdings begrenzt.

Danho *et al.* bestimmten 1992 die  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^2\text{H}$ -Isotopenverhältnisse verschiedener Proben und konnten mittels statistischer Auswertung anhand der „Principal Component Analysis“ zwischen natürlichen und synthetischen Coffeinproben einerseits und natürlichen Coffeinproben amerikanischer und afrikanischer Herkunft andererseits unterscheiden. Prodollet *et al.* erweiterten 1997 die Datenlage durch Analyse der  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse mittels Isotopenverhältnismassenspektrometrie und der  $^2\text{H}$ -Isotopenverhältnisse anhand „Site Specific“-NMR (SNIF) von insgesamt 25 verschiedenen Coffeinproben unterschiedlicher Herkunft.

## **2.3.5 Coffein aus Rohkaffee**

### **2.3.5.1 Isolierung und Kontrolle potentieller Isotopendiskriminierung**

Das in Rohkaffe enthaltene Coffein wurde mittels Lösungsmittelverteilung aus einem Heißwasserextrakt der zerkleinerten Bohnen isoliert. Zur Kontrolle wurden mit (kommerziell erworbenen) synthetischen Coffein-Referenzen sowohl direkt als auch gemäß der für Rohkaffee verwendeten Extraktionsmethode jeweils die Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff bestimmt. Tabelle 16 gibt einen Überblick über die eingesetzten Proben und die erhaltenen  $\delta$ -Werte.

Tab. 16: Mittels EA-IRMS bestimmte  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -,  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ - und  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte (kommerziell erworbener) synthetischer Coffeinreferenzen ohne und mit extraktiver Aufarbeitung.

Kürzel	Herkunft	$\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$	$\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$
R1 <sup>a</sup>	Sigma C0750	+13,4 ± 0,5	-38,5 ± 0,2	-124 ± 3
R1 <sub>ex</sub> <sup>b</sup>	Sigma C0750	+13,3 ± 0,3	-38,3 ± 0,2	-121 ± 6
R2 <sup>a</sup>	Fluka 27600	+13,6 ± 0,4	-37,8 ± 0,2	-138 ± 5
R2 <sub>ex</sub> <sup>b</sup>	Fluka 27600	+13,6 ± 0,1	-37,8 ± 0,2	-135 ± 4
R4 <sup>a</sup>	Fluka 84677	+15,1 ± 0,4	-37,4 ± 0,2	-125 ± 3
R4 <sub>ex</sub> <sup>b</sup>	Fluka 84677	+15,0 ± 0,1	-37,3 ± 0,1	-134 ± 1

<sup>a</sup> Verbindung direkt vermessen; <sup>b</sup> Verbindung entsprechend Rohkaffee-Aufarbeitung „extrahiert“ und vermessen.

Aus dem Vergleich der  $\delta$ -Werte der direkt und nach Extraktion vermessenen Aliquote der Coffein-Referenzen R1-R3 (Tabelle 16) wird deutlich, dass der Extraktionsschritt zu keiner Isotopenfraktionierung führte. Damit konnte die verwendete Methodik uneingeschränkt zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff von natürlichem Coffein aus Rohkaffee unterschiedlicher Provenienz verwendet werden.

### 2.3.5.2 Ergebnisse von $\delta^{13}\text{C}$ -Messungen

Vor den EA-IRMS-Messungen zur Bestimmung des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses der isolierten Coffeinproben wurde die Abhängigkeit des erhaltenen Messwertes (bzw. der daraus erhaltenen Peakfläche) von der eingesetzten Menge an Coffein überprüft (Abbildung 61). Dabei stellte sich heraus, dass sich die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ Werte über den gesamten Bereich mit einer Abweichung von  $\pm 0,2$  ‰ um den Mittelwert von  $-37,8$  ‰ bewegten, dass es also keine Rolle spielte, welche Menge an Coffein zur Bestimmung verwendet wurde.

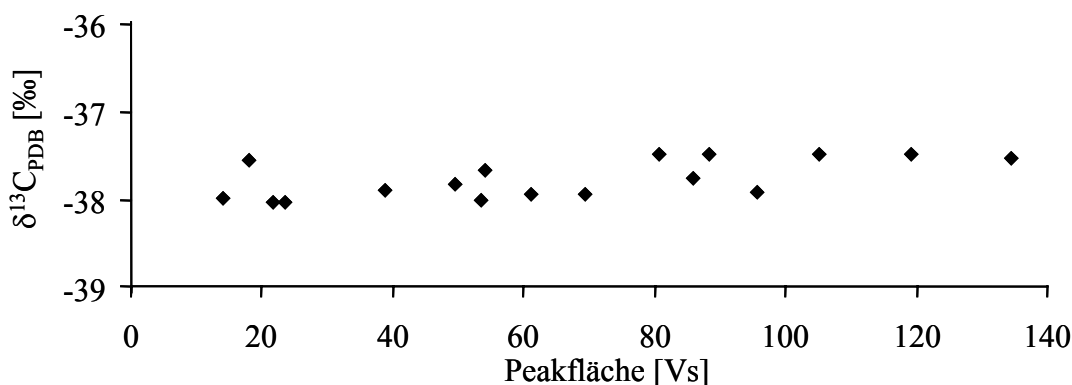


Abb. 61: Abhängigkeit der erhaltenen  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Messwerte (bzw. der daraus im Chromatogramm erhaltenen Peakfläche) von der eingesetzten Menge an Coffein.

Zur Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte der verschiedenen Coffeinproben aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft erfolgten jeweils Dreifachmessungen. Die Werte für die Standardabweichungen bewegten sich dabei zwischen 0,1 und 0,2 ‰. In Abbildung 62 sind die Ergebnisse von insgesamt 45 verschiedenen Proben, gegliedert nach ihrer geographischen Herkunft, aufgetragen.

Für die afrikanischen Kaffeeproben wurden  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte von  $-25,1 \pm 0,1$  ‰ (K42, Jemen) bis  $-28,0 \pm 0,1$  ‰ (K13, Malawi) erhalten, die amerikanischen Proben (Mittel- und Südamerika) deckten einen Bereich von  $-26,1 \pm 0,1$  ‰ (K32, Brasilien) bis  $-29,9 \pm 0,1$  ‰ (K3, Guatemala) ab. Bei den Proben Indien und Sumatra reichten die Werte von  $-25,6 \pm 0,1$  ‰ (K47, Sumatra) bis  $-29,2 \pm 0,2$  ‰ (K16, Indien), die Proben aus den Inseln Hawaii und Jamaica ergaben  $-27,1 \pm 0,2$  ‰ (K22, Hawaii) bis  $-28,7 \pm 0,1$  ‰ (K49, Hawaii). Abgesehen von Bereichen, die extrem auseinanderlagen, wie Kenia und Jemen im Vergleich zu Indien, konnte mit dieser eindimensionalen Darstellung der Daten keine Differenzierung hinsichtlich der Herkunft der Proben getroffen werden. Klar abgegrenzt anhand ihrer  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte waren jedoch die Coffeinproben natürlicher Herkunft ( $-25,1 \pm 0,1$  ‰, K42, Jemen bis  $-29,9 \pm 0,1$  ‰, K3, Guatemala) von denjenigen aus synthetischen Quellen mit Werten zwischen  $-37,4 \pm 0,2$  ‰ bis  $-38,5 \pm 0,2$  ‰.

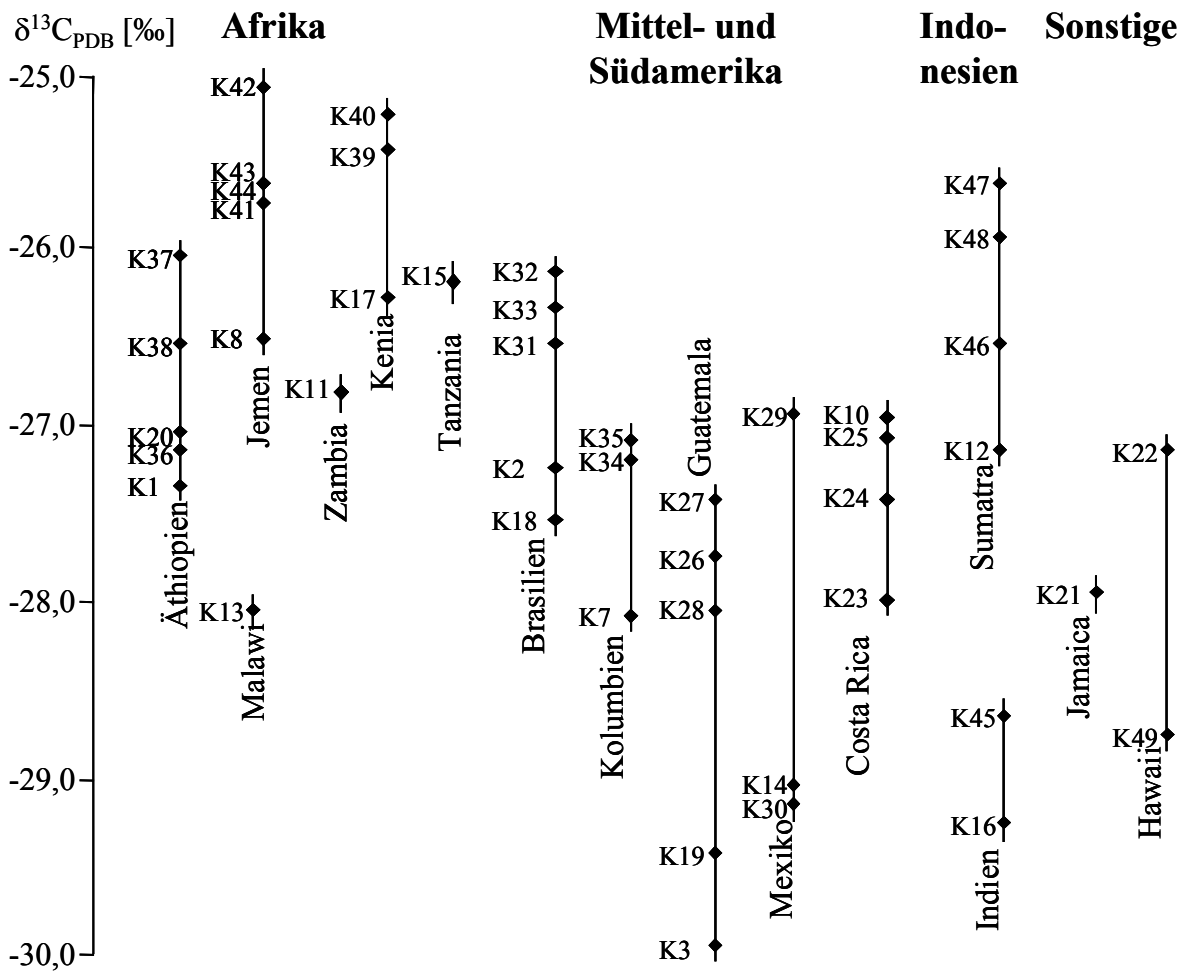


Abb. 62: Zusammenstellung der mittels EA-IRMS-Messung erhaltenen  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte für das aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft extrahierte Coffein.

### 2.3.5.3 Ergebnisse von $\delta^2\text{H}$ -Messungen

Vor den EA-IRMS-Messungen zur Bestimmung der  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnisse der isolierten Coffeinproben wurde ebenfalls die Abhängigkeit des erhaltenen Messwertes von der eingesetzten Menge an Coffein überprüft. Zwischen der pro Messung verwendeten Menge an Coffein und den erhaltenen  $\delta$ -Werten ergab sich die in Abbildung 63 dargestellte Beziehung. Demzufolge wurde ab einer Menge von  $> 3$  mg Coffein ein linear-dynamischer Bereich erhalten, in dem unterschiedliche Mengen an Coffein einen Mittelwert von  $-127 \pm 1$  ‰ ergaben. Für die Messungen der Realproben wurden deshalb pro Messung zwischen 3-4 mg Coffein eingesetzt.

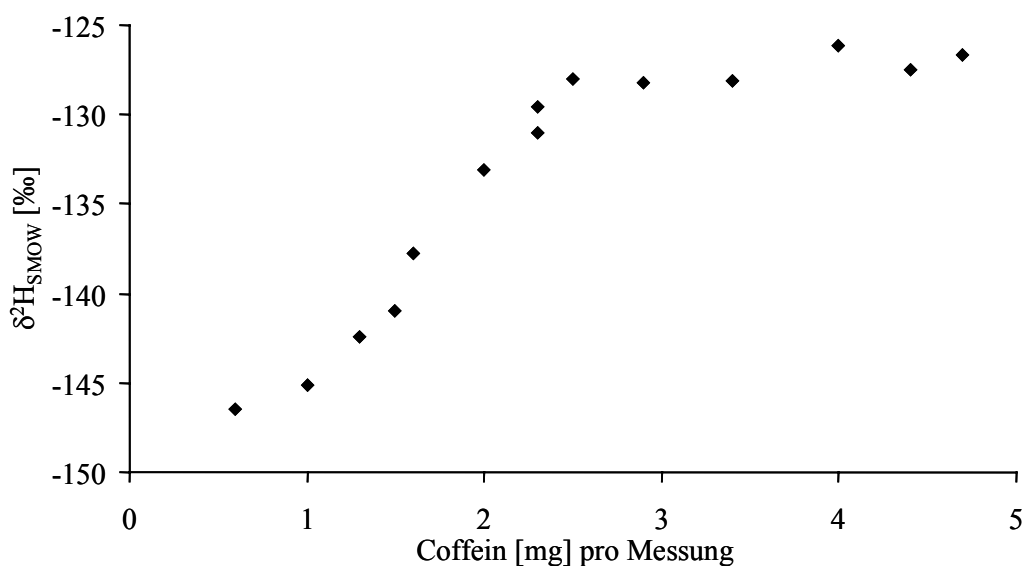


Abb. 63:  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Bestimmung von Coffein mittels EA-IRMS: Abhängigkeit der erhaltenen Messwerte von der eingesetzten Menge an Coffein; der lineare Messbereich wird ab einer Menge von  $> 3$  mg Coffein / Messansatz erreicht.

Zur Bestimmung der  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte der einzelnen Coffeinproben aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft erfolgten jeweils Dreifachmessungen. Die Werte für die Standardabweichungen bewegten sich dabei zwischen 1 und 5 ‰. In Abbildung 64 sind die Ergebnisse der insgesamt 45 verschiedenen Proben aufgetragen, geordnet nach ihrer geographischen Herkunft.

Bei den afrikanischen Kaffeeproben wurden  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte von  $-110 \pm 1$  ‰ (K40, Kenia) bis  $-164 \pm 2$  ‰ (K11, Zambia) erhalten, die amerikanischen Proben (Mittel- und Südamerika) deckten einen Bereich von  $-137 \pm 5$  ‰ (K2, Brasilien) bis  $-199 \pm 2$  ‰ (K35, Kolumbien) ab. Bei den Proben aus Indien und Sumatra reichten die Werte von  $-149 \pm 2$  ‰ (K45, Indien) bis  $-186 \pm 3$  ‰ (K47, Sumatra), die Proben von den Inseln Hawaii und Jamaica ergaben  $-142 \pm 1$  ‰ (K22, Hawaii) bis  $-157 \pm 3$  ‰ (K49, Hawaii).

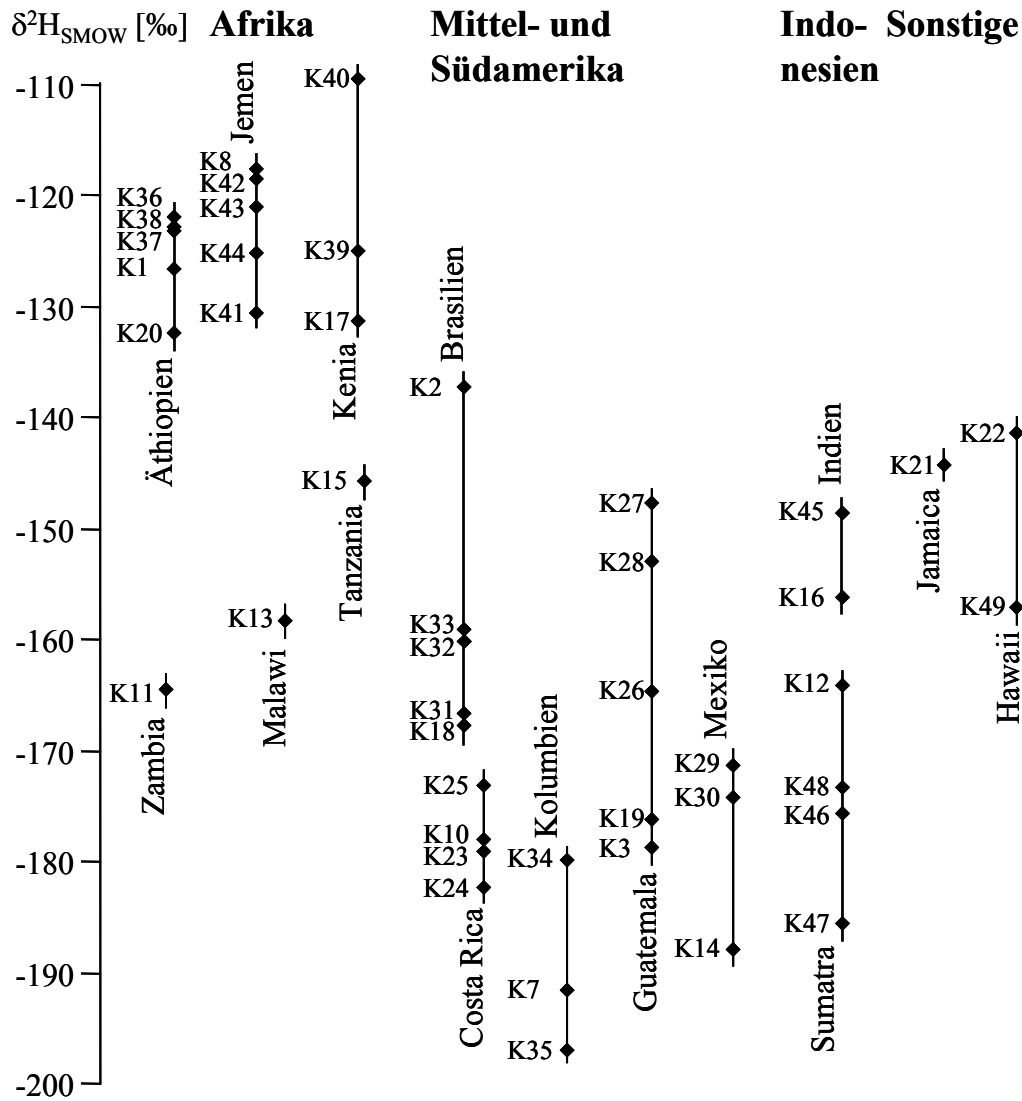


Abb. 64: Zusammenstellung der durch EA-IRMS-Messung erhaltenen  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte für das aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft extrahierte Coffein.

Ähnlich wie bei der Darstellung der  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse ergab sich ein eher fließender Übergang zwischen den Proben aus den verschiedenen Kontinenten, auch wenn sich im Falle der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse Einzelfragen in Bezug auf die Herkunft schon klären ließen, wie z.B. Unterscheidungen zwischen Kolumbien und Kenia oder Costa Rica und Jemen. Die  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte der synthetischen Coffeinproben mit Werten zwischen  $-124 \pm 3$  ‰ (R1) und  $-138 \pm 5$  ‰ (R4) fielen hier in den Bereich der Werte der natürlichen Proben. Zur Unterscheidung zwischen Coffeinproben natürlicher und synthetischer Herkunft hat demnach die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Analyse den Vorzug.

### 2.3.5.4 Ergebnisse von $\delta^{18}\text{O}$ -Messungen

Auch vor den Messungen zur Bestimmung der  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse der isolierten Coffeinproben mittels EA-IRMS wurde die Abhängigkeit des erhaltenen Messwertes von der eingesetzten Menge an Coffein überprüft. Es ist bereits beschrieben, dass mit der hier vorgestellten Technik eine Mindestmenge von 40-60  $\mu\text{mol}$  Sauerstoff pro Messung notwendig ist, um eine optimale Pyrolyse der organischen Substanz zu erzielen (Werner *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2001). In Abhängigkeit von der pro Messung eingesetzten Menge an Coffein ergab sich für die erhaltenen  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte die in Abbildung 65 dargestellte Beziehung. Demnach wurde erst ab einer absoluten Menge von  $> 4$  mg Coffein pro Einzelbestimmung ein linearer Bereich erreicht, in dem unterschiedliche Mengen an Coffein einen Mittelwert von  $12,4 \pm 0,5$  ‰ ergaben. Die Menge von 4 mg Coffein entsprach einer Gesamtmenge von 0,666 mg Sauerstoff ( $\cong 42$   $\mu\text{mol}$ ). Für die Messungen der Coffeinproben wurde deshalb mit einer Menge von 4-5 mg pro Messung gearbeitet.

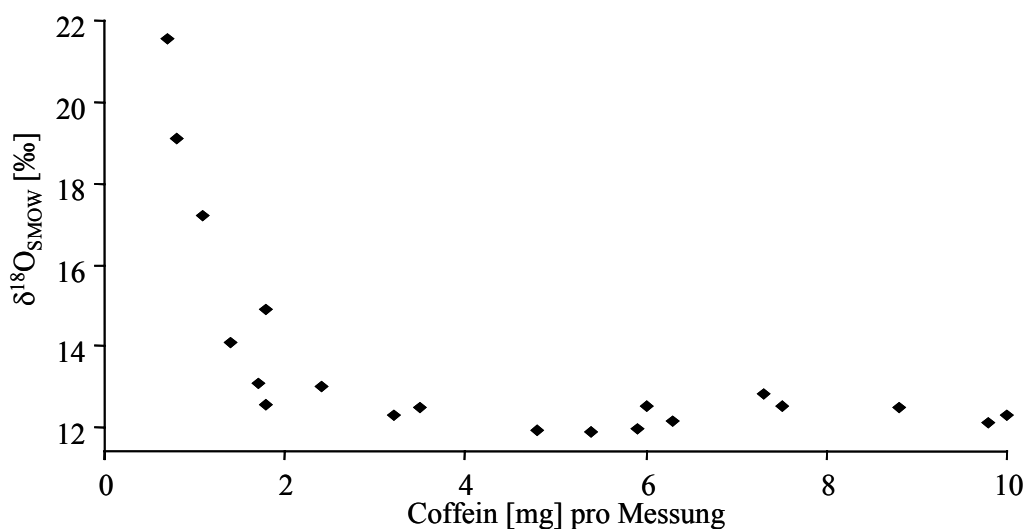


Abb. 65:  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Bestimmung von Coffein mittels EA-IRMS: Abhängigkeit der erhaltenen Messwerte von der eingesetzten Menge an Coffein; der lineare Messbereich ist ab einer Menge von  $> 4$  mg Coffein / Messansatz erreicht.

Auch zur Bestimmung der  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte der einzelnen Coffeinproben Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft erfolgten Dreifachmessungen. Die Werte für die Standardabweichungen bewegten sich dabei zwischen 0,1 und 0,6 ‰. In Abbildung 66 sind die Ergebnisse von insgesamt 45 verschiedenen Proben, gegliedert nach ihrer geographischen Herkunft, aufgetragen.

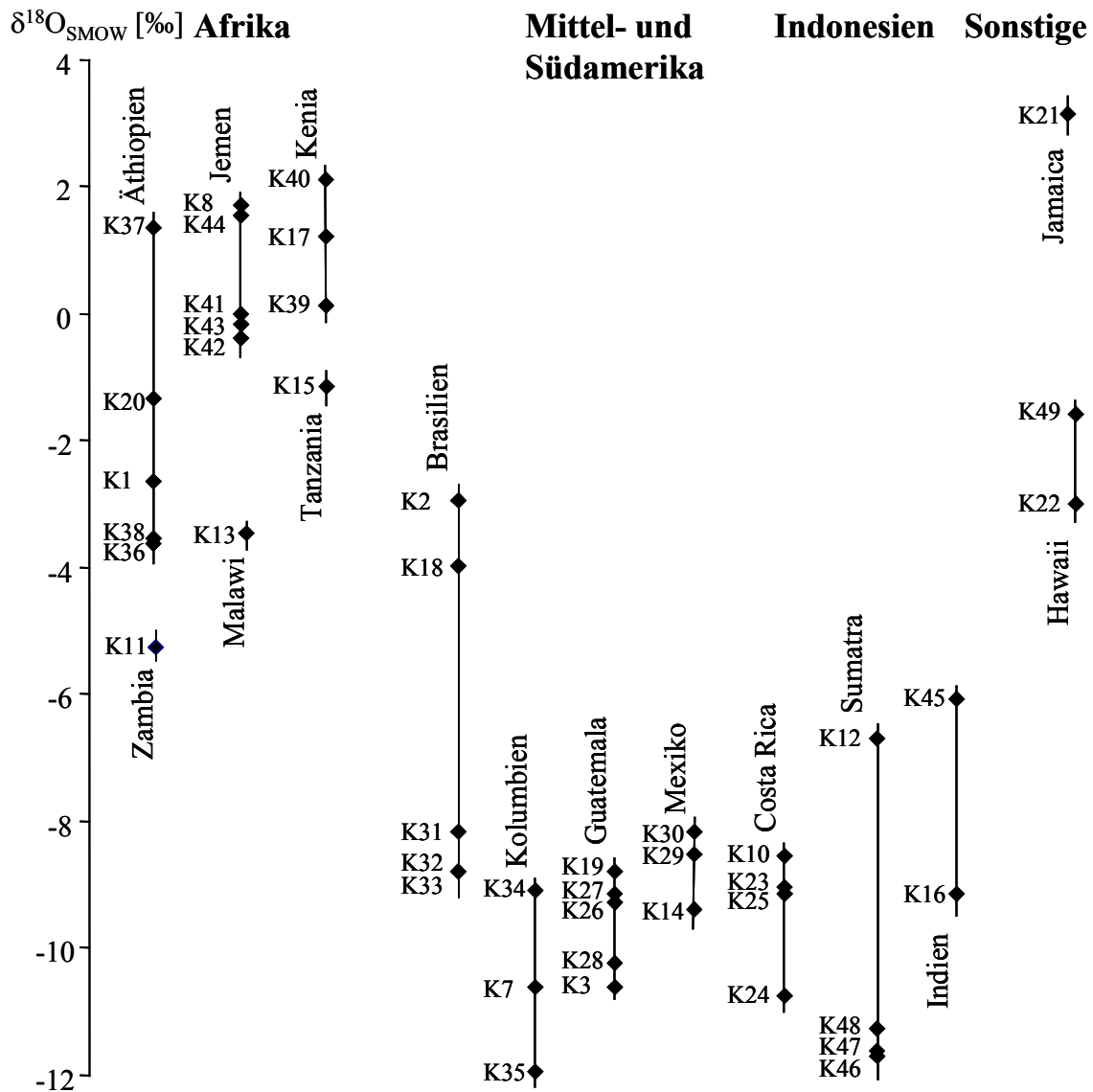


Abb. 66: Zusammenstellung der durch EA-IRMS-Messung erhaltenen  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte für das aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft extrahierte Coffein.

Für die afrikanischen Kaffeeproben wurden  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte von  $-2,0 \pm 0,2$  ‰ (K40, Kenia) bis  $-5,3 \pm 0,1$  ‰ (K11, Zambia) erhalten, die amerikanischen (Mittel- und Südamerika) deckten einen Bereich von  $-2,9 \pm 0,5$  ‰ (K2, Brasilien) bis  $-12,0 \pm 0,3$  ‰ (K35, Kolumbien) ab. Bei den Proben aus Indien und Sumatra reichten die Werte von  $-9,2 \pm 0,1$  ‰ (K45, Indien) bis  $-11,7 \pm 0,5$  ‰ (K46, Sumatra), die Proben aus den Inseln Hawaii und Jamaica ergaben  $-3,1 \pm 0,2$  ‰ (K21, Jamaica), bis  $-3,0 \pm 0,3$  ‰ (K22, Hawaii).



Im Vergleich zu den oben aufgeführten Ergebnissen der  $\delta^{13}\text{C}$ - und der  $\delta^2\text{H}$ -Analytik ließen sich die  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse schon in der eindimensionalen Darstellung zu Aussagen im Hinblick auf geographische Herkunft heranziehen. Die Proben aus Kolumbien, Mexiko, Guatemala und Costa Rica waren eindeutig abgegrenzt von denjenigen aus Kenia, Jemen oder Äthiopien. Auch die Proben aus Indien und Sumatra ergaben negativere  $\delta$ -Werte als die Kaffeebohnen aus Nordafrika. Im Gegensatz zur  $\delta^2\text{H}$ -Analytik war auch mit Hilfe der Sauerstoffwerte eine Abgrenzung zwischen Coffeinproben natürlicher Herkunft ( $-2,0 \pm 0,2 \text{ ‰}$ , K40, Kenia bis  $-12,0 \pm 0,3 \text{ ‰}$ , K35, Kolumbien) und denjenigen synthetischen Ursprungs ( $+13,4 \pm 0,5 \text{ ‰}$ , R1 bis  $+15,1 \pm 0,4 \text{ ‰}$ , R4) zu erzielen.

### **2.3.5.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse der Isotopenverhältnismessungen zur Authentizitätsbeurteilung**

Die bei Isotopenverhältnismessungen von Coffein aus Rohkaffee unterschiedlicher Herkunft erhaltenen Daten wurden zur geographischen Herkunftsbestimmung statistischen Berechnungen unterzogen. Zur Anwendung kamen die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) und die Auswertung mittels sog. „Classification and Regression Trees“ (CART).

Die erhaltenen Daten stellen zusammen mit der Kenntnis der Herkunft der einzelnen Proben Objektgruppen dar, die in einem Datensatz von vorneherein fixiert sind (ursprünglicher Datensatz). Bei der LDA, die unter das Kapitel der überwachten Klassifikation fällt, besteht das primäre Ziel der Auswertung in der optimalen, linearen Trennung der gegebenen Gruppen. Sekundär können dann aber auch neue Objekte unbekannter Herkunft – anhand ihres Musters in denselben Variablen wie im ursprünglichen Datensatz – einer der Gruppen mit möglichst großer Sicherheit zugeordnet werden. Dabei werden in der LDA – analog zur Hauptkomponentenanalyse – optimale Linearkombinationen (Wichtungen) der gemessenen Variablen  $x_1$  bis  $x_p$  ( $p$  = Zahl der gemessenen Variablen für Lern- und Testobjekte) gesucht, mit dem Ziel der optimalen Separation einer gegebenen Menge  $g$  von Objektgruppen ( $g$  = Zahl der Objektgruppen im Lerndatensatz). Die Separation ist umso besser, je homogener die Gruppen sind und je kleiner die Streuung der Objekte innerhalb der Gruppen verglichen mit der Streuung der Gruppenmittelpunkte ist (Henrion und Henrion, 1995). Für die Einordnung von Variablen unbekannter Herkunft spielt die Bestimmung der Fehlerrate durch Kreuzvalidierung eine wichtige Rolle, bei der die vorhandenen Werte nach der Kalibrierung als quasi unbe-

kannte Werte im Sinne einer Klassifizierung neuer, noch nicht eingeordneter Proben in das System eingeteilt werden.

Bei der Auswertung mittels CART handelt es sich – wie der Name schon sagt – um eine sog. „Baumstrukturierte Methode“, bei der die Klassifizierung im Vordergrund steht. CART berücksichtigt die Tatsache, dass verschiedene Abhängigkeiten zwischen Variablen in unterschiedlichen Teilen der Daten bestehen können. Die Trennung der Variablen wird schrittweise durchgeführt und die Wichtung der Variablen wird berechnet. Fehlerraten durch Falscheinordnung von Daten werden durch Resubstitution und Kreuzvalidierung berechnet. Diese Art der Auswertung zeigt sich robust im Hinblick auf Ausreißer. Charakteristisch für dieses Verfahren ist, dass wegen der Teilung der Attribute durch fixe Schwellenwerte nur die Erzeugung von Binärbäumen möglich ist. Die daraus eventuell entstehende mangelnde Übersicht wird durch ein performantes Laufzeitverhalten des Algorithmus kompensiert (Frank, 1989; Alsberg *et al.*, 1997; Krahl *et al.*, 1998).

Für die Messungen der Isotopenverhältnisse von Coffein standen im Rahmen dieser Arbeit 45 im Bezug auf ihre Herkunft verschiedene Kaffeeproben zur Verfügung. Dabei kamen 16 Proben aus Afrika, 20 Proben aus Mittel- und Südamerika, jedoch nur sechs Proben aus Indonesien und insgesamt drei Proben aus Jamaica und Hawaii. Handelspolitisch gesehen werden – wie oben erwähnt - nahezu 90 % des gesamten Kaffees in Mittel- und Südamerika sowie in Afrika angebaut. Für die folgenden statistischen Berechnungen wurden deshalb die  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -, die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ - und die  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Messwerte der Proben aus Mittel- und Südamerika (Klasse 2) und Afrika (Klasse 1) sowie im Vergleich dazu die Daten der synthetischen Coffeinproben (Klasse 3) zugrunde gelegt, so dass insgesamt 3 x 39 Variablen vorhanden waren. Die  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte werden der Spalte C<sub>1</sub>, die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte der Spalte C<sub>2</sub> und die  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte der Spalte C<sub>3</sub> zugeordnet.

In einem ersten Schritt wurde die LDA auf alle ausgewählten 39 Variablen angewendet (Abbildung 67). Die sog. Anpassung zeigt, dass zwei der Punkte aufgrund der Werte ihrer Variablen zu anderen Klassen als zur vorgegebenen zugeordnet wurden. Eine Probe aus der Klasse 1 wurde der Klasse 2 und eine Probe der Klasse 2 wurde der Klasse 1 zugeordnet. Damit ergab sich eine Fehlerrate von 5,13 %. Wichtiger für die Herkunftsbestimmung unbekannter Proben war die Kreuzvalidierung (siehe oben). In diesem Fall - d.h. die Werte aus allen drei Isotopenverhältnismessungen wurden eingesetzt - wurden 4 von 39 (Fehlerrate 10,3 %) der Proben falsch zugeordnet (jeweils zwei der Klasse 1 und 2). Die Proben der Klasse 3 (synthetische Coffeinproben) wurden zu 100 % richtig klassifiziert.

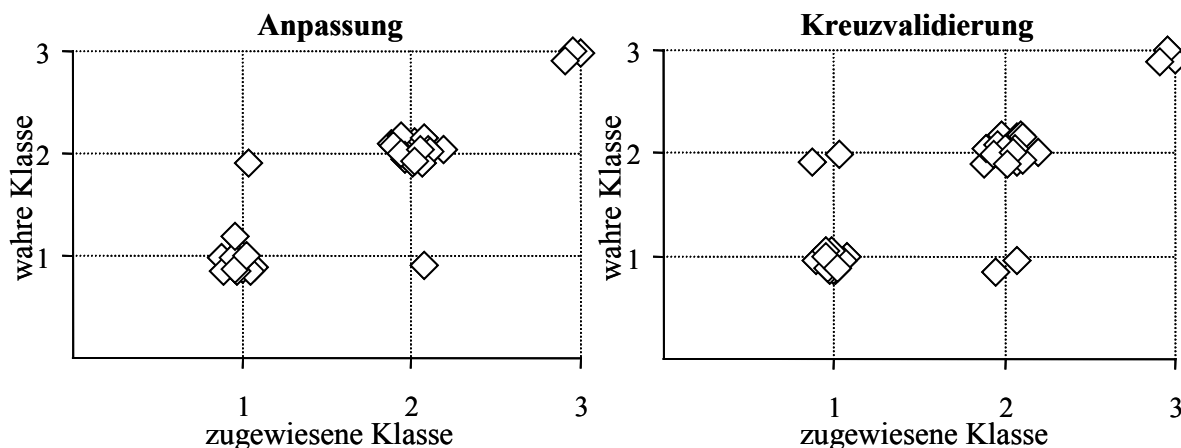


Abb. 67: Ergebnisse der LDA Analyse (Anpassung und Kreuzvalidierung) der aus den Messungen der  $^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -,  $^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ - und  $^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Isotopenverhältnisanalyse zur Verfügung stehenden Daten für die afrikanischen und amerikanischen Kaffeeproben (Afrika Klasse = 1, Mittel- und Südamerika Klasse = 2, synthetische Coffeinreferenzen = Klasse 3).

Im zweiten Schritt wurde der gleiche Satz an Variablen mit Hilfe der CART Analyse ausgewertet. Für die Anpassung ergab sich hierbei eine Fehlerrate von 5,1 %, für die Kreuzvalidierung eine Fehlerrate von 15,4 %. Interessant war das auf dieser Basis mathematisch erstellte Modell eines „Classification Trees“ (Abbildung 68).

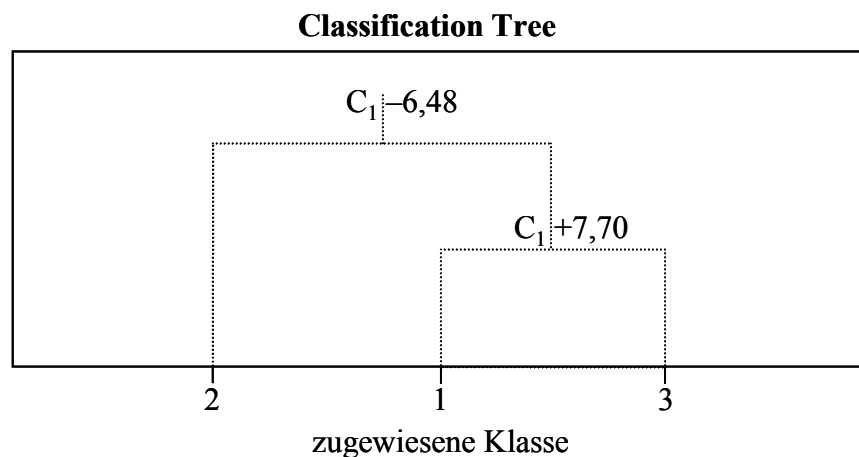


Abb. 68: Classification Tree, basierend auf den der aus den Messungen der  $^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -,  $^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ - und  $^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Isotopenverhältnisanalyse zur Verfügung stehenden Daten für die afrikanischen und amerikanischen Proben; die  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte zeigten die höchste Charakteristik und kamen deswegen im Entscheidungsbaum zum Einsatz (Afrika Klasse = 1, Mittel- und Südamerika Klasse = 2, synthetische Coffeinreferenzen = Klasse 3).

Die Ergebnisse aus dem Classification Tree sind einfach zu interpretieren. Der  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Wert einer Coffeinprobe aus Kaffeebohnen unbekannter Herkunft (Afrika, Amerika oder Synthese) wird – von oben beginnend – in den Baum eingeordnet. Ist der  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Wert kleiner als  $-6,48\text{‰}$ , so wird die Probe der Klasse 2 zugeordnet. Ist der Wert größer als  $-6,48\text{‰}$  aber kleiner als  $+7,70\text{‰}$ , so wird die Probe der Klasse 1 zugeordnet. Ist der Wert größer als  $+7,70\text{‰}$ , wird die Probe der Klasse 3 zugewiesen. Die Fehlerrate ist hierbei identisch mit derjenigen der Kreuzvalidierung der CART Analyse (in diesem Fall  $15,4\%$ ).

Abschließend wurden nur die aus den mittels Pyrolyse ermittelten  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -Werte (Spalte C<sub>1</sub>) und  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte (Spalte C<sub>3</sub>) einer LDA Analyse unterzogen. Abbildung 69 zeigt das Ergebnis der statistischen Berechnung.

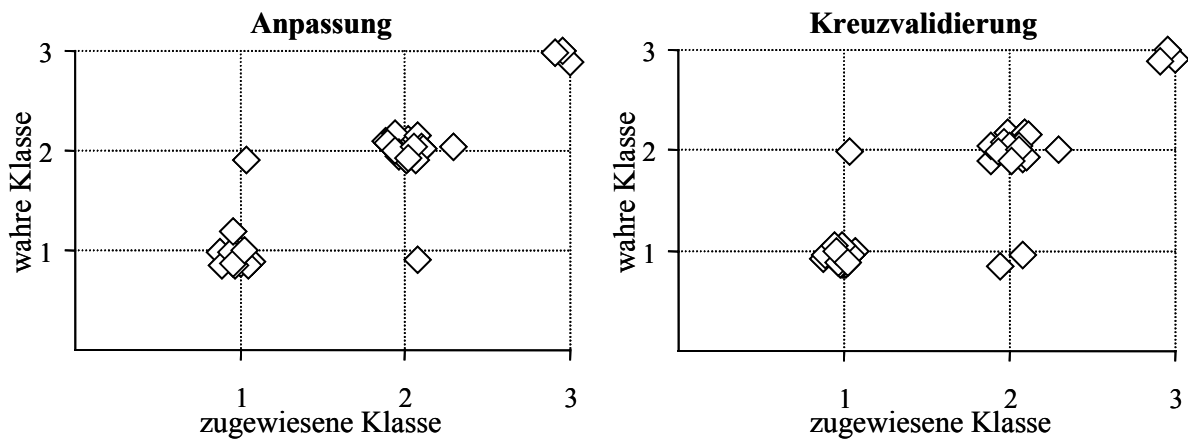


Abb. 69: Ergebnisse der LDA Analyse (Anpassung und Kreuzvalidierung) der aus den Messungen der  $^{18}\text{O}$ -, und der  $^2\text{H}$ -Isotopenverhältnisanalyse von Coffein zur Verfügung stehenden Daten für die afrikanischen und amerikanischen Kaffee-Proben (Afrika Klasse = 1, Mittel- und Südamerika Klasse = 2, synthetische Coffeinreferenzen = Klasse 3).

Auch hier wurde in der Anpassung eine Probe aus der Klasse 1 der Klasse 2 und ein Probe der Klasse 2 der Klasse 1 zugeordnet. Damit ergab sich eine Fehlerrate von  $5,1\%$ . In Falle der Kreuzvalidierung wurden jedoch nur drei von 39 der Proben falsch zugeordnet (jeweils zwei der Klasse 1 und eine der Klasse 2), die Fehlerrate betrug hier somit nur  $7,7\%$ .

In der Zusammenfassung zeigte sich, dass die angewendeten statistischen Methoden auf der Grundlage der mittels EA-Isotopenverhältnismassenspektrometrie ermittelten  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -,  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ - und  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Werte es ermöglichten, mit einer (im vorliegenden Datensatz bestmöglichen) Fehlerrate von  $7,7\%$  in der Kreuzvalidierung eine Kaffeeprobe unbekannter Her-

kunft (es gilt oben erläuterte Einschränkung, d.h. in diesem Falle ist unbekannt eingeschränkt auf Afrika, Amerika und Synthese) ihrem geographischen Ursprung zuzuordnen. Die Ergebnisse sollten sich künftig mit einem noch breiteren Rohdatensatz in ihrer Fehlerrate verbessern und hinsichtlich der Kriterien der Herkunft verfeinern und erweitern lassen.



## C            **Experimentalteil**

### 1            **Material**

#### 1.1        **Chemikalien**

##### *Chemikalien und Lösungsmittel*

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in p.a.-Qualität von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Adrich (Steinheim), Chemos (Regenstauf), Fluka (Deisenhofen), ICN (Eschwege), Lancaster (Mühlheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim) bezogen. Lösungsmittel zur Extraktion und Chromatographie wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert.

##### *Isotopenstandards*

International zertifizierte Isotopenstandards wurden von der Internationalen Atomenergiebehörde IAEA (Wien, Österreich) bezogen: IAEA-CO-9 Bariumcarbonat ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}} = -15,3 \pm 0,2 \text{ ‰}$ ), IAEA-CH-7 Polyethylen ( $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}} = -100,3 \pm 2\text{‰}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -31,8 \pm 0,2 \text{ ‰}$ ). Für Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnismessungen waren zertifiziertes Kohlendioxidgas (Reinheitsgrad 4.8,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -24,9 \text{ ‰}$ ) bzw. Wasserstoffgas (Reinheitsgrad 6.0,  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}} = -200\text{‰}$ ) von Messer Griesheim (Frankfurt) mit gravimetrisch definierten Isotopenverhältnissen verfügbar, die als Primärstandards anerkannt sind.

##### *Verbrauchsmaterial für die EA-Messungen*

Das Verbrauchsmaterial für die EA-Messungen (Nickelwolle, Glaskohlenstoffsplitter, nickelbelegte Kohle, Silberkartuschen, Zinnkartuschen, gepackte CNS-Reaktoren) wurde von der Firma HEKA-Tech (Wegberg) erhalten. Als Wasserfallen dienten chemische Sorbentien (Magnesiumperchlorat), für den Pyrolysemodus zusätzlich Carbosorb (HEKA-Tech, Wegberg).

## 1.2 Untersuchungsmaterial

### 1.2.1 Rucola

Für die Untersuchungen an Rucola wurde ausschließlich *Eruca sativa* Mill. verwendet, der von einem lokalen Großmarkt bezogen wurde. Je nach Tagesangebot war die Provenienz dieses Produktes Italien oder Deutschland.

### 1.2.2 Rohkaffee

Die Übersicht in Tabelle 17 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Rohkaffeesorten inklusive ihrer Herkunft und Gewinnungsart. Für die Studien zur Isolierung von Aromastoffvorläufern kamen die Sorten K1, K2 und K3 zur Analyse.

Tab. 17: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kaffeesorten inklusive ihrer Herkunft und ihres Aufarbeitungsprozesses.

Kürzel	Art <sup>a</sup>	Provenienz <sup>d</sup> (Land / Region)	Marke <sup>d</sup> / Varietät <sup>d</sup>	Verarbeitung <sup>c,d</sup>	Jahrgang <sup>b</sup>
K1	A	Äthiopien / Sidamo	- / -	Washed	1999
K2	A	Brasilien / Santos	- / Santos Green	Dry processed	1999
K3	A	Guatemala / -	- / Especial Arabica	-	1999
K7	A	Kolumbien / -	Supremo / -	-	00/01
K8	A	Jemen / -	- / Yemen Mocha Green	-	00/01
K10	A	CostaRica / Tarrazu	- / -	-	00/01
K11	A	Zambia /	- / Zambia Green	Washed	00/01
K12	A	Sumatra / Mandheling	- / Sumatra	Semi-washed	00/01
K13	A	Malaw / -	- / Mapanga Green	-	00/01
K14	A	Mexiko / -	- / Coetepec Green	-	00/01
K15	A	Tanzania / -	- / Tanzania Green	Wet processed	00/01
K16	A	Indien / -	Monsoonend / Kents	Monsooned	00/01
K17	A	Kenia / Mt Kenya	- / -	Wet processed	00/01
K18	A	Brasilien / Santos	- / Santos Green	Dry processed	00/01
K19	A	Guatemala / Antigua	- / -	Wet processed	00/01
K20	A	Äthiopien / Yargacheffe	- / Traditional Moka	Wet processed	00/01
K21	A	Jamaica / Blue Montain	Estate / Jamaica	Washed	00/01
K22	A	Hawaii / Kona	Purple Mountain Farm / Kona Typica	Wet processed	00/01
K23	A	Costa Rica / Tarrazu	Beneficio / Caturra	Washed	00/01



Kürzel	Art <sup>a</sup>	Provenienz <sup>d</sup> (Land / Region)	Marke <sup>d</sup> / Varietät <sup>d</sup>	Verarbeitung <sup>c,d</sup>	Jahrgang <sup>b</sup>
K24	A	Costa Rica / Tarrazu	La Minita / Caturra	Washed	00/01
K25	A	Costa Rica / Tres Rios	La Magnolia / Caturra	Wet processed	00/01
K26	A	Guatemala / Acatenango	Kikiya Farm / Bourbon Typica	Wet processed	01
K27	A	Guatemala / Antigua	Finca Bella Caromona / Bourbon Typica	Wet processed	01
K28	A	Guatemala / Huehuetenango	Finca El Injerto / Bourbon	Wet processed	01
K29	A	Mexico / Oaxaca	Finca Las chiapas / Typica	Wet processed	01
K30	A	Mexico / Oaxaca	El Olivo Farm / Typica	Wet processed	01
K31	A	Brasilien / Oaxaca	El Olivo Farm / Typica	Dry processed	01
K32	A	Brasilien / Minas Gerais	Blue de Brasil / Bourbon	Dry processed	00/01
K33	A	Brasilien / Cerrado	Monte Carmelo / Bourbon	Dry processed	00
K34	A	Kolumbien / Popayan	- / -	Wet processed	01
K35	A	Kolumbien / Medellin	- / -	Wet processed	01
K36	A	Äthiopien / Ghimbi	Mohanned Ogadessy / Traditional Moka	Dry processed	01
K37	A	Äthiopien / Hararghe	Horse / Longberry	Dry processed	01
K38	A	Äthiopien / Yargacheffe	Horse / Traditional Moka	Wet processed	01
K39	A	Kenia / Mt Kenya	Gaturiri Society / -	Wet processed	01
K40	A	Kenia / Mt Kenya	Tinganga Society / -	Wet processed	01
K41	A	Jemen / Hirazi	Mokha Ismaili / Heirloom Arabica	Dry processed	01
K42	A	Jemen / Mattari	- / Heirloom Arabica	Dry processed	00
K43	A	Jemen / Raimi	Mocca Rimy / Heirloom Arabica	Dry processed	00
K44	A	Jemen / Sana'ni	- / Moka	Dry processed	01
K45	A	Indien / Malabar	Monsooned / Kents	Monsooned	01
K46	A	Sumatra / Mandheling	- / Sumatra	Semi-washed	01
K47	A	Sumatra / Lintong	Lintong / Caturra	Semi-washed	01
K48	A	Sumatra / Gayo	Gayoland Organic / Sumatra	Semi-washed	01
K49	A	Hawaii / Molakai	- / -	Washed	01

<sup>a</sup> bezeichnet die botanische Art (A = Arabica); <sup>b</sup> Zeitpunkt der Ernte (00 = 2000, 01 = 2001); <sup>c</sup> vgl. Kapitel 2.1; <sup>d</sup> keine Angabe vom Lieferanten.

### 1.3 Enzympräparate

Für enzymatische Umsetzungen kamen folgende Mischungen bzw. Einzelaktivitäten zum Einsatz:

#### *Rohapect®-Mischungen*

- Rohapect® VRF, Rohapect® MV, Rohapect® D5L, Rohapect® 10L, Rohapect® B1L, Rohapect® MA, Rohapect® PL, Röhm (Darmstadt).

#### *Einzelaktivitäten*

- $\beta$ -Glucosidase aus süßen Mandeln, Serva (Heidelberg).
- $\beta$ -Galactosidase, Böhringer (Mannheim).
- $\beta$ -Glucuronidase, Böhringer (Mannheim).
- $\alpha$ -Mannosidase, Serva (Heidelberg).

### 1.4 Pufferlösungen

#### *Phosphatpuffer*

Für die Herstellung von 0,1 M Phosphatpuffer werden 0,1 M Lösungen von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bzw.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  am pH-Meter auf den gewünschten pH-Wert gegeneinander eingestellt. Der 0,1 M Phosphatpuffer wurde für folgende pH-Bereiche verwendet: pH 7,0, pH 5,5.

### 1.5 Adsorptionsmaterial

#### *Kieselgel*

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 verwendet (Korngröße 0,032 – 0,063 mm, Merck, Darmstadt); Glassäulen: 1 x 20 cm, 1,5 x 60 cm, 10 x 100 cm.

### *Polystyrolharz*

Amberlite XAD-2 (reinst, Korngröße 0,3 – 1 mm, Sigma) wurde zur Isolierung und Trennung von Glykosidhextrakten und Aromaextrakten eingesetzt. Vor Gebrauch wurde das Adsorptionsmaterial in einer Soxleth-Apparatur mit Diethylether, Pentan, Ethylacetat und Methanol erschöpfend extrahiert. Abschließend wurde das Säulenmaterial mit Wasser für die Probenaufgabe konditioniert.

### *Umkehrphasenmaterial*

Für die Säulenchromatographie an Umkehrphasen wurde LiChorprep® RP-18 Material (Korngröße 40 – 60 µm, Merck, Darmstadt) eingesetzt. Das Material wurde mit Isopropanol und Methanol erschöpfend extrahiert und mit Wasser für die Probenaufgabe konditioniert.

## **1.6 Dünnschichtchromatographie**

Für die Dünnschichtchromatographie kamen DC-Fertigplatten mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> zum Einsatz (analytische DC: Alufolien, Schichtdicke 0,2 mm; präparative DC: Glasplatten, Schichtdicke 2,0 mm; Merck, Darmstadt).

## **1.7 Gase**

Reinstgase für die Gaschromatographie und die Isotopenverhältnismessungen wurden von Linde (Unterschleißheim) und Messer Griessheim (Frankfurt) bezogen. Folgende Reinheitsgrade kamen zum Einsatz: Helium 5.0 bzw. 5.3 als Trägergas, Sauerstoff 4.7 (Reoxidation des CNS Reaktors) bzw. 5.0 (Verbrennungs- und Ozoneinheit des SCD), Stickstoff 5.0 (FID - Make up Gas), Wasserstoff 5.0 (FID - Brenngas, SCD – Brenngas) und gereinigte Luft (FID – Brenngas).

## 2 Geräte

### 2.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)

#### 2.1.1 HRGC mit Massenspektrometrischer Detektion

<u>HRGC 1:</u>	Fisons Instruments GC 8060 (ThermoQuest, Egelsbach)
Autosampler:	Fisons AS 800
Injektor #1:	Split / Splitless – Injektor (Splitverhältnis 1 : 20), Temperatur 220°C bei Säulenummer #1, 250°C bei Säulenummer #2
Injektor #2:	Fisons on-column-Injektor mit Vorsäule (1 m x 0,32 mm I.D.), direkte Probenaufgabe mittels fused-silica Kanüle, Injektionsvolumen 0,1 µl
Trägergas:	Helium 5.0, Fluss 1,5 ml/min (bei 120°C, druckkontrolliert)
Trennsäule #1:	J&W DB-Wax (30 m x 0,25 mm I.D., $d_f$ 0,25 µm); Säulenkopfdruck 90 kPa
Trennsäule #2:	J&W DB-5 (30 m x 0,25 mm I.D., $d_f$ 0,25 µm); Säulenkopfdruck 90 kPa
Temperaturprogramm #1:	50°C (3 min isotherm), 4°C/min, 240°C (10 min isotherm)
Temperaturprogramm #2:	60°C, 5°C/min, 310°C (10 min isotherm)
Tranferkapillare:	0.25 mm I.D., unbelegt deaktiviert, Temperatur 250°C bei Trennsäule #1, 315°C bei Trennsäule #2
<u>MS 1:</u>	Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach)
Ionenquelle:	Elektronenstoßionisation (EI+) mit 70 eV, Temperatur 210°C, Quelldruck 10 nbar, Filamentstrom 4 A, Emissionsstrom 0,2 mA
Detektor:	Photomultiplier 350 V
Massenbereich:	variierend zwischen $m/z$ 35 bis 250 und $m/z$ 35 bis 500
Scandauer:	400 ms (Interscandelay 50 ms)

Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit MassLab 1.3 und Xcalibur 1.2 für MS-Windows (ThermoQuest, Egelsbach).

### 2.1.2 HRGC mit paralleler Detektion durch Massenspektrometrie und Chemilumineszenzdetektion (HRGC-MS/SCD)

HRGC 1: siehe 2.1.1

Tranferkapillare: 0.25 mm I.D., unbelegt desaktiviert, Temperatur wie Ofentemperatur, zum MS 250°C, Splitverhältnis des Eluentenstromes auf die beiden Detektoren 1 : 1

MS 1: siehe 2.1.1

SCD: Sievers Instruments Modell 355B SCD (Boulders, USA)

Verbrennungszelle: Temperatur 800°C, Druck 150-250 Torr

Brenngase: 15 ml/min Sauerstoff, 100 ml/min Wasserstoff

Ozongenerator: Hochspannungsgenerator, 60 ml/min Sauerstoff

Reaktionszelle: Druck 7-10 Torr

Detektor: Photomultiplier

### 2.1.3 Multidimensionale Gaschromatographie – Massenspektrometrie (MDGC-MS)

HRGC 2: Fisons Instruments GC 8160 (ThermoQuest, Egelsbach)

Injektor: Split / Splitless – Injektor (Splitverhältnis 1 : 20), Temperatur 220°C

Trärgas: Helium 5.0, Säulenkopfdruck 165 kPa

Trennsäule #3: J&W DB-Wax (30 m x 0,25 mm I.D., d<sub>f</sub> 0,25 µm)

Temperatur-

programm #3: 60°C 10°C/min, 240°C (10 min isotherm), Linalool

Temperatur-

programm #4: 60°C, 10°C/min, 240°C (10 min isotherm) 2- und 3-Sulfanylhexanol

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 250°C, Stickstoff mit 60 ml/min, Wasserstoff mit 45 ml/min, gereinigte Luft mit 300 ml/min

---

<u>HRGC 3:</u>	Fisons Instruments GC 8130 (ThermoQuest, Egelsbach)
Trennsäule #4:	2,3-Diethyl-6-tert.-butyldimethylsilyl- $\beta$ -cyclodextrin (25 m x 0,15 mm I.D., $d_f$ 0,25 $\mu$ m), (MEGA, Legnano, Italien)Linalool
Trennsäule #5:	2,3-Diacetyl-6-tert.-butyldimethylsilyl- $\beta$ -cyclodextrin in OV 1701 (25 m x 0,25 mm I.D., $d_f$ 0,15 $\mu$ m), (MEGA, Legnano, Italien), 2- und 3-Sulfanylhexanol
Temperaturprogramm #5:	80°C (12 min isotherm), 2°C/min, 200°C (10 min isotherm) Linalool
Temperaturprogramm #6:	60°C, 2°C/min, 200°C (10 min isotherm) 2- und 3-Sulfanylhexanol
<u>Säulenschaltung:</u>	ventillose Multi-Column-Switching-System (MCSS) -Schaltung, elektrisch betrieben, Domdruck 75 kPa, Mitteldruck 85 kPa
Tranferkapillaren:	0.25 mm I.D., unbelegt deaktiviert, Temperatur 200°C
<u>MS 1:</u>	siehe 2.1.1

Die Bestimmung der „Cut“-Zeiten erfolgte anhand von Referenzen mittels des FID an HRGC 2. Die Steuerung, Datenaufnahme und –auswertung wurde mit Chromcard Version 1.21 für MS-Windows (ThermoQuest, Egelsbach) vorgenommen.

## 2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

### 2.2.1 HPLC mit paralleler Detektion durch Ultraviolett-Detektor und Electric Light Scattering Detektor (HPLC-UV/ELSD)

<u>HPLC 1:</u>	Analytische Niederdruckgradientenanlage (Knauer, Berlin)
Degasser:	on-line Degasser, Anschlüsse für vier verschiedene Lösungsmittel
Pumpe:	Maxi-Star K100 mit analytischem Pumpenkopf (Knauer, Berlin)
Mischkammer:	Dynamische Mischkammer
Injektionsventil:	6-Port-Injektionsventil A0258, Probenschleifenvolumen 225 $\mu$ l
Trennsäule #1:	Eurochrom 100 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm I.D., 5 $\mu$ m Partikelgröße) (Knauer, Berlin)

---

UV-Detektor:	UV-Spektralphotometer 254 nm, analytische Messzelle (10 mm)
ELSD:	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor) Modell Sedex 55, Temperatur 40°C, Zerstäubedruck 243 kPa Stickstoff (Sedere, Frankreich)
Fließmittel #1:	Acetonitril
Fließmittel #2:	Wasser
Fließmittel #3:	Wasser (0,05 % Ameisensäure, v/v)
Analyt. Gradient #1:	FM #1 und #3, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min; t = 0 min: 5 % FM #1, t = 30 min: 100 % FM #1, t = 40 min: 100 % FM #1.
Analyt. Gradient #2:	FM #1 und #3, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min; t = 0 min: 5 % FM #1, t = 50 min: 75 % FM #1, t = 55 min: 75 % FM #1.
Analyt. Gradient #3:	FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min, Injektionsvolumen 25 µl; t = 0 min: 10 % FM #1, t = 50 min: 45 % FM #1.
Analyt. Gradient #4:	FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min, Injektionsvolumen 5 µl; t = 0 min: 0 % FM #1, t = 5 min: 10 % FM #1, t = 10 min: 15 % FM #1, t = 15 min: 20 % FM #1, t = 20 min: 25 % FM #1, t = 25 min: 30 % FM #1, t = 30 min bis t = 50 min: 35 % FM #1.
Analyt. Gradient #5:	FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min, Injektionsvolumen 25 µl; t = 0 min: 1 % FM #1, t = 45 min: 70 % FM #1.
Analyt. Gradient #6:	FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min, Injektionsvolumen 25 µl; t = 0 min: 1 % FM #1, t = 45 min: 75 % FM #1.

Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit Eurochrom 2000 Software Basic Edition, Version 1.2 (Knauer, Berlin).

### 2.2.2 HPLC mit Photo-Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD)

<u>HPLC 2:</u>	Analytische Niederdruckgradientenanlage (Knauer, Berlin)
Degasser:	on-line Degasser, Anschlüsse für vier verschiedene Lösungsmittel
Pumpe:	Maxi-Star K100 mit analytischem Pumpenkopf (Knauer, Berlin)
Mischkammer:	Dynamische Mischkammer
Injektionsventil:	6-Port-Injektionsventil A0258, Probenschleifenvolumen 225 µl
Trennsäule #1:	Eurochrom 100 C <sub>18</sub> (250 x 4 mm I.D., 5 µm Partikelgröße) (Knauer, Berlin)

---

DAD-Detektor:	Hewlett-Packard 1040 Photo-Diodenarray-Detektor (Spektralbereich 190-600 nm, Sampling Intervall 640 ms)
Fließmittel #1:	Acetonitril
Fließmittel #2:	Wasser (0,05 % Ameisensäure, v/v)
Fließmittel #3:	Wasser
Analyt. Gradient #7:	FM #1 und #2, Spektralbereich 200-450 nm, Fluss 1 ml/min; t = 0 min: 5 % FM #1, t = 30 min: 100 % FM #1, t = 40 min: 100 % FM #1.
Analyt. Gradient #8:	FM #1 und #3, Spektralbereich 200-450 nm, Fluss 1 ml/min; t = 0 min: 15 % FM #1, t = 20 min: 15 % FM #1.

Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit HP Workstation HP-300 (Agilent Technologies, Waldbronn).

### 2.2.3 Präparative HPLC (HPLC präp.)

<u>HPLC 3:</u>	Präparative HPLC (Knauer, Berlin)
Pumpen:	zweimal HPLC 64 mit präparativem Pumpenkopf
Gradientenformer:	Interface mit HPLC Software Basic
Injektionsventil:	6-Port-Injektionsventil A0258, Probenschleifenvolumen 225 µl
Trennsäule #2:	Eurochrom 100 C <sub>18</sub> (250 x 16 mm I.D., 5 µm Partikelgröße) (Knauer, Berlin)
Trennsäule #3:	SymmetryPrep® C <sub>8</sub> (300 x 19 mm I.D., 7 µm Partikelgröße) (Waters, Eschborn)
Y-Splitter:	Eigenbau-Y-Splitter zur Verteilung des Fließmittelstrom nach dem UV-Detektor auf die Probensammlung (9 Teile) und den ELSD (1 Teil); wird nur bei präparativen Reinigungen zwischengeschaltet.
UV-Detektor:	UV-Spektralphotometer 254 nm, präparative Messzelle (0,4 mm)
ELSD:	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstreuung-Detektor) Modell Sedex 55, Temperatur 40°C, Zerstäubendruck 243 kPa Stickstoff (Sedere, Frankreich)
Fließmittel #1:	Acetonitril
Fließmittel #2:	Wasser
Präp. Gradient #1:	FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 8 ml/min, Trennsäule #3; t = 0 min: 10 % FM #1, t = 50 min: 45 % FM #1.



- Präp. Gradient #2: FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 6,5 ml/min, Trennsäule #2; t = 0 min: 15 % FM #1, t = 55 min: 45 % FM #1.
- Präp. Gradient #3: FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 7,5 ml/min, Trennsäule #2; isokratische Trennung mit 10 % FM #1 und 90 % FM #2.
- Präp. Gradient #4: FM #1 und #2, UV 254 nm, Fluss 6,0 ml/min, Trennsäule #2; t = 0 min: 1 % FM #1, t = 45 min: 20 % FM #1.

Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit Eurochrom 2000 Software Basic Edition, Version 1.2 (Knauer, Berlin).

## 2.2.4 HPLC mit ESI-Interface und Detektion durch Tandemmassenspektrometer (HPLC-ESI-MS/MS)

- HPLC 4: Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre plied Biosystems, Bensheim)
- Pumpe: Doppelkolbenspritzenpumpe Dual Syringe Solvent Delivery
- Injektionsventil: Rheodyne 7125 mit 5 µl Probenschleife
- Trennsäule: Knauer LiChrospher 60 RP select B (100 x 2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße) mit integrierter Vorsäule (Knauer, Berlin)
- Flussrate: 200 µl/min
- Fließmittel #1a: Acetonitril (5 mM Ammoniumacetat)
- Fließmittel #1b: Acetonitril (0,05 % Trifluoressigsäure)
- Fließmittel #2a: Wasser (5 mM Ammoniumacetat)
- Fließmittel #2b: Wasser (0,05 % Trifluoressigsäure)
- Gradient #1: FM #1b und #2b, UV 254 nm, Fluss 1 ml/min, Injektionsvolumen 5 µl; t = 0 min: 5 % FM #1b, t = 30 min: 100 % FM #1b.
- Gradient #2: FM #1a und #2a, Fluss 0,2 ml/min, Injektionsvolumen 5 µl; t = 0 min: 5 % FM #1a, t = 35 min: 50 % FM #1a.
- Interface (ESI): Finnigan Elektrospray Ionisations Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen), fused silica – Kapillare 0,1 µm
- EinlassKapillare: fused silica 0,1 µm
- Einlasstemperatur: 250°C
- Kapillarenspannung: 6,0 kV

---

Sheathgas /	
Auxiliary gas:	Stickstoff 5.0
Sheathgasdruck:	344 kPa
Auxiliary gas:	5 l/min
<u>MS 2:</u>	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)
Quellendruck:	760 Torr
Temperatur:	Raumtemperatur
Scandauer:	1 sec
Interscanzeit:	2 msec
Stoßgas:	Argon
Stoßgasdruck:	260 – 280 mPa
Massenbereich:	$m/z$ 250 – $m/z$ 1250 im Full Scan Modus, SRM Experimente siehe dort
Multiplierspannung:	1400 V im Full Scan Modus, 2000 V im SRM Modus (zur Aufnahme der Tochterionenspektren)
Detektion:	positiv (pos) und negativ (neg)

Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit DEC 500/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring) und ICIS Software Version 8.1 (Finnigan MAT, Bremen).

## 2.3 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)

### *Elementaranalysatoren (EA)*

<u>EA 1 (Oxidation):</u>	EuroEA 3000 Serie (EuroVector, Mailand, Italien)
Reaktor:	Quarzrohr, gefüllt mit Wolframoxid, Quarzwolle, Kupfer, Temperatur 1000°C
Trägergas:	Helium 5.3, 90 kPa (Fluss 80 ml/min)
Sauerstoff:	Sauerstoff 5.0, Ventil geöffnet für 17 s, Druck 15 kPa
Trennsäule:	Porapak QS (2 m x 5 mm I.D.) (EuroVector, Mailand, Italien), Ofentemperatur 95°C isotherm

---

EA 2 (Pyrolyse): EuroEA 3000 Serie (EuroVector, Mailand, Italien)  
Reaktor: Keramikrohr (außen), Glaskohlenstoffrohr (innen), gefüllt mit nickelbelegter Kohle, Glaskohlenstoffsplittern, Nickelwolle, Temperatur 1460°C  
Trägergas: Helium 5.3, 70 kPa (Fluss 70 ml/min)  
Trennsäule: Molekularsieb 5 A (1 m x 5mm I.D.) (Eurovector, Mailand, Italien), Ofentemperatur 95°C isotherm

Detektor: Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD)

Kopplung zum MS: offene Kopplung über einen „open split“

MS 3: Finnigan MAT Delta<sup>plus</sup> XL (ThermoQuest, Egelsbach)  
Transferkapillaren: unbeheizt, (1,5 m x 0,1 mm beim Probeneinlass; 1,5 m x 0,05 mm beim Referenzgaseinlass)  
Ionenquelle: Elektronenstoßionisation (EI+) mit 70 eV, Temperatur ca. 70°C (erzeugt durch 2 Halogenlampen 12 V, 10 W), Kathodenspannung 3 kV  
Detektor: Kollektorsystem (Faraday-Cups)  
Massenbereich: 1 bis 70 Dalton

Die Datenaufnahme und –auswertung erfolgte mit Isodat 6.2 für Real 32 (ThermoQuest, Egelsbach).

## 2.4 Hochauflösende Massenspektrometrie

Gerät: MAT90, Finnigan MAT  
Ionenquelle: EI Modus: 70 eV, 1 mA, 220°C  
Beschleunigungsspannung: 5 kV  
Direkteinlass: Temperatur 270°C  
Massenbereich: gemessene Linie:  $m/z$  147, Referenzpeaks:  $m/z$  143,  $m/z$  169  
Referenzsubstanz: PFK

## 2.5 Multi-Layer Coil Countercurrent Chromatographie (MLCCC)

Gerät:	Ito-MLCCC (P.C. Inc, Vertrieb Deutschland: Zinsser)
Coil:	präparative Ausführung, 75 m ( $\varnothing$ 2,6 mm) PTFE, Volumen ca. 400 ml
Umdrehungszahl:	800 U/min
Elutionsmodus:	tail to head bei Verwendung der spez. schweren Phase als stationäre
Temperatur:	25°C
Pumpe:	Knauer 64 Pumpe mit analytischem Pumpenkopf (Knauer)
Fluss:	3 ml/min
Injektor:	Vier-Wege-Ventil Nr. 5041 (Rheodyne)
Probenschleife:	5 ml
Lösungsmittel:	System aus Methanol – Chloroform – Wasser in der Zusammensetzung 7 - 13 - 8 (v/v)

## 2.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR 1:	Bruker WM 400 (400 MHz)
NMR 2:	Bruker DMX 600 (600 MHz)
Lösungsmittel:	$\text{CDCl}_3$ (Merck, Darmstadt), $\text{CD}_3\text{OD}$ (Aldrich, Steinheim), $\text{DMSO-d}_6$ (Aldrich, Steinheim).

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die chemischen Verschiebungen relativ zum Standard werden in ppm, die Kopplungskonstanten  $J$  in Hertz ausgedrückt.

## 2.7 Circular dichroismus (CD)

Gerät:	JASCO J-600 (Jasco, Groß-Umstadt)
Lösungsmittel:	Acetonitril, n-Hexan; Messung bei 25°C
Schichtdicke:	1 cm

## 2.8 3D-Computerberechnungen

PC: Silicon Graphics, INDY-Workstation, IRIX-Version 5.3

Software: MacroModel Version 5 (Department of Chemistry, Columbia University, New York, NY 10027)

Bei den Computerberechnungen wurden zunächst eine lokale Energie-Minimierung und anschließend ein „Monte-Carlo“-Konformationsanalyse durchgeführt. Für alle Berechnungen wurden Standardparametersätze und ein implementiertes modifiziertes Allinger MM2-Kraftfeld verwendet.

## 2.9 Statistische Berechnungen

PC: Dell OPTIPLEX, Windows 2000 Professional

Software: SCAN for Windows (Minitab Inc., State College, PA)

## 2.10 Sonstige Geräte

### *Photometer*

UV 2101 PC UV-VIS Scanning Spektralphotometer (Shimadzu, Columbia, USA)

### *Schrotmühle*

CONDUX LV15K (Condux, Wolfgang bei Hanau)

### *Rotationsverdampfer*

Büchi (Büchi, Konstanz)

### *Schüttler*

Kottermann 4010 (Kottermann, Hänigsen)

### *pH-Meter*

Labor pH-Meter, (Knick, Berlin), Einstabmesselektrode (Ingold)

### *Gefriertrocknung*

Christ Alpha 1-4, 0,1 mbar (Christ, Osterode)

### *Kühlzentrifugen*

Beckman L8-M Ultrazentrifuge, Rotor T170

## **3 Methoden**

### **3.1 Methoden zur Untersuchung von Rucola**

#### **3.1.1 Untersuchungen über schwefelhaltige Aromastoffe in Rucolablättern**

##### **3.1.1.1 Herstellung von Aromaextrakten aus Rucolablättern**

#### *Herstellung eines Rohextraktes*

500 g frische Rucolablätter (*Eruca sativa*, Provenienz je nach Verfügbarkeit Deutschland oder Italien) werden portionsweise zu je 10-15 Blätter mit einem Schleuderentsafter aufgearbeitet. Der erhaltene Saft (ca. 200 ml) wird unverdünnt in einen Wärmeschrank bei 33-35°C gestellt, um die Autolyse zu unterstützen, so dass insgesamt, einschließlich des Entsaftens eine Einwirkzeit von 1 h resultiert. Es wird der pH-Wert (6,0) bestimmt, der Saft wird direkt zur SDE eingesetzt.

*Extraktion durch adsorptive Flash-Chromatographie an XAD-2 Material*

Für die Festphasenextraktion an XAD-2 wird der Saft (200 ml) für 25 min bei 9000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und über Glaswolle filtriert. Nach Zugabe eines internen Standards (260 µg 2-Heptanon) wird das Filtrat auf die XAD-Säule (50 x 3,5 cm, Korngröße mittel) gegeben. Der Durchlauf, der stetes eine Trübung aufweist, wird ein zweites Mal auf die Säule gegeben, um die Adsorption der Aromastoffe zu gewährleisten. Anschließend wird mit 200-250 ml Wasser eluiert. Im nächsten Schritt werden 400 ml Diethylether auf die Säule gegeben. Zu Beginn eluiert eine Wasserphase (diese wird nochmals mit Diethylether extrahiert), die später von dem nachlaufenden Et<sub>2</sub>O abgetrennt wird. Die Diethyletherfraktion stellt den Aromaextrakt dar. Im letzten Schritt wird mit MeOH eluiert (250 ml). Die vereinigten Diethyletherfraktionen werden über Natriumsulfat getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wird in einen Rundkolben überführt und bei 40°C über Vigreux-Kolonnen abdestilliert, der Rückstand wird mit 250 ml MeOH auf ca. 600-700 µl aufgefüllt.

*Extraktion mittels Simultaner-Destillation-Extraktion (SDE)*

Für diese Extraktionsmethode wird der Saft (200 ml) ohne weitere Filtration oder Zentrifugation unter Zugabe der Standardlösung (260 µg 2-Heptanon absolut) direkt in die modifizierte Likens-Nickerson Apparatur gefüllt und einer dreistündigen SDE (bei 100°C) mit dem Lösungsmittelgemisch n-Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1 unterworfen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bei 40°C über Vigreux-Kolonnen abdestilliert, der Rückstand (250 ml) wird mit MeOH auf ca. 600-700 µl aufgefüllt.

**3.1.1.2 Darstellung der enantiomerenreinen 2- und 3-Sulfanyl-1-hexanole**

Allgemeine Vorschrift zur enantioselektiven Darstellung von (R)- und (S)-3-Sulfanyl-1-hexanol (S)-**6**, (R)-**6** und (R)- und (S)-2-Sulfanyl-1-hexanol (S)-**7**, (R)-**7**: Die Synthesen erfolgten in Anlehnung an die Vorschrift von Pickenhagen und Brönner-Schindler (1984). Die experimentellen Schritte sind für die Enantiomere identisch, so dass nachfolgend nur auf ein Enantiomer Bezug genommen wird.

(2*S*,3*S*)-2,3-Epoxy-1-hexanol (**2**). Wie bei Katsuki und Sharpless (1980) beschrieben, werden die folgenden Komponenten zu 200 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hinzugefügt: 5,7 g (20 mmol) Titanium Tetraisopropoxid, 4,1 g (20 mmol) Diethyl-L-(+)-tartrat [bzw. Diethyl-D-(-)-tartrat für das (2*R*,3*R*)-2,3-epoxy-1-hexanol], 2 g (20 mmol) (E)-2-Hexen-1-ol **1** und 12 ml einer 4M Lösung von tert-Butylhydroperoxid (TBHP) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die gelbliche Lösung wird für drei Tage bei -30°C gelagert. 50 ml einer 10%igen wässrigen Weinsäurelösung werden bei -25°C hinzugefügt, die Mischung wird nach weiteren 30 min bei -25°C auf Raumtemperatur erwärmt. Überschüssiges TBHP wird durch einstündiges Rühren mit 5 ml einer 10%igen wässrigen Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung reduziert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird das zurückbleibende Öl mit 150 ml Et<sub>2</sub>O versetzt und für 90 min bei 0°C mit 60 ml 1N NaOH gerührt. Nach der Trennung der Phasen wird die wässrige Phase einmal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit NaCl Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und durch Destillation an einer 10 cm Vigreux-Kolonne vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung von **2** erfolgt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (0,032 – 0,062 Korngröße) mit einem nichtlinearen Pentan–Et<sub>2</sub>O Gradienten. Ausbeute: 1.06 g.  $[\alpha]_D^{20} = -39.9^\circ$  (c = 0.95), EI-MS: *m/z* (%) = 126 (0.1, M<sup>+</sup>), 101 (Spur), 73 (28), 57 (31), 55 (100), 44 (28), 43 (66), 41 (47).

(2*R*,3*R*)-2,3-Epithio-1-hexanol (**4**). Zu einer stark gerührten, 0°C kalten Dispersion von 675 mg (9 mmol) Thioharnstoff in 8 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15% H<sub>2</sub>O) wird tropfenweise 1,0 g (9 mmol) der Verbindung **2** bei 0°C bis 5°C hinzugefügt. Mit dem Fortgang der Reaktion löst sich der Thioharnstoff auf. Die Lösung wird für weitere 10 min bei 5°C gerührt, dann auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Hydrolyse mit einer 10%igen wässrigen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Lösung werden die entstehenden Phasen getrennt, die wässrige Phase wird dreimal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel (0,032–0,062 Korngröße) gereinigt (nichtlinearer Pentan–Et<sub>2</sub>O Gradient). Ausbeute: 395 mg von **4**.  $[\alpha]_D^{20} = +155.2^\circ$  (c = 1.05), EI-MS: *m/z* (%) = 132 (95, M<sup>+</sup>), 101 (58), 99 (36), 85 (31), 81 (43), 73 (43), 67 (60), 59 (75), 57 (100), 55 (84), 45 (56), 43 (33), 41 (72).

(*R*)-3-Sulfanyl-1-hexanol (**6**). Zu einer gekühlten Lösung (-15°C) von 570 mg (2,8 mmol) Vitride® in 10 ml trockenem THF werden unter Schutzgas langsam 150 mg (1,2 mmol) der Verbindung **4** in 5 ml THF hinzugefügt. Die Mischung wird für eine Stunde bei -15°C gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und in Eiswasser geschüttet. Die wässrige Phase wird



abgetrennt, filtriert und zweimal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und durch Destillation an einer 25 cm Vigreux Kolonne eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel (0,032–0,062 Korngröße) gereinigt (nichtlinearer Pentan-Et<sub>2</sub>O Gradient). Ausbeute: 40 mg von **6**.

*(S)*-2-Sulfanyl-1-hexanol (**7**). Zu einer gekühlten Lösung (0°C) von 151,8 mg (4,0 mmol) LiAlH<sub>4</sub> in 10 ml trockenem Et<sub>2</sub>O werden 150 mg (1,2 mmol) der Verbindung **4** in 5 ml Et<sub>2</sub>O tropfenweise unter Schutzgas hinzugefügt. Die Mischung wird für 4 h bei 0°C gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und in Eiswasser geschüttet. Die wässrige Phase wird abgetrennt, filtriert und zweimal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und durch Destillation an einer 25 cm Vigreux Kolonne eingengt. Der Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel (0,032 – 0,062 Korngröße) gereinigt (nichtlinearer Pentan–Et<sub>2</sub>O Gradient). Ausbeute: 25 mg von **7**.

3-Sulfanyl-1-hexanol (**6**): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,91 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, C-6), 1,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-5), 1,51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-4), 1,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-2), 2,95 (m, 1H, CH, C-3), 3,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-1). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 13,67 (q, C-6), 20,03 (t, C-5), 37,70 (d, C-3), 41,30 (t, C-4), 41,66 (t, C-2), 60,70 (t, C-1). EI-MS: *m/z* (%) = 134 (8,5 M<sup>+</sup>), 100 (43,8), 88 (11,2), 82 (23,8), 67 (34,2), 61 (42,6), 57 (57,9), 55 (100), 47 (20,2), 41 (53,3). (*R*)-**6**: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -7,3° (c = 1,5); Enantiomerenüberschuss (ee) = 89,8. (*S*)-**6**: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 6,4° (c = 2,0); ee = 92,2.

2-Sulfanyl-1-hexanol (**7**): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,91 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, C-6), δ = 1,36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-5), 1,48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-4), 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-3), 2,88 (m, 1H, CH, C-2), 3,46 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11,19, *J*<sub>2</sub> = 7,74, 1H, CH<sub>2a</sub>, C-1), 3,71 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11,13, *J*<sub>2</sub> = 4,56, 1H, CH<sub>2b</sub>, C-1), <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 13,91 (q, C-6), 22,53 (t, C-5), 29,28 (t, C-4), 34,48 (t, C-3), 44,09 (d C-2), 67,91 (t, C-1), EI-MS: *m/z* (%) = *m/z* 134 (12,3 M<sup>+</sup>), 103 (26,4), 87 (10,4), 82 (6,7), 69 (100), 60 (26,4), 47 (16,9), 41 (41,6). (*R*)-**7**: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 42,14° (c = 0,8); Enantiomerenüberschuss (ee) = 78,4. (*S*)-**7**: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -44,1° (c = 0,9); ee = 76,6.

### 3.1.1.3 Darstellung der aktivierten Chromophoren

*Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von 9-Anthroylfluorid (10) und 2-Anthroylfluorid (11) (Zhao et al., 1996).* Zu einer Lösung von 981 mg (7,2 mmol) Cyanurfluorid in 10 ml trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  werden 807 mg (3,6 mmol) Anthracencarboxylsäure (9- bzw. 2-Anthracencarboxylsäure) und 0,3 m, (3,6 mmol) Pyridin zugefügt. Die Reaktionsmischung wird für  $4\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Filtration wird das Filtrat am Rotationsverdampfer konzentriert. Der erhaltene gelbe Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mittels einer Hexan-EtOAc Mischung (2:1 v/v) gereinigt. Ausbeuten: 623 mg von Verbindung **11** und 651 mg von Verbindung **10**.

9-Anthroylfluorid (**10**):  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,57$  (t,  $J = 8,1$  Hz, 2H, Ar),  $7,67$  (t,  $J = 7,72$  Hz, 2H, Ar),  $8,09$  (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H, Ar),  $8,34$  (d,  $J = 9,1$  Hz, 2H, Ar),  $8,69$  (s, 1H, Ar).

2-Anthroylfluorid (**11**):  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,60$  (m, 2H, Ar),  $7,91$  (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H, Ar),  $8,04 - 8,11$  (m, 4H, Ar),  $8,48$  (s, 1H, Ar),  $8,61$  (s, 1H, Ar),  $8,85$  (s, 1H, Ar).

### 3.1.1.4 Darstellung der bichromophoren Derivate

*Allgemeine Vorschrift zur Synthese der bichromophoren Derivate (12-15, 17):* Von jedem bifunktionellen Alkan (3-Sulfanyl-2-hexanol **6**, 2-Sulfanyl-1-hexanol **7** und als Referenz 1,3-Butanediol **8** bzw. 1,2-Propanediol **9**) wird ein Aliquot in 1,5 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 2,5 Äquivalenten 9-Anthroylfluorid und katalytischen Mengen 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt. Die Mischungen werden für 48 h bei Raumtemperatur gerührt, der Reaktionsablauf wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert [Kieselgel, Pentan: $\text{Et}_2\text{O}$  (1:1), UV Detektion]. Die Derivate werden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt [Kieselgel, 2 x Pentan: $\text{Et}_2\text{O}$  (1:1)]. Die fluoreszierenden Banden werden mit  $\text{Et}_2\text{O}$  extrahiert und dieser im Stickstoffstrom entfernt. Für die Darstellung des 1-O-(2-Anthroyl)-3-S-(9-anthroyl)- Derivates (**17**) des Alkanols 3-Sulfanyl-1-hexanol wird der Edukt nur mit 1,1 Äquivalenten 9-Anthroylfluorid versetzt. Nach der Reinigung von 3-S-(9-anthroyl)-3-Sulfanyl-1-hexanol (**16**) wird die Verbindung erneut in 1,5 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 1,5 Äquivalenten 2-Anthroylfluorid und katalytischen Mengen an DMAP versetzt. Die Mischungen werden für 48 h bei Raumtemperatur gerührt, der Reaktionsablauf wird durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert [Kieselgel, Pentan: $\text{Et}_2\text{O}$  (1:1), UV Detek-

tion]. Die Derivate werden durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt [Kieselgel, 2 x Pentan:Et<sub>2</sub>O (1:1)].

*1-O-(9-anthroyl)-3-S-(9-anthroyl)-3-sulfanyl-1-hexanol (12)*, Ausbeute 10 % (5 mg, 9  $\mu$ mol): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,02 (t,  $J$  = 7,32 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,34 (m, 1H, CH<sub>2</sub>a), 2,46 (m, 1H, CH<sub>2</sub>b), 4,27 (m, 1H, CH), 4,87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>a), 4,96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>b), 7,47 – 7,57 (m, 8H, Ar), 8,01 (d,  $J$  = 8,31 Hz, 2H, Ar), 8,03 (d,  $J$  = 8,40 Hz, 2H, Ar), 8,10 (d,  $J$  = 8,93 Hz, 2H, Ar), 8,15 (d,  $J$  = 8,62 Hz, 2H, Ar), 8,51 (s, 1H, Ar), 8,55 (s, 1H, Ar), <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 13,90, 20,07, 34,10, 37,23, 42,78, 60,26, 124,56, 125,08, 125,54, 125,57, 127,00, 127,08, 127,36, 127,79, 128,47, 128,49, 128,50, 129,29, 129,39, 130,94, 130,95, 169,71, 197,05. EI-MS:  $m/z$  (%) = 542 (9,3 M<sup>+</sup>), 338 (2,2), 222 (14,4), 205 (100), 177 (21,2), 151 (2,3), 88 (2), 55 (1), 44 (2). EI-HRMS: berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>S: 542,1916, experimentell ermittelt 542,1908. (R)-**12**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 255 nm (-54,8), 244 nm (+37,1), (S)-**12**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 255 nm (+63,1), 244 nm (-32,4), (S)-**12**: UV (Hexan):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 254 nm (5,33), CD (Hexan):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (+18,7), 245 nm (-22,0).

*1,3-bis-O-(9-anthroyl)-1,3-butanediol (13)*, Ausbeute 14,1 % (9 mg, 18  $\mu$ mol): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,68 (d,  $J$  = 6,32 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,28 – 2,45 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,73 – 4,78 (m, 1H, CH<sub>2</sub>a), 4,87 – 4,93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>b), 5,73 – 5,82 (m, 1H, CH), 7,45 – 7,56 (m, 8H, Ar), 8,00 – 8,20 (m, 8H, Ar), 8,52 (s, 1H, Ar), 8,54 (s, 1H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 20,50, 35,15, 62,33, 69,83, 124,74, 124,74, 124,94, 125,46, 125,48, 125,52, 125,53, 127,01, 127,07, 127,09, 127,63, 128,04, 128,20, 128,28, 128,46, 128,60, 128,67, 129,16, 129,46, 130,95, 131,01, 169,28, 169,65. EI-MS:  $m/z$  (%) = 498 (100, M<sup>+</sup>), 277 (70,8), 249 (9,2), 235 (5), 222 (72,7), 205 (79,3), 194 (5,6), 177 (46,04), 151 (7,13), 88 (1,7), 44 (11,7). EI-HRMS: berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>: 498,1831, experimentell ermittelt 498,1834. (R)-**13**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 255 nm (-76,5), 244 nm (+57,9), (S) **13**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 255 nm (+70,3), 244 nm (-54,7), (S)-**13**: UV (Hexan):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (Hexan):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (+28,5), 245 nm (-37,6).

*1-O-(9-anthroyl)-2-S-(9-anthroyl)-2-sulfanyl-1-hexanol (14)*, Ausbeute 9,0 % (1,5 mg, 2,7  $\mu$ mol): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0,98 (t,  $J$  = 7,10 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,52 (m, 1H, CH), 4,84 (dd,  $J_1$  = 11,25,  $J_2$  = 6,06, 1H,

CH<sub>2</sub>a), 5,15 (dd,  $J_1 = 11,46$   $J_2 = 5,64$ , 1H, CH<sub>2</sub>b), 7,41 – 7,55 (m, 8H, Ar), 7,98 (d,  $J = 8,29$  Hz, 2H, Ar), 8,02 (d,  $J = 8,35$  Hz, 2H, Ar), 8,08 (d,  $J = 8,86$  Hz, 2H, Ar), 8,14 (d,  $J = 8,72$  Hz, 2H, Ar), 8,53 (s, 1H, Ar), 8,57 (s, 1H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 13,97, 22,51, 29,41, 30,98, 48,44, 67,21, 124,45, 124,56, 125,17, 125,51, 125,53, 125,58, 126,84, 126,97, 127,12, 127,28, 127,32, 128,43, 128,55, 128,61, 129,33, 129,58, 130,85, 130,94, 130,99, 169,46, 198,14$ . EI-MS:  $m/z = 542$  (8,3, M<sup>+</sup>), 222 (25,3), 205 (100), 177 (28,1), 151 (4,3), 116 (2,6), 88 (3,1), 55 (2,9), 44 (16,2). EI-HRMS: berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>S: 542,1916, experimentell ermittelt: 542,1913. (*R*)-**14**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 254 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (+151,3), 244 nm (-77,2), (*S*)-**14**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 254 nm (5,33). CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (-136,0), 244 nm (+73,8), (*S*)-**14**: UV (Hexan):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 254 nm (5,33), CD (Hexan):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (-55,5), 244 nm (+25,9).

*1,2-bis-O-(9-anthroyl)-1,2-propanediol (15)*, Ausbeute 6,7 % (5 mg, 10,3  $\mu\text{mol}$ ): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1,71$  (s,  $J = 6,51$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4,62 (dd,  $J_1 = 11,94$  Hz,  $J_2 = 7,6$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>a), 5,13 (dd,  $J_1 = 11,90$  Hz,  $J_2 = 3,2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>b), 6,00 – 6,04 (m, 1H, CH), 6,97 (t,  $J = 6,62$  Hz, 2H, Ar), 7,25 (t,  $J = 7,30$  Hz, 2H, Ar), 7,33 (t,  $J = 6,67$  Hz, 2H, Ar), 7,42 (t,  $J = 7,66$  Hz, 2H, Ar), 7,86 (d,  $J = 8,76$  Hz, 2H, Ar), 7,94 (d,  $J = 8,54$  Hz, 2H, Ar), 8,00 (d,  $J = 8,82$  Hz, 2H, Ar), 8,01 (d,  $J = 8,57$  Hz, 2H, Ar), 8,47 (s, 1H, Ar), 8,56 (s, 1H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 17,00, 67,14, 69,89, 124,76, 125,02, 125,39, 125,54, 126,79, 127,08, 127,22, 127,54, 128,22, 128,37, 128,48, 128,55, 129,22, 129,59, 130,84, 130,93, 169,03, 169,32$ . EI-MS:  $m/z = 484$  (55,94, M<sup>+</sup>), 263 (100,00), 242 (3,33), 222 (15,90), 205 (53,92), 177 (32,98), 151 (4,61), 88 (1,00), 44 (1,00), EI-HRMS: berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>: 484,1675, experimentell ermittelt: 484,1678. - (*R*)-**15**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (+135,5), 243 nm (-71,0), (*S*)-**15**: UV (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 253 nm (5,33), CD (CH<sub>3</sub>CN):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 256 nm (-145,0), 243 nm (+56,9), (*S*)-**15**: UV (Hexan):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 254 nm (5,33), CD (Hexan):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 257 nm (-74,6), 244 nm (+45,1).

*3-S-(9-Anthroyl)-3-sulfanyl-1-hexanol (16)*, Ausbeute 49,8 % (15 mg, 44,3  $\mu\text{mol}$ ). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1,04$  (t,  $J = 7,36$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>, C-6), 1,59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-5), 1,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-4), 1,82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, C-2), 3,93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>a, C-1), 4,03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>b, C-1), 4,23 (m, 1H, CH, C-3), 7,49 (t,  $J = 6,53$  Hz, 2H, Ar), 7,54 (t,  $J = 6,54$  Hz, 2H, Ar), 8,02 (d,  $J = 7,90$  Hz, 2H, Ar), 8,04 (d,  $J = 8,28$  Hz, 2H, Ar), 8,52 (s, 1H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 13,87, 20,48, 37,30, 38,78, 42,70, 60,36, 124,49, 125,55, 126,98, 127,36, 128,60, 129,40, 130,94, 133,77, 199,38.$

*1-O-(2-anthroyl)-3-S-(9-anthroyl)-3-sulfanyl-1-hexanol (17)*, Ausbeute 65,7 % (10,7 mg, 19,7  $\mu\text{mol}$ ):  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,09$  (t,  $J = 7,32$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,61 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,82 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,27 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{a}$ ), 2,47 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{b}$ ), 4,41 (m, 1H, CH), 4,72 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,45 – 7,53 (m, 6H, Ar), 8,00 – 8,10 (m, 8H, Ar), 8,43 (s, 1H, Ar), 8,53 (s, 2H, Ar), 8,92 (s, 1H, Ar),  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13,98, 20,41, 33,97, 37,30, 42,55, 62,70, 124,08, 124,57, 125,41, 125,55, 125,79, 126,17, 126,52, 126,89, 126,94, 127,36, 128,15, 128,47, 128,52, 128,82, 129,23, 130,39, 130,95, 131,96, 132,55, 132,70, 133,12, 133,98, 166,79, 197,03.$  EI-MS:  $m/z$  (%) = 542 (9,5,  $\text{M}^+$ ), 338 (2,5), 222 (14,5), 205 (100), 177 (22,6), 151 (2,5), 88 (2), 55 (1), 44 (1). EI-HRMS: berechnet für  $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{S}$ : 542,1916. experimentell ermittelt: 542,1917, (*R*)-**17**: UV ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 255 nm (5,27), CD ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 259 nm (+98,3), 248 nm (-109,1), (*S*)-**17**: UV ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 255 nm (5,27), CD ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 258 nm (-104,0), 249 nm (+98,8), (*S*)-**17**: UV (Hexan):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 255 nm (5,27), CD (Hexan):  $\lambda_{\text{ext}}$  ( $\Delta \epsilon$ ) = 259 nm (-74,3), 249 nm (+57,8).

### 3.1.1.5 Isolierung von S24 aus dem Aromaextrakt von Rucolablättern

#### *Mikro-LC Chromatographie an Kieselgel ( $^{LC}\text{SiO}_2$ )*

Zur Abtrennung von **S24** aus einem aus 2 kg Rucolablättern gewonnenen Aromaextrakt wird dieser im Vakuum vom Lösungsmittel nahezu befreit. Der Rückstand wird in 2 ml Pentan aufgenommen und auf eine konditionierte Kieselgel-Säule (1 x 5 cm) aufgebracht. Die Elution erfolgt mit einem Pentan– $\text{Et}_2\text{O}$ –Gradienten in Schritten von je 10 % von 100 % Pentan nach 100 %  $\text{Et}_2\text{O}$  sowie anschließender Verwendung von 6 ml MeOH (jeder Schritt zu je 2 ml Lösungsmittelgemisch). Nach der Kontrolle der erhaltenen Fraktionen mittels HRGC-MS (Säule #1, Temperaturprogramm #1) werden Fraktionen gleicher Zusammensetzung vereinigt, Fraktionen 12-14 enthalten die gesuchte Verbindung **S24**.

#### *Präparative Dünnschichtchromatographie ( $^{DC}\text{SiO}_2$ )*

Die Reinigung von **S24** erfolgt durch Dünnschichtchromatographie im präparativen Maßstab. Die Fraktionen 12-14 werden im Stickstoffstrom auf etwa 0,5 ml eingengt und danach voll-

ständig auf einer Linie, die sich 2 cm vom unteren Rand der Kieselgelplatten (Glas Platten - PSC, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm) befindet, aufgetragen. Die Platten werden in mit Diethyletherdampf gesättigte DC-Kammern gestellt, entwickelt und danach getrocknet. Anschließend werden die Banden unter der UV-Lampe detektiert, gekennzeichnet, mit einem Spatel abgeschabt und in ein Präparateglas gefüllt. Aliquote der Extrakte werden mit Et<sub>2</sub>O gelöst und per HRGC-MS untersucht. Die Bande bei R<sub>f</sub> = 0,8 entspricht der Substanz **S24**. Diese wird in 5 ml MeOH (HPLC-Grade) gelöst (Ultraschallbad). Das Kieselgel wird 1 Minute bei 4000 UpM abzentrifugiert, der Überstand wird einer Pasteurpipette abgezogen und aufbewahrt. Der Kieselgelrückstand wird zweimal mit 5 ml Methanol nachgewaschen und zentrifugiert. Die erhaltenen Zentrifugate werden jeweils vereinigt, im Stickstoffstrom eingeeengt und im Exsiccator vollständig getrocknet. Es werden 4,4 mg von **S24** kristallin erhalten.

R<sub>f</sub>-Werte: Verunreinigung 1: 0,90; unbekannte Verbindung **S24**: 0,80; Verunreinigung 2: 0,33; Verunreinigung 3: 0,13; MS: EI (70eV): *m/z* (%) = 147 (5), 115 (6), 114 (100), 87 (41), 85 (24), 72 (44), 60 (46), 55 (50), 47 (53), 41 (14). Hochaufgelöstes MS: gemessen: 147,0178, berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NS<sub>2</sub>: 147, 0176. NMR: <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,83 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 2,96 (t, 2H), 3,58 (t, 2H), 8,33 (s, N-H). <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): δ = 27,5 (C-5), 27,9 (C-6), 35,3 (C-7), 48,0 (C-49); 203,4 (C-2).

### 3.1.1.6 Synthese von [1,3]-Thiazinan-2-thion

Entsprechend der Vorschrift von Gabriel und Lauer (1980) werden zu 13,2 g 3-Brompropylaminhydrobromid unter Eiskühlung 15 ml einer 4N NaOH zugegeben. Die Lösung wird unter Rühren langsam mit 2,4 ml Schwefelkohlenstoff versetzt. Nach wenigen Minuten kristallisiert aus der klaren Lösung ein weißer Feststoff aus. Zur Vervollständigung der Reaktion wird die Lösung weitere 30 min unter Eiskühlung gerührt. Der Niederschlag wird unter Vakuum abgesaugt und mit n-Pentan und Eiswasser gewaschen. Der Rückstand wird im Exsiccator getrocknet.

Ausbeute: 7,8 g [1,3]-Thiazinan-2-thion; Schmelzpunkt: 134°C (Literaturwert 132-133°C); NMR: <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,16 (m, 2H), 2,98 (t, 2H), 3,46 (t, 2H), 8,96 (s, N-H). <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>): δ = 20,4 (C-5), 29,9 (C-6), 44,2 (C-4), 194, 5 (C-2).

### 3.1.2 Untersuchungen über glykosidisch gebundene Flavonoide in Rucolablättern

#### 3.1.2.1 Herstellung eines Rohextraktes

500 g frische Rucolablätter (*Eruca sativa* Mill., Provenienz Italien) werden mit 2 l Extraktionslösung (70 % MeOH-30 % Wasser, v/v; die Suspension zeigte einen pH-Wert von 5,8 bis 6,0, auf eine zusätzliche Enzyminhibierung wird deshalb verzichtet) versetzt, im Mixer zerkleinert und für 24 h auf dem Schüttler extrahiert. Die organische Phase wird nach Filtration an Glaswolle am Rotationsverdampfer eingengt. Der konzentrierte Rückstand wird mittels Lyophilisation vollständig zur Trockne gebracht.

Der pulverisierte Extrakt wird anschließend in Wasser wieder aufgenommen und auf eine vorkonditionierte (Et<sub>2</sub>O, Pentan, EtOAc, MeOH und Wasser) XAD-2-Säule (Dimension 4 x 75 cm) aufgebracht. Nach der Elution von polaren Substanzen (z.B. Zucker, Aminosäuren, Salze) mit 1,5 l Wasser und ggf. noch verbliebenen Resten freier Aromastoffe mit 1,5 l Et<sub>2</sub>O wird der Rohextrakt durch Elution mit 4 l MeOH gewonnen. Dieser Lösungsmittel-extrakt wird wie oben beschrieben im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Es werden 1,02 g Rohextrakt erhalten.

#### 3.1.2.2 Reinigung des Rohextraktes an RP-18 Material

*LC RP-18 Chromatographie (<sup>LC</sup>RP-18<sub>R</sub>) zur Reinigung des mittels Chromatographie an XAD-2 Material gewonnenen Rohextraktes*

Zur Reinigung des bei aus der vorangegangenen Abtrennung an XAD-2 Material erhaltenen Rohextraktes wird dieser (1,02 g) in 5 ml Wasser suspendiert und auf eine konditionierte RP-18 Säule (Dimension 2,5 x 40 cm) aufgebracht. Die Elution erfolgt mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten in Schritten von je 10 % von 100 % Wasser nach 100 % Acetonitril, jeder Schritt zu je 100 ml Lösungsmittelgemisch. Nach der Kontrolle der erhaltenen Fraktionen (insgesamt 126) mittels HPLC-UV-ELSD (Analyt. Gradient #1) werden Fraktionen gleicher Zusammensetzung vereinigt, es ergeben sich somit F 1-13 (18,7 mg), F 14-17 (8,5 mg), F 18-20 (8,0 mg), F 21-27 (33,4 mg), F 28-32 (10,1 mg), F 33-35 (13,3 mg), F 36-40 (14,7 mg), F 41-42 (2,5 mg), F 43-47 (21,6 mg), F 48-52 (25,2 mg), F 53-55 (5,8 mg),

F 56-60 (18,6 mg), F 61-62 (15,4 mg), F 63-66 (11,8 mg), F 67-68 (11,6 mg), F 69-72 (30,1 mg), F 73-79 (9,0 mg), F 80-92 (5,7 mg), F 93-110 (24,6 mg) und F 111-126 (6,0 mg).

### 3.1.2.3 Umsetzung der isolierten Verbindungen Ruc1, Ruc2 und Ruc3 zur Identifizierung des Zuckeranteils mittels HRGC-MS

Ein Aliquot der drei isolierten potentiell glykosilierten Flavonoide **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3** (jeweils 2,5 mg) wird in einem 50 ml Rundkolben mit 10 ml Wasser gelöst, mit 1 ml konzentrierter Salzsäure angesäuert und für 1 h am Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 2N NaOH neutralisiert und mit 2 ml einer 1 %igen wässrigen Lösung von Natriumborbordeuterid versetzt; zur Reduktion wird 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird überschüssiges Reagenz durch Zutropfen 10 %iger Essigsäure zerstört, bis erneute Schaumbildung unterbleibt. Die Lösung wird in eine Abdampfschale überführt und im Trockenschrank bei 75 C zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in essigsauerm MeOH aufgenommen und erneut zur Trockne gebracht, dieser Vorgang wird noch dreimal wiederholt. Abschließend wird die Lösung in Pyridin aufgenommen, in ein Präparateglas überführt und mit 2 ml Acetanhydrid versetzt. Für die Acetylierung wird 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird mit 5 ml Chloroform versetzt, das Pyridin wird nun durch Ausschütteln mit 7 %iger wässriger Kupfersulfatlösung entfernt und die verbleibende organische Phase mit Wasser neutral gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonnen auf ein Volumen von ca. 0,5 ml eingengt. Dieser Extrakt wird mittels HRGC-MS analysiert (Trennsäule #2, Temperaturprogramm #2).

Die Aufarbeitung wird auch mit Referenzverbindungen ( $\beta$ -D-Glucose,  $\beta$ -D-Galactose,  $\beta$ -D-Arabinose,  $\beta$ -D-Fructose) in analoger Art und Weise durchgeführt.

$R_t$  der acetylierten Polyole aus den Flavonoiden: 30,05 min; MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) 290 (4), 289 (5), 260 (6), 259 (5), 218 (17), 217 (16), 188 (20), 187 (25), 171 (25), 157 (30), 146 (33), 145 (37), 128 (50), 116 (62), 115 (100), 103 (62), 86 (43), 85 (50), 73 (23), 51 (15), 47 (8).



### 3.1.2.4 Elementaranalyse der drei glykosilierten Flavonoide Ruc1, Ruc2 und Ruc3

Für die Verbindungen **Ruc1**, **Ruc2** und **Ruc3** wurden folgende Daten ermittelt: **Ruc1** (ermittelt: C, 50,4 %; H, 5,2 %.  $C_{33}H_{40}O_{22}$  berechnet: C, 50,3 %; H, 5,1 %). **Ruc2** (ermittelt: C, 53,3 %; H 5,1 %.  $C_{44}H_{50}O_{26}$  berechnet: C, 53,1 %; H, 5,1 %). **Ruc3** (ermittelt: C, 55,2 %; H, 5,1 %.  $C_{55}H_{60}O_{30}$  berechnet: C, 55,0 %; H, 5,0 %).

## 3.2 Methoden zur Untersuchung von Rohkaffee

### 3.2.1 Gebundene Aromastoffe in Rohkaffee

#### 3.2.1.1 Zweistufige Simultane Destillation-Extraktion (SDE)

Eine Suspension aus 125 g mit einer Schrotmühle grob zerkleinerter grüner Kaffeebohnen (jeweils K1, K2 und K3) in 1000 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) wird der ersten Stufe einer SDE unterworfen [Extraktionsmittel Pentan:  $Et_2O$  (1:1); Temperatur der Wasserphase 105°C, Dauer 2,5 h]. Nach dem Abkühlen wird die wässrige Phase mit Phosphorsäure (conc.) angesäuert (pH 2.5) und erneut mit einer frischen Lösungsmittelvorlage (siehe oben) über 2,5 h einer SDE unterzogen. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, mit Standard versetzt (2-Heptanon, 820 µg absolut pro Extrakt) und an einer Vigreuxkolonne auf 0,5 ml eingengt. Die erhaltenen Extrakte werden mittels HRGC-MS analysiert. Die Identifizierung der detektierten „freien“ und freigesetzten Aromastoffe erfolgt jeweils anhand von Referenzmassenspektren und der zugehörigen linearen Retentionsindices. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die identifizierten Substanzen und den Vergleich mit Referenzindices.

Tab. 19: Identifizierung von Aromastoffen durch HRGC-MS Analyse und anschließende Auswertung über Massenspektren und Retentionsindices aus der Datenbank.

$R_i$ Referenz <sup>a</sup>	$R_i$ Verbindung aus Probe <sup>b</sup>	Verbindung
1431	1427	<i>E</i> -Linalooloxid furanoid
1415	1423	Essigsäure
1441	1441	Furfural
1461	1458	<i>Z</i> -Linalooloxid furanoid

R <sub>i</sub> Referenz <sup>a</sup>	R <sub>i</sub> Verbindung aus Probe <sup>b</sup>	Verbindung
1544	1539	Linalool
1649	1644	3-Methylbutansäure
1697	1691	α-Terpineol
1766	1771	3-Methyl-2-butensäure
1805	1807	β-Damascenon
1842	1837	Geraniol
1882	1890	2-Phenylethanol
2181	2174	4-Vinylguajacol

<sup>a</sup> Linearer Retentionsindex DBWAX aus Arbeitskreis-eigener Massenspektrum-Bibliothek; <sup>b</sup> Linearer Retentionsindex DBWAX, berechnet durch Alkaneichung.

### 3.2.1.2 Herstellung eines Glykosidrohextraktes

5 kg grüne Kaffeebohnen (Provenienz Äthiopien, K1) werden mit der Schrotmühle zerkleinert und zweimal mit je 2,5 l Petrolether (Sdp. 30-50°C) extrahiert, um Fette und unpolare Begleitstoffe zu entfernen. Nach dem Trocknen des entfetteten Kaffeeschrotes wird für 24 h auf dem Schüttler mit 4 l Extraktionslösung (70 % MeOH-30 % Wasser, v/v) extrahiert (aufgrund eines pH-Wertes von 6 bis 6,5, wird auf eine zusätzliche Enzyminhibierung verzichtet). Danach wird das Lösungsmittel durch Filtration abgetrennt und der verbleibende Rückstand erneut für 24 h mit weiteren 3 l frischer Extraktionsmischung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingeeengt; der konzentrierte Rückstand wird lyophilisiert (Ausbeute 151,85 g).

Der pulverisierte Extrakt wird anschließend mit 100 ml dest. Wasser wieder aufgenommen und auf eine vorkonditionierte (Et<sub>2</sub>O, Pentan, EtOAc, MeOH und Wasser) XAD-2-Säule (10 x 100 cm) aufgebracht. Nach der Elution von polaren Substanzen (z.B. Zucker, Aminosäuren, Salze) mit 4 l Wasser und ggf. noch verbliebenen freien Aromastoffen mit 4 l Et<sub>2</sub>O wird der Glykosidrohextrakt durch Elution mit 4 l MeOH gewonnen. Dieser Lösungsmittel-extrakt wird wie oben beschrieben im Vakuum konzentriert und lyophilisiert. Es werden 57,5 g Glykosidrohextrakt erhalten.

### 3.2.1.3 Enzymatische Umsetzungen zur Freisetzung von Aromastoffen

Aliquote (zwischen 1 und 100 mg, abhängig von der jeweiligen Reinigungsstufe) der lyophilisierten Extrakte und Fraktionen werden mit 5 ml Phosphatpuffer (pH = 7,0 nur bei  $\beta$ -Glucosidase, sonst pH = 5,5) und einer adäquaten Menge an Enzymlösung (25-100  $\mu$ l bei den Rohapect-Mischungen, 5 mg bzw. 5  $\mu$ l bei den Einzelaktivitäten) versetzt und verschlossen bei 37°C für 24 h inkubiert. Anschließend werden die Umsetzungen mit Standard versetzt (zwischen 82 und 250  $\mu$ g 2-Heptanon) und dreimal mit je 5 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreuxkolonne auf ca. 400-500  $\mu$ l eingengt. Analog werden Blindwerte ohne Zugabe von Enzym bzw. ohne Zugabe von Extrakten untersucht. Die Extrakte werden per HRGC-MS analysiert, die Auswertung erfolgt anhand der Massenspektren und Vergleich von Retentionszeiten und Retentionsindices. Halbquantitative Auswertung erfolgt anhand des Standards ohne Berücksichtigung von Responsefaktoren.

### 3.2.1.4 Präparative Multilayer Coil Countercurrent Chromatographie (MLCCC)

Für die präparative MLCCC wird das Lösungsmittelsystem  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-Wasser (7-13-8, v/v) verwendet. Die spezifisch leichte Phase dient als mobile Phase. In ihr werden 3 g Glykosidhextrakt für die Injektion gelöst. Es werden Fraktionen zu je 20 ml gesammelt (insgesamt 150), deren Zusammensetzung anschließend off-line mittels HPLC-UV-ELSD (Analyt. Gradient #2) überprüft wird. Anhand dieser Analysen werden Fraktionen gleicher Zusammensetzung vereinigt, im Vakuum konzentriert und lyophilisiert (Vereinigung von Fraktion 1-5, 6, 7-8, 9-11, 12-14, 15-20, 21-35, 36-63, 64-80, 81-100, 101-123 und 124-150). Insgesamt werden so 2,86 g an vorgereinigten, pulverisierten Fraktionen erhalten (inklusive des im Vakuum konzentrierten und lyophilisierten Coil-Inhaltes). Die Lyophilisate werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetztem Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure hin überprüft.

### 3.2.1.5 Präparative diskontinuierliche Fraktionierung an Kieselgel

Für diese Reinigung wird ein Glassäule (10 x 100 cm) bis zur 75 cm-Marke mit trockenem Kieselgel befüllt. Darauf werden weitere 100 g Kieselgel, die mit 30 g des Glykosidextraktes vermengt sind, aufgegeben. Die Elution erfolgt diskontinuierlich mit einem Gradienten aus unpolaren und polaren Lösungsmitteln (Tabelle 20).

Es werden insgesamt 37 Fraktionen zu je 250 ml gesammelt, deren Zusammensetzung anschließend off-line mittels HPLC-UV-ELSD (Analyt. Gradient #2) überprüft wird. Anhand dieser Analysen werden Fraktionen gleicher Zusammensetzung vereinigt, im Vakuum konzentriert und lyophilisiert (Vereinigung siehe Tabelle 20). Insgesamt werden so 27,5 g an vorgereinigten, pulverisierten Fraktionen erhalten. Die Lyophilisate werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetztem Linalool, 3-Methylbutansäure und 3-Methyl-2-butensäure hin überprüft.

Tab. 20: Übersicht über die verwendeten Lösungsmittelmischungen zur Kieselgel-Fraktionierung des Glykosidextraktes.

Fraktionen	Vol. [ml]	Hexan [%]	CH <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> [%]	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> [%]	EtOAc [%]	MeOH [%]
1-3	750	50	50	-	-	-
4-6	750	20	-	70	10	-
7-9	750	-	-	60	40	-
10-13	1000	-	-	40	60	-
14-17	1000	-	-	20	80	-
18-19	500	-	-	-	80	20
20-21	500	-	-	-	80	20
22-23	500	-	-	-	70	30
24-25	500	-	-	-	70	30
26-27	500	-	-	-	50	50
28-29	500	-	-	-	50	50
30-31	500	-	-	-	25	75
32-33	500	-	-	-	25	75
34-35	500	-	-	-	0	100
36-37	500	-	-	-	0	100

### 3.2.1.6 Darstellung von Linalool-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid

#### *Durchführung*

11,0 g Linalool (71,4 mmol) werden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, mit 10,0 g Drierite® und 5,0 g Silberoxid (21,5 mmol) versetzt und unter Lichtausschluss in einem 400 ml Jodzahlkolben mit Tropftrichter unter Schutzgas für 30 min auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend tropft man 8,2 g  $\alpha$ -D-Acetobromglucose (19,9 mmol), die in 50 ml trockenem Dichlormethan gelöst sind, innerhalb von 20 min zu. Nach drei Tagen Rühren im Dunkeln ist die Reaktion beendet, das Gemisch kann gereinigt werden.

#### *Reinigung*

Das Reaktionsgemisch wird über Celite filtriert, sorgfältig gewaschen, eingengt, in 90 ml einer Mischung aus Pentan und Et<sub>2</sub>O (2:1, v/v) aufgenommen und mit 50 ml 50%igem MeOH ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und anschließendem Einengen im Vakuum folgt eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (4 x 80 cm). Die Chromatographie erfolgt isokratisch mit dem Lösungsmittelgemisch Pentan-EtOAc (3:1, v/v). Es werden Fraktionen zu je 25 ml eluiert, die mittels HRGC-MS (Säule #2, Temperaturprogramm #2) untersucht werden. Die Fraktionen, in denen das acetylierte Linalylglucopyranosid in der entsprechenden Reinheit vorliegt, werden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt.

Ausbeute: 11 %; MS (EI) *m/z* (%): 169 (9), 137 (6), 136 (9), 121 (6), 109 (9), 93 (30), 81 (26), 80 (28), 69 (35), 43 (100), 41 (23).

#### *Entacetylierung*

600 mg Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosides werden in 20 ml MeOH gelöst, mit 20 ml 0,02 molarer Natriummethanolatlösung versetzt und über Nacht stehen gelassen. Die Neutralisation der Lösung erfolgt mit Hilfe eines stark sauren Ionenaustauschers, der vor seiner Benutzung mit MeOH gewaschen wird. Nach Abfiltrieren des Ionenaustauschers und Konzentrieren der methanolischen Lösung am Rotationsverdampfer entsteht ein farbloses Öl der  $\beta$ -D-Glucosids. Dieses wird an RP-18 Material (1,5 x 40 cm) mit einem Wasser-MeOH-Gradienten gereinigt, die Fraktionskontrolle erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD (Analyt. Gradient #2).

Ausbeute: 75 %;  $^1\text{H NMR}$ : 1,54 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 1,64 (s, 3H), 4,94 (d, 8,0, 1H), 5,20 (dd, 10,0, 1,0, 1H), 5,34 (dd, 18,0, 1,0, 1H), 6,27 (dd, 18,0, 10,0, 1H).

### 3.2.1.7 Präparative Reinigungsschritte mittels reversed phase Chromatographie

#### 3.2.1.7.1 Gemeinsamer Reinigungsschritt für alle gesuchten Prekursoren

*LC RP-18 Chromatographie ( $^{LC}\text{RP-18}$ ) zur Reinigung von Fraktion 28-29 aus der diskontinuierlichen Kieselgelfraktionierung*

Zur präparativen Reinigung der Fraktion 28-29 aus der vorangegangenen Fraktionierung an Kieselgel wird der Extrakt (3,5 g) in 5 ml Wasser suspendiert und auf eine konditionierte RP-18 Säule (2,5 x 40 cm) aufgebracht. Die Elution erfolgt mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten in Schritten von je 10 % von 100 % Wasser nach 100 % Acetonitril, jeder Schritt zu je 250 ml Lösungsmittelgemisch. Nach der Kontrolle der insgesamt 145 erhaltenen Fraktionen mittels HPLC-UV-ELSD (Analyt. Gradient #2) werden Fraktionen gleicher Zusammensetzung vereinigt. Es ergeben sich somit F 1-25 (501,0 mg), F 26-33 (326,0 mg), F 34-37 (144,0 mg), F 38-42 (121,0 mg), F 43-48 (674,0 mg), F 49-72 (1030,0 mg), F 73-77 (151,0 mg) und F 78-88 (45,0 mg), die restlichen Fraktionen bleiben unberücksichtigt. Die Lyophilisate der vereinigten Fraktionen werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetztem Linalool, 3-Methylbutensäure und 3-Methyl-2-butensäure hin überprüft.

#### 3.2.1.7.2 Reinigung der Linalool-Prekursoren

*HPLC RP-8 Chromatographie ( $^{HPLC}\text{RP-8}$ ) zur Reinigung von Fraktion 73-77 aus der vorhergehenden Reinigung ( $^{LC}\text{RP-18}$ )*

Zur Reinigung der Fraktion 73-77 aus  $^{LC}\text{RP-18}$  wird eine HPLC-Trennung mit einer präparativen RP-8 Säule mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten (Präp. Gradient #1) herangezogen (Detektion mit UV und ELSD). Es werden insgesamt 15 Fraktionen gesammelt: F 1 (0-8 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 2 (8-12 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 3 (12-16 min,

Ausbeute nicht bestimmt), F 4 (16-23 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 5 (23-31 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 6 (31-37 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 7 (37-38 min, 3,1 mg Ausbeute), F 8 (38-39 min, 5,4 mg Ausbeute), F 9 (39-39,5 min, 3,4 mg Ausbeute), F 10 (39,5-40,5 min, 3,5 mg Ausbeute), F 11 (40,5-41,5 min, 7,9 mg Ausbeute), F 12 (41,5-44 min, 13,2 mg Ausbeute), F 13 (44-45,5 min, 11 mg Ausbeute), F 14 (45,5-46,5 min, 3,1 mg Ausbeute), F 15 (46,5-50 min, 2,0 mg Ausbeute). Pro Injektion werden 6 mg des Ausgangs-Lyophilisates on-column gegeben, die Reinigung wird 25mal wiederholt. Die Rechromatographie der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #3). Die Lyophilisate der vereinigten Fraktionen werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetztem Linalool hin überprüft.

*HPLC RP-18 Chromatographie (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub>) zur Reinigung von Fraktion 13 aus der vorhergehenden Reinigung (<sup>HPLC</sup>RP-8)*

Zur Reinigung von Fraktion 13 aus <sup>HPLC</sup>RP-8 wird eine HPLC-Trennung mit einer präparativen RP-18 Säule mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten (Präp. Gradient #2) herangezogen (Detektion mit UV und ELSD). Es werden insgesamt 4 Fraktionen gesammelt: F 1 (42-45,5 min, 4,2 mg Ausbeute), F 2 (45,5-48 min, 1,3 mg Ausbeute), F 3 (48-50 min, 3,2 mg Ausbeute), F 4 (50-54 min, 1,9 mg Ausbeute). Pro Injektion werden 2 mg des Ausgangs-Lyophilisates on-column gegeben, die Reinigung wird 6mal wiederholt. Die Rechromatographie der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #4). Die Lyophilisate der vereinigten Fraktionen werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetztem Linalool hin überprüft.

*HPLC RP-18 Chromatographie (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>II</sub>) zur Reinigung von Fraktion 1 aus der vorhergehenden Reinigung (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub>)*

Zur Reinigung von Fraktion 1 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>I</sub> wird eine HPLC-Trennung an einer analytischen RP-18 Säule mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten (Analyt. Gradient #4) herangezogen (Detektion mit UV und ELSD). Es werden insgesamt 2 Fraktionen gesammelt: F 1 (35,8-36,2 min, 0,9 mg Ausbeute), F 2 (36,25-36,6 min, 0,8 mg Ausbeute). Pro Injektion werden 0,4 mg des Ausgangs-Lyophilisates on-column gegeben, die Reinigung wird 10mal wiederholt. Die Rechromatographie der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD an derselben analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #4). Die vereinigten Fraktio-

nen werden im Vakuum konzentriert und lyophilisiert, auf eine enzymatische Hydrolyse wird an dieser Stelle aufgrund der geringen Menge der isolierten Verbindungen verzichtet.

#### *Acetylierung der aufgereinigten Verbindungen AK1 und AK2*

Jeweils 0,9 mg bzw. 0,8 mg der Verbindungen **AK1** und **AK2** werden (nachdem die Verbindungen nativ mittels NMR vermessen worden sind) in 2 ml Pyridin aufgenommen, in ein Präparateglas überführt und mit 2 ml Acetanhydrid versetzt. Für die Acetylierung wird 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird mit 5 ml Chloroform versetzt, das Pyridin wird nun durch Ausschütteln mit 7 %iger wässriger Kupfersulfatlösung entfernt und die verbleibende organische Phase mit Wasser neutral gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonnen auf ein Volumen von ca. 0,5 ml eingeengt. Dieser Extrakt wird mittels HRGC-MS analysiert (Trennsäule #2, Temperaturprogramm #2).

### **3.2.1.7.3 Reinigung der Prekursoren von 3-Methylbutansäure**

*HPLC RP-18 Chromatographie (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>III</sub>) zur Reinigung von Fraktion 34-37 aus der vorhergehenden Reinigung (<sup>LC</sup>RP-18)*

Zur Reinigung von Fraktion 34-37 aus <sup>LC</sup>RP-18 wird eine HPLC-Trennung an einer präparativen RP-18 Säule isokratisch mit einer Wasser–Acetonitril–Mischung (Präp. Gradient #3) herangezogen (Detektion mit UV und ELSD). Es werden insgesamt 6 Fraktionen gesammelt: F 1 (40,0-41,5 min, 7,0 mg Ausbeute), F 2 (41,5-42,2 min, 1,3 mg Ausbeute), F 3 (42,2-44,0 min, 2,5 mg Ausbeute), F 4 (46,0-49,0 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 5 (54,0-57,0 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 6 (58,0-60,0 min, Ausbeute nicht bestimmt). Pro Injektion werden 7 mg des Ausgangs-Lyophilisates on-column gegeben, die Reinigung wird 21mal wiederholt. Die Rechromatographie der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #4). Die Lyophilisate der vereinigten Fraktionen werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetzter 3-Methylbutansäure hin überprüft.



#### 3.2.1.7.4 Reinigung des Prekursors von 3-Methyl-2-butensäure

*HPLC RP-18 Chromatographie (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>IV</sub>) zur Reinigung von Fraktion 38-42 aus der vorhergehenden Reinigung (<sup>LC</sup>RP-18)*

Zur Reinigung von Fraktion 38-42 aus <sup>LC</sup>RP-18 wird eine HPLC-Trennung an einer präparativen RP-18 Säule mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten (Präp. Gradient #4) herangezogen (Detektion mit UV und ELSD). Es werden insgesamt 7 Fraktionen gesammelt: F 1 (15,0-35,0 min, Ausbeute nicht bestimmt), F 2 (35,0-36,2 min, 4,1 mg Ausbeute), F 3 (36,2-39,2 min, 8,5 mg Ausbeute), F 4 (39,2-41,0 min, 12,4 mg Ausbeute), F 5 (41,0-42,0 min, 22,6 mg Ausbeute), F 6 (42,0-43,0 min, 4,5 mg Ausbeute), F 7 (43,0-50,0 min, 1,0 mg Ausbeute). Pro Injektion werden 8 mg des Ausgangs-Lyophilisates on-column gegeben, die Reinigung wird 15mal wiederholt. Die Rechromatographie der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #5). Die Lyophilisate der vereinigten Fraktionen werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetzter 3-Methyl-2-butensäure hin überprüft.

*HPLC RP-18 Chromatographie (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>V</sub>) zur Reinigung von Fraktion F3 aus der vorhergehenden Reinigung (<sup>HPLC</sup>RP-18<sub>IV</sub>)*

Zur Reinigung von Fraktion F3 aus <sup>HPLC</sup>RP-18<sub>IV</sub> wird eine HPLC-Trennung an einer analytischen RP-18 Säule mit einem Wasser–Acetonitril–Gradienten (Analyt. Gradient #6) herangezogen (Detektion mit UV und ELSD). Es werden insgesamt 3 Fraktionen gesammelt: F 1 (28,2-28,8 min, 1,2 mg Ausbeute), F 2 (28,8-29,2 min, 0,5 mg Ausbeute), F 3 (29,2-32,5 min, 0,7 mg Ausbeute). Pro Injektion werden 0,35 mg des Ausgangs-Lyophilisates on-column gegeben, die Reinigung wird 22mal wiederholt. Die Rechromatographie der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels HPLC-UV-ELSD an einer analytischen RP-18 Säule (Analyt. Gradient #6). Die Lyophilisate der vereinigten Fraktionen werden nach enzymatischer Hydrolyse mittels HRGC-MS der Diethyletherextrakte auf ihren Gehalt an freigesetzter 3-Methyl-2-butensäure hin überprüft.

### 3.2.1.7.5 Elementaranalyse der Aromastoff-Prekursoren **AK1**, **AK2**, **AK3**, **AK4** und **AK5**

Für die Verbindungen **AK1**, **AK2**, **AK3**, **AK4** und **AK5** wurden folgende Daten ermittelt: **AK1** (ermittelt: C, 56,3 %; H, 8,2 %. Für  $C_{21}H_{36}O_{10}$  berechnet: C, 56,2 %; H, 8,1 %). **AK2** (ermittelt: C, 56,0 %; H, 8,2 %. Für  $C_{21}H_{36}O_{10}$  berechnet: C, 56,2 %; H, 8,1 %). **AK3** (ermittelt: C, 48,6 %; H, 7,2 %. Für  $C_{16}H_{28}O_{11}$  berechnet: C, 48,5 %; H, 7,1 %). **AK4** (ermittelt: C, 47,8 %; H, 7,0 %. Für  $C_{17}H_{30}O_{12}$  berechnet: C, 47,9 %; H, 7,1 %). **AK5** (ermittelt: C, 48,8 %; H, 6,9 %. Für  $C_{16}H_{26}O_{11}$  berechnet: C, 48,7 %; H, 6,7 %).

## 3.2.2 Untersuchungen zur Herkunftsanalytik von Rohkaffee

### 3.2.2.1 Isolierung von Coffein aus Rohkaffee

Zur Isolierung des in Rohkaffee enthaltenen Coffeins werden je 150 g Bohnen in der Schrotmühle zerkleinert. Das Schrot wird mit 500 ml Wasser zum Sieden erhitzt und weitere 15 min beim Sieden belassen. Nach dem Abkühlen wird der wässrige Extrakt abfiltriert und mit Chloroform an einer Apparatur zur Flüssig-Flüssig-Extraktion (für schwere Lösungsmittel) 6 h lang extrahiert. Die organische Phase wird über  $Na_2SO_4$  getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingengt. Das Coffein wird durch Zugabe von 20 ml Petrolether (30°C-50°C) ausgefällt, abfiltriert und in wenig Methanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt 3-5 g.

### 3.2.2.2 Kontrolle potentieller Isotopendiskriminierung

Um die unter 3.2.2.1 beschriebene Methodik auf potentielle Isotopendiskriminierung hin zu kontrollieren (bzw. diese auszuschließen) wurden für Aliquote der erworbenen synthetischen Coffein-Referenzen sowohl direkt als auch nach der für die Kaffeebohnen verwendeten Extraktionsmethode (vgl. 3.2.2.1) jeweils die Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff bestimmt.

### 3.2.2.3 Reinheitskontrolle des isolierten Coffeins und Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff

Zur Reinheitskontrolle der isolierten Coffein-Proben wird eine wässrige Lösung mittels HPLC-DAD analysiert (Gradient #8, Säule #1), die Auswertung erfolgt bei 285 nm. Anhand der Peakflächen der integrierten Peaks wird der Reinheitsgrad bestimmt. Zusätzlich werden die isolierten Coffein-Proben mittels  $^1\text{H}$  NMR und Schmelzpunktbestimmung auf Reinheit überprüft. Dabei zeigt sich, dass die zu einem Prozentsatz von 0,05-0,16% enthaltenen Verunreinigungen im wesentlichen aus den beiden Nebenalkaloiden Theobromin und Theophyllin bestehen. Die Isotopenverhältnisse für Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff werden mittels EA-IRMS bestimmt. Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der Reinheitskontrolle sowie die jeweils ermittelten  $\delta$ -Werte zusammen.

Tab. 21: Reinheitsgrad sowie  $\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ -,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -,  $\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ -Werte der aus Rohkaffee isolierten Coffeinproben.

Kürzel	Reinheit HPLC-DAD <sup>a</sup> [%]	Reinheit Schmelz- punkt [°C]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ [‰]
K1	99,9	238,1	$-2,6 \pm 0,3$	$-27,3 \pm 0,1$	$-127 \pm 3$
K2	99,8	238,4	$-2,9 \pm 0,5$	$-27,2 \pm 0,2$	$-137 \pm 5$
K3	99,8	238,1	$-10,6 \pm 0,3$	$-29,9 \pm 0,1$	$-179 \pm 3$
K7	99,7	238,2	$-10,6 \pm 0,3$	$-28,0 \pm 0,2$	$-191 \pm 3$
K8	99,9	237,5	$+1,7 \pm 0,5$	$-26,4 \pm 0,1$	$-118 \pm 1$
K10	99,9	237,9	$-8,6 \pm 0,1$	$-26,9 \pm 0,2$	$-178 \pm 3$
K11	99,9	238,2	$-5,27 \pm 0,1$	$-26,8 \pm 0,1$	$-165 \pm 2$
K12	99,8	237,8	$-6,7 \pm 0,1$	$-27,1 \pm 0,1$	$-164 \pm 1$
K13	99,9	237,5	$-3,5 \pm 0,1$	$-28,0 \pm 0,1$	$-159 \pm 4$
K14	99,9	238,3	$-9,4 \pm 0,2$	$-28,9 \pm 0,1$	$-188 \pm 3$
K15	99,9	238,6	$-1,2 \pm 0,2$	$-26,3 \pm 0,1$	$-146 \pm 5$
K16	99,8	237,4	$-6,1 \pm 0,4$	$-29,2 \pm 0,2$	$-156 \pm 2$
K17	99,8	237,4	$+1,1 \pm 0,2$	$-26,2 \pm 0,1$	$-131 \pm 2$
K18	99,8	237,9	$-4,0 \pm 0,2$	$-27,5 \pm 0,1$	$-168 \pm 2$
K19	99,9	238,4	$-8,8 \pm 0,3$	$-29,4 \pm 0,1$	$-176 \pm 2$
K20	99,9	237,9	$-1,4 \pm 0,6$	$-27,0 \pm 0,2$	$-133 \pm 3$
K21	99,9	237,6	$-3,1 \pm 0,2$	$-27,9 \pm 0,1$	$-144 \pm 2$
K22	99,9	238,1	$-3,0 \pm 0,3$	$-27,1 \pm 0,2$	$-142 \pm 1$
K23	99,9	238,5	$-10,8 \pm 0,5$	$-27,8 \pm 0,2$	$-179 \pm 5$

Kürzel	Reinheit HPLC-DAD <sup>a</sup> [%]	Reinheit Schmelz- punkt [°C]	$\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}}$ [‰]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{SMOW}}$ [‰]
K24	99,9	238,4	-9,0 ± 0,4	-27,3 ± 0,1	-182 ± 4
K25	99,8	238,0	-9,2 ± 0,3	-27,0 ± 0,1	-173 ± 5
K26	99,8	237,5	-9,3 ± 0,5	-27,8 ± 0,2	-164 ± 3
K27	99,8	237,9	-9,2 ± 0,2	-27,5 ± 0,2	-147 ± 4
K28	99,9	237,6	-10,2 ± 0,2	-28,1 ± 0,1	-152 ± 3
K29	99,9	238,1	-7,7 ± 0,2	-26,9 ± 0,1	-171 ± 2
K30	99,9	238,2	-8,5 ± 0,7	-29,0 ± 0,2	-174 ± 4
K31	99,9	238,3	-8,2 ± 0,5	-26,5 ± 0,1	-167 ± 3
K32	99,8	238,0	-8,8 ± 0,2	-26,1 ± 0,1	-160 ± 4
K33	99,8	237,4	-8,8 ± 0,4	-26,3 ± 0,1	-159 ± 4
K34	99,9	237,5	-9,1 ± 0,4	-27,2 ± 0,1	-180 ± 4
K35	99,9	238,0	-12,0 ± 0,3	-27,1 ± 0,2	-197 ± 2
K36	99,9	238,3	-3,6 ± 0,1	-27,1 ± 0,1	-122 ± 2
K37	99,9	238,3	+1,4 ± 0,4	-26,0 ± 0,1	-123 ± 3
K38	99,9	238,4	-3,5 ± 0,3	-26,5 ± 0,1	-122 ± 1
K39	99,9	237,3	+0,1 ± 0,1	-25,4 ± 0,1	-125 ± 4
K40	99,9	237,9	+2,0 ± 0,2	-25,2 ± 0,1	-110 ± 1
K41	98,7	237,6	0 ± 0,4	-25,7 ± 0,1	-131 ± 4
K42	99,8	238,4	-0,4 ± 0,4	-25,1 ± 0,1	-119 ± 1
K43	99,9	238,1	-0,2 ± 0,2	-25,6 ± 0,2	-121 ± 2
K44	99,9	238,0	+1,6 ± 0,4	-25,6 ± 0,2	-125 ± 5
K45	99,8	237,9	-9,2 ± 0,1	-28,6 ± 0,2	-149 ± 2
K46	99,8	237,9	-11,7 ± 0,5	-26,5 ± 0,2	-175 ± 4
K47	99,8	237,6	-11,6 ± 0,1	-25,6 ± 0,1	-185 ± 2
K48	99,9	238,3	-11,3 ± 0,2	-25,9 ± 0,2	-173 ± 4
K49	99,9	238,2	-1,6 ± 0,4	-28,7 ± 0,1	-157 ± 3

<sup>a</sup> Reinheit ermittelt über UV-Spur 276 nm.

## D Zusammenfassung

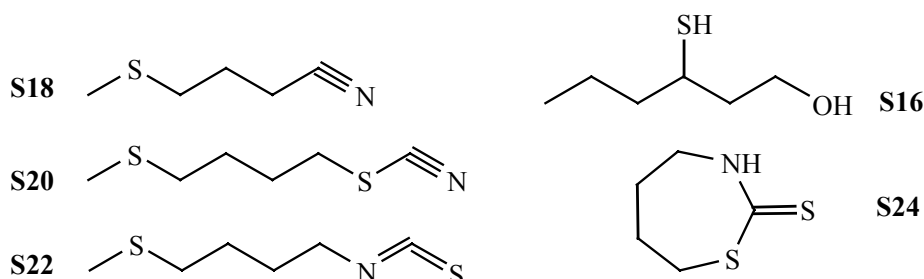
Unsere Lebensmittel haben eine zweifache, auch vom Gesetz vorgegebene Zweckbestimmung, d.h. sie dienen einerseits dem Genuss und andererseits der Ernährung. Aktuelle Forschungsstrategien in der Lebensmittelchemie auf diesen Gebieten lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass im ersten Bereich die Suche nach wirksamen Aromastoffen und deren Vorläufern sowie auch zunehmend Probleme der Herkunftsanalytik im Vordergrund stehen. Auf dem Gebiet der Ernährung spiegeln die Schlagworte „Funktionalität“ und „Bioaktivität“ die derzeitigen Entwicklungen wider.

Für alle Bereiche bilden instrumentell-analytische Techniken die Grundlage für Bewertungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir daher das uns zur Verfügung stehende analytische Potential genutzt, in den oben genannten Gebieten einschlägige Beiträge zu leisten, d.h. die Suche nach wertgebenden Aromastoffen fortzuführen, Zuckerkonjugate zu untersuchen, die sowohl als Aromavorläufer als auch im Hinblick auf Bioaktivitätsstudien von Bedeutung sein können, und schließlich Methoden zur Herkunftsanalytik zu forcieren. Zu diesen Studien sind als attraktive und wirtschaftlich bedeutsame Rohwaren Rucola (*Eruca sativa* Mill.) und Kaffee (*Coffea arabica*) eingesetzt worden.

### Untersuchungen an Rucola

#### *Schwefelhaltige Aromastoffe in Rucolablättern*

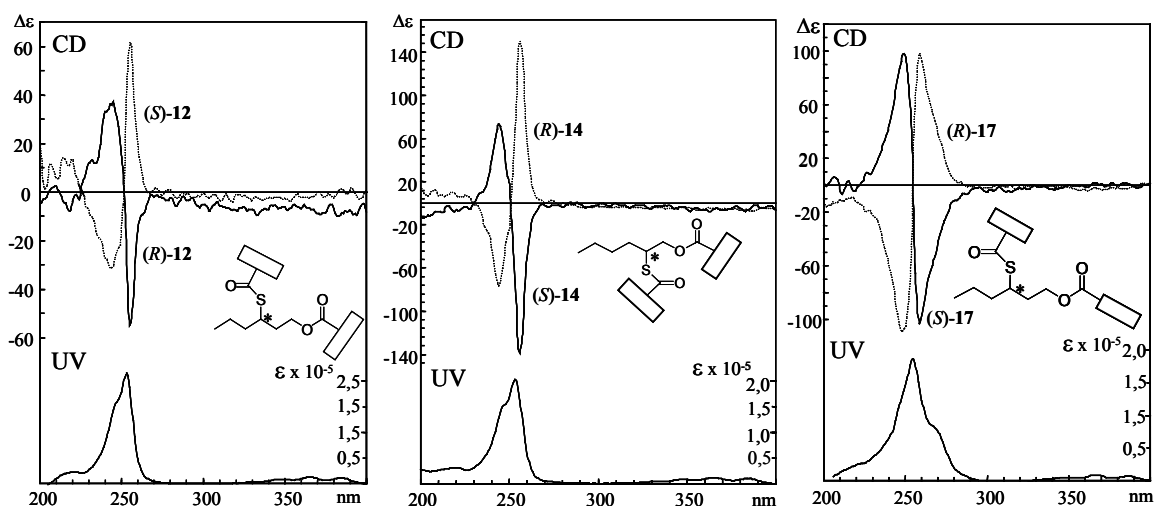
Mit Hilfe der Kopplung aus S-selektiver Detektion und strukturselektiver massenspektrometrischer Analytik sind in Extrakten von Rucolablättern 22 schwefelhaltige Verbindungen strukturell charakterisiert worden.



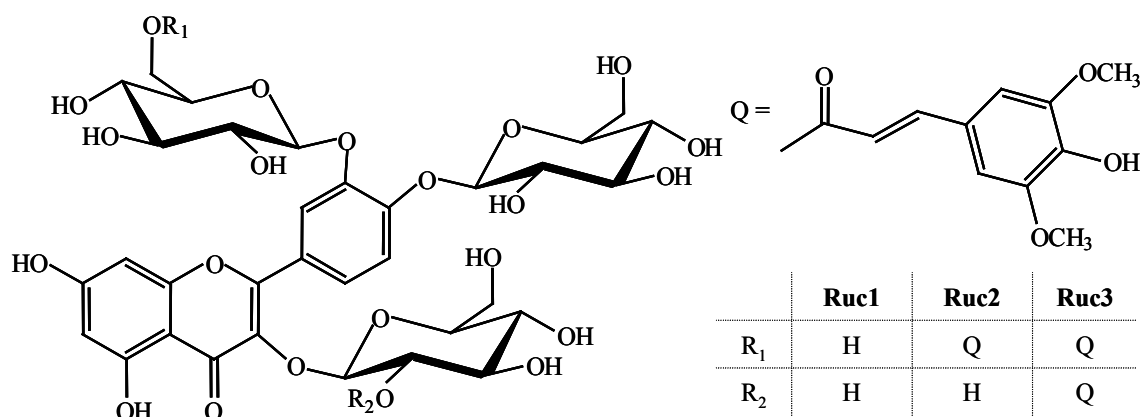
Darunter befanden sich neben Minorkomponenten wie 3-Sulfanyl-1-hexanol (**S16**) Glucosinolatabbauprodukte wie 4-Methylthiobutylnitril (**S18**), 4-Methylthiobutylthiocyanat (**S20**) und 4-Methylthiobutylisothiocyanat (**S22**). Mit [1,3]-Thiazepan-2-thion (**S24**) ist eine bislang nicht bekannte Komponente erstmals beschrieben worden.

### *Exciton Chirality-Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration von 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanolen*

Das Vorkommen von 3-Sulfanyl-1-hexanol (**S16** bzw. **6**), welches im Übrigen anhand von MDGC-MS-Analytik in nahezu racemischer Form (44:56 %, R:S) in Rucola gefunden wurde, forderte dazu heraus, in einer Modellstudie eine allgemeine Methode zur Bestimmung der Absolutkonfiguration azyklischer 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanole mittels der ECCD-Methode zu entwickeln.



Dabei wurden in einer Ein-Schritt-Synthese die funktionellen Gruppen der 2- und 3-Sulfanyl-1-alkanole (in der Studie handelte es sich um enantiomerenreine 2- und 3-Sulfanyl-1-hexanole) jeweils mit dem Chromophor 9-Anthroylfourid derivatisiert (Verbindungen **12** und **14**). Die entsprechenden CD-Splitkurven erlaubten eine eindeutige Zuordnung der Konfiguration. Die entwickelte Mikro-Maßstab-Methode wurde ebenfalls erfolgreich zur Bestimmung der Absolutkonfiguration von in der Studie als zusätzliche Modellverbindungen eingesetzten 1,2- und 1,3-Diolen angewendet. 3-Sulfanyl-1-hexanol wurde abschließend in einer Zwei-Schritt-Synthese mit 9- und 2-Anthroylfourid derivatisiert (Verbindung **17**), auch diese Variation erlaubte eine eindeutige Zuordnung der Absolutkonfiguration.

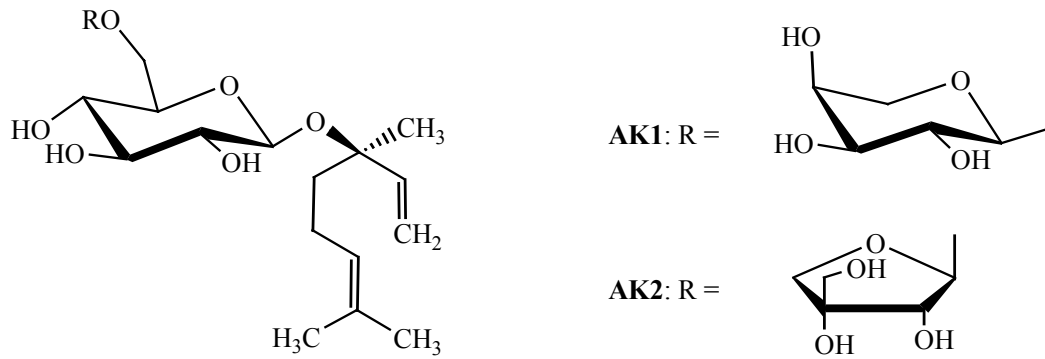
*Flavonoidglykoside*

Mittels präparativer HPLC-Techniken wurden drei neue Flavonoidglykoside aus Rucolablättern isoliert. Deren Charakterisierung erfolgte mittels Tandemmassenspektrometrie sowie ein- und zweidimensionalen NMR-Messungen. Die Verbindungen sind als Quercetin-3,3',4'-tri-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**Ruc1**), Quercetin-3'-(6-sinapoyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3,4'-di-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**Ruc2**) und Quercetin-3-(2-sinapoyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3'-(6-sinapoyl-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (**Ruc3**) identifiziert worden. Diese Quercetin-Derivate zeigten sowohl hinsichtlich der Glucosilierung des Aglykons (an den Positionen 3, 3' und 4') als auch bezüglich der Acylierung (in Position 2 einer Glucoseinheit bei **Ruc3**) ungewöhnliche Strukturen.

**Untersuchungen an Rohkaffee***Zuckerkonjugate als Aromastoffvorläufer*

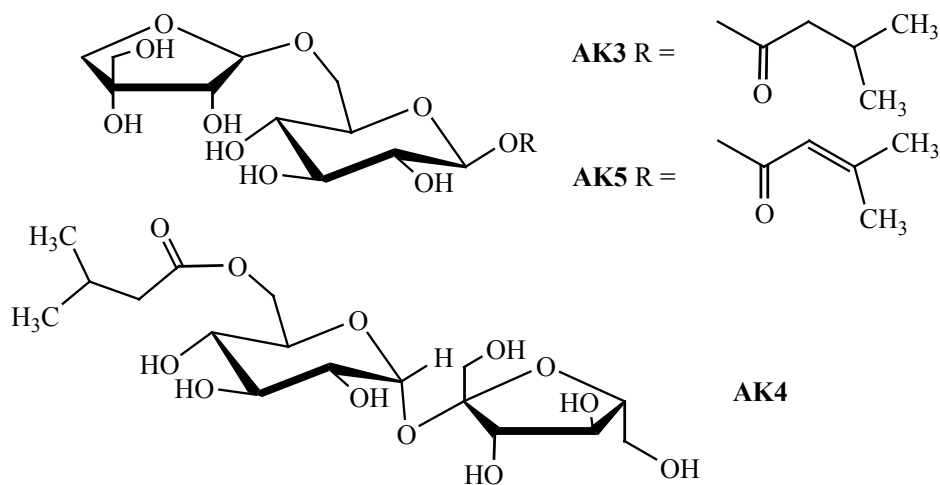
Bei Rohkaffee hat man bislang keine Studien über das Vorkommen von Zuckerkonjugaten als Aromastoffvorläufer durchgeführt. Wir konnten diese Lücke anhand der Strukturaufklärung der nachfolgend aufgeführten Verbindungen schließen.

Durch Kombination verschiedener präparativer Techniken (CCC, LC und HPLC) mit verschiedenen Methoden der Strukturaufklärung (HRGC-MS, HPLC-MS/MS, ein- und zweidimensionale NMR) sind aus Rohkaffee fünf Aromastoffprekursoren isoliert und identifiziert worden.



Für die beiden aus Rohkaffee isolierten Linalyldisaccharide wurden als Strukturen 3(*S*)-Linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\alpha$ -L-arabinofuranosid (**AK1**) und 3(*S*)-Linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-apiofuranosid (**AK2**) ermittelt.

Weiterhin sind erstmals drei neue Aromastoffprecursoren in Form von Zuckerestern, d.h. (3-Methylbutanoyl)-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid (**AK3**), (3-Methylbutanoyl)-6-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranosid (**AK4**) und (3-Methyl-2-butenoyl)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranosid (**AK5**) in Rohkaffee charakterisiert worden.

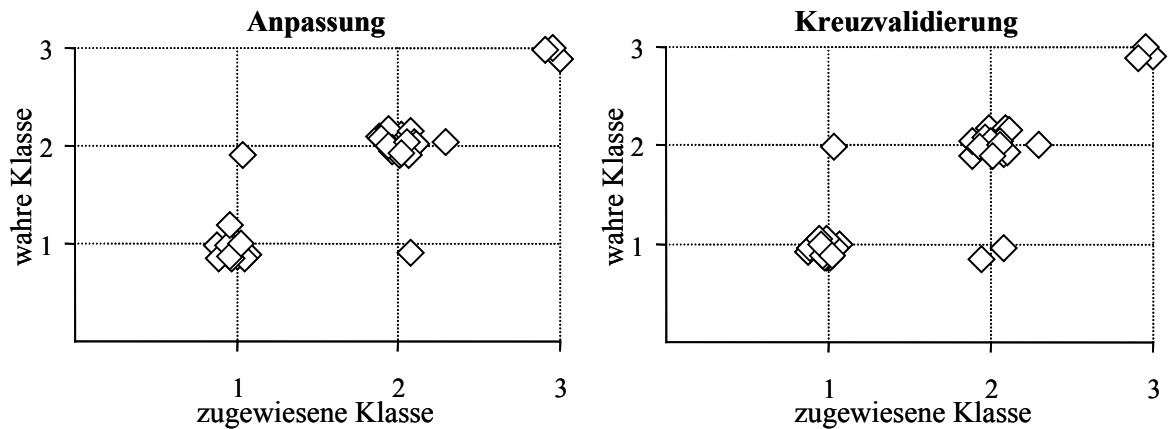


#### *Multielement-Analytik von Coffein zur Herkunftsbestimmung von Rohkaffee*

Die Kenntnis der Herkunft bestimmter Lebensmittel bzw. einzelner Inhaltsstoffe spielt für die Lebensmittelindustrie eine wichtige Rolle. Für die Zuordnung der geographischen Herkunft von Rohkaffee wurden in dieser Arbeit die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ - und  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse von extrahiertem Coffein mittels Elementaranalysator-Isotopenmassenspektrometrie (EA-IRMS) bestimmt.



Zur Bewertung der Multielement-Messwerte wurden diese statistischen Berechnungen unterzogen. Zur Anwendung kamen die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) und die Auswertung mittels sog. „Classification and Regression Trees“ (CART).



In der Anpassung wurde dabei eine Probe aus der Klasse 1 (Provenienz Afrika) der Klasse 2 (Provenienz Amerika) zugeordnet und eine Probe der Klasse 2 der Klasse 1 zugeordnet (Fehlerrate von 5,1 %). Bei Kreuzvalidierung wurden drei der 39 Proben falsch zugeordnet (jeweils zwei der Klasse 1 und eine der Klasse 2), die Fehlerrate betrug hier somit 7,7 %. Die Proben der Klasse 3 (synthetisches Coffein) ließen sich zu 100 % von denjenigen natürlichen Ursprungs unterscheiden.



## E Summary

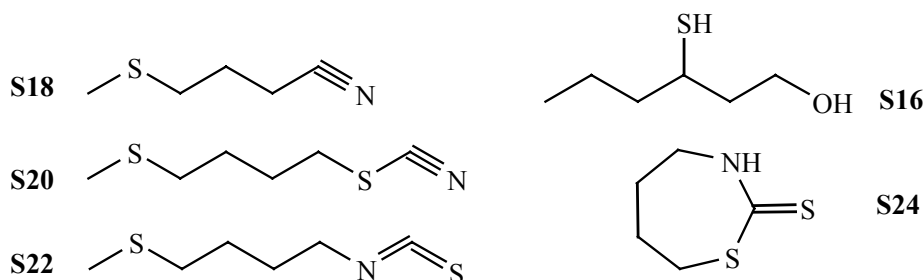
Our foods exhibit two functions defined by legislation, too, i.e. to provide pleasure and nutritive effects. Current research strategies in food chemistry in these areas can be summarized as follows, i.e. that in the first-mentioned area the search for effective aroma substances and their precursors as well as, increasingly, also problems of authenticity assessments predominate. In the area of nutrition, the highlights “functionality” and “bioactivity” reflect the actual research trends.

In all areas instrumental-analytical techniques form the fundament of evaluations. Thus, we used our analytical potential to provide new informations in the above-mentioned areas, i.e. to continue the search for valuable aroma compounds, to study sugar conjugates being important as flavour precursors and for bioactivity studies, as well as, finally, to strengthen methods for authenticity assessment. For these studies rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and green coffee (*Arabica coffea*), both known as attractive industrially important raw materials, were used.

### Studies of rocket salad

#### *Sulphur-containing flavour compounds in rocket salad leaves*

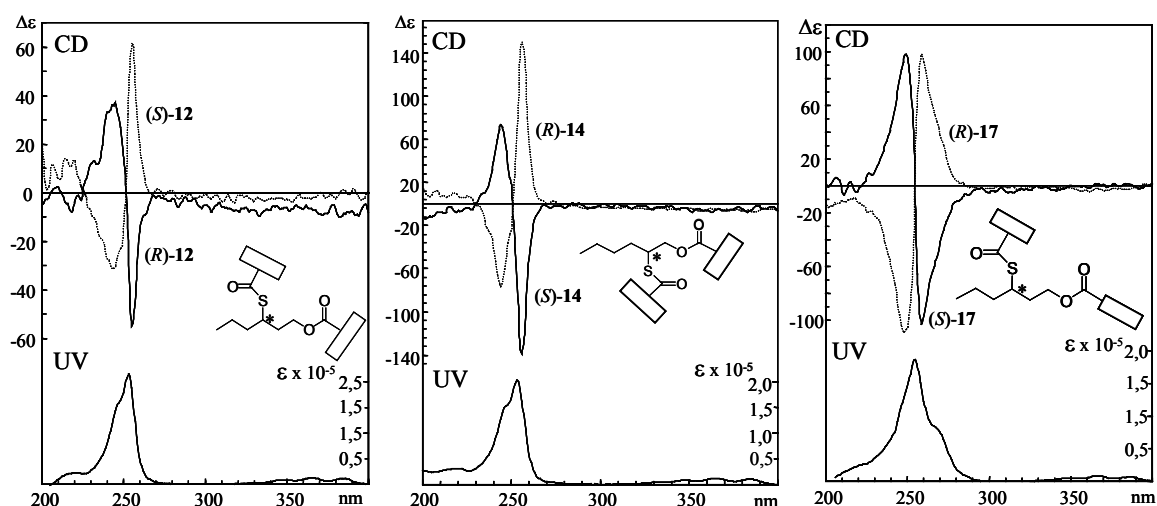
In flavour extracts of rocket salad leaves we characterized 22 sulphur-containing constituents by means of HRGC-MS/SCD analysis. This analytical tool allows parallel detection of compounds eluting from the GC column by mass spectrometry (to get structural information) and by chemiluminescence (to get selectively signals of sulphur-containing substances).



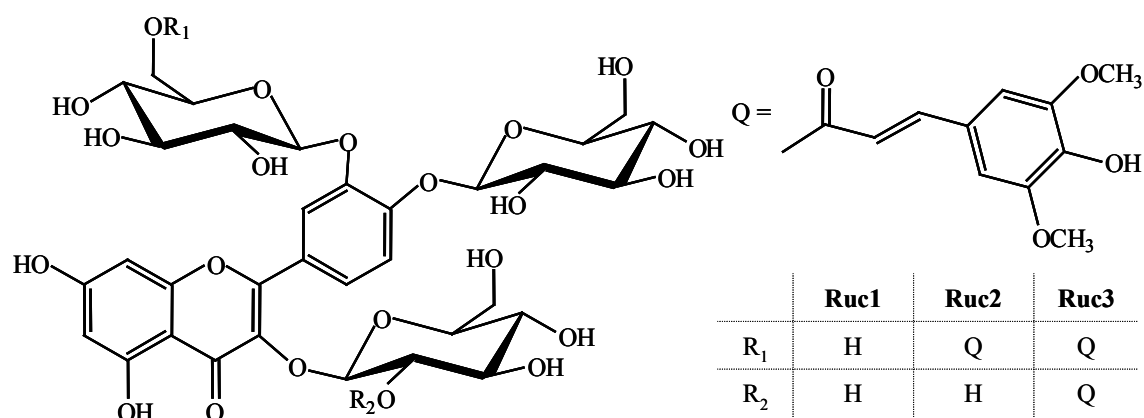
Among the identified constituents we detected minor compounds such as 3-sulfanyl-1-hexanol (**S16**), by-products of myrosinase hydrolysis such as 4-methylthiobutyl nitrile (**S18**), 4-methylthiobutyl thiocyanate (**S20**) and 4-methylthiobutyl isothiocyanate (**S22**) as well as [1,3]-thiazepan-2-thion (**S24**), the latter described for the first time.

*Exciton chirality method for the determination of the absolute configuration of 2- and 3-sulfanyl-1-alkanols*

By means of multidimensional GC-MS (MDGC-MS) the enantiomeric ratio of 3-sulfanyl hexanol was determined as 44 % (*R*) to 56 % (*S*). In addition, a method for the determination of the absolute configuration of chiral 2- and 3-sulfanyl-1-alkanols (and 1,2 diols and 1,3 diols as model compounds) was developed.



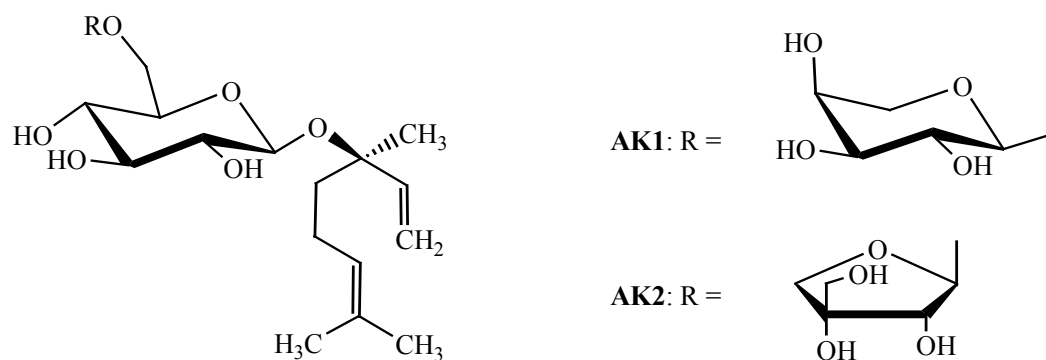
We demonstrated for the first time that the CD exciton chirality method can be extended to acyclic 2- and 3-sulfanyl-1-alkanols. The simple one-step derivatization using the 9-anthroate chromophore provided a general microscale method for the determination of the absolute configuration. Exciton coupling between the two 9-anthroate chromophores led to intense positive split CD curves for the (*R*)-configured 2-sulfanyl-1-alkanols and the (*S*)-configured 3-sulfanyl-1-alkanols (compounds **12** and **14**, respectively) as well as vice versa. The developed method was also useful for the stereochemical assignment of 1,2- and 1,3-diols. Furthermore, the application of the two step-derivatization using two different chromophores for both functional groups (2- and 9-anthroate) also resulted in mirror image split CD curves for both enantiomers (compound **17**), allowing the stereochemical assignment of 3-sulfanyl-1-alkanols.

*Flavonoid glycosides*

Three novel flavonoid glycosides were isolated from leaves of rocket salad by means of preparative techniques. Structural elucidation was performed using LC-MS/MS as well as one and two dimensional NMR experiments. The compounds were identified as quercetin 3',4'-tri-*O*-β-D-glucopyranoside (**Ruc1**), quercetin 3'-(6-sinapoyl-*O*-β-D-glucopyranosyl)-3,4'-di-*O*-β-D-glucopyranoside (**Ruc2**) and quercetin 3-(2-sinapoyl-*O*-β-D-glucopyranosyl)-3'-(6-sinapoyl-*O*-β-D-glucopyranosyl)-4'-*O*-β-D-glucopyranoside (**Ruc3**). These quercetin derivatives exhibited unusual structures as to the glycosylation of the aglycones (at positions 3, 3' and 4') and the type of acylation (at position 2 of a glucose moiety in **Ruc3**).

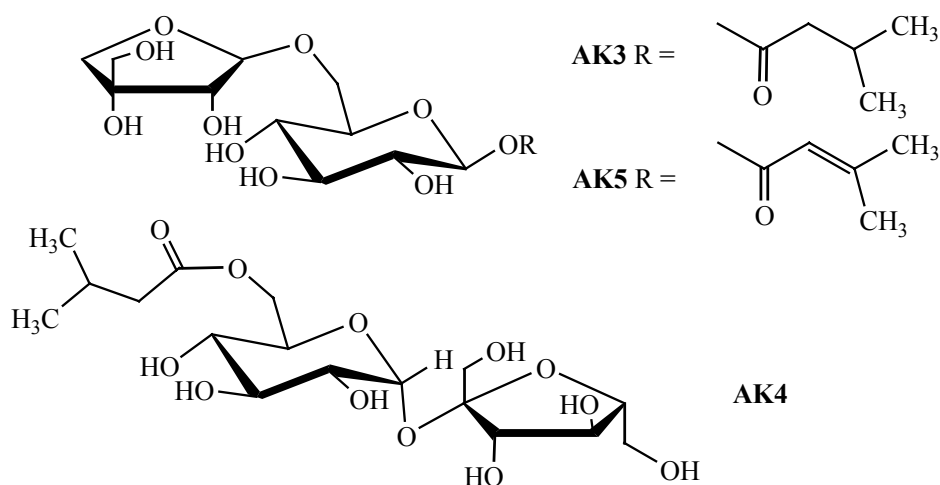
**Studies of green coffee beans***Sugar conjugates as flavour precursors*

Studies of bound flavour precursors in green coffee beans (*Coffea arabica*) have not been carried out to date. We were able to fill out this gap by means of structural analysis of the following compounds. By combination of different preparative analytical steps (CCC, LC and HPLC) with several analytical methods of structural elucidation (HRGC-MS, HPLC-MS/MS, one and two dimensional NMR experiments) five flavour precursors were isolated and identified in green coffee beans.



The two isolated linalool disaccharides were identified as 3(*S*)-linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (**AK1**) and 3(*S*)-linalyl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-6)- $\beta$ -D-apiofuranoside (**AK2**).

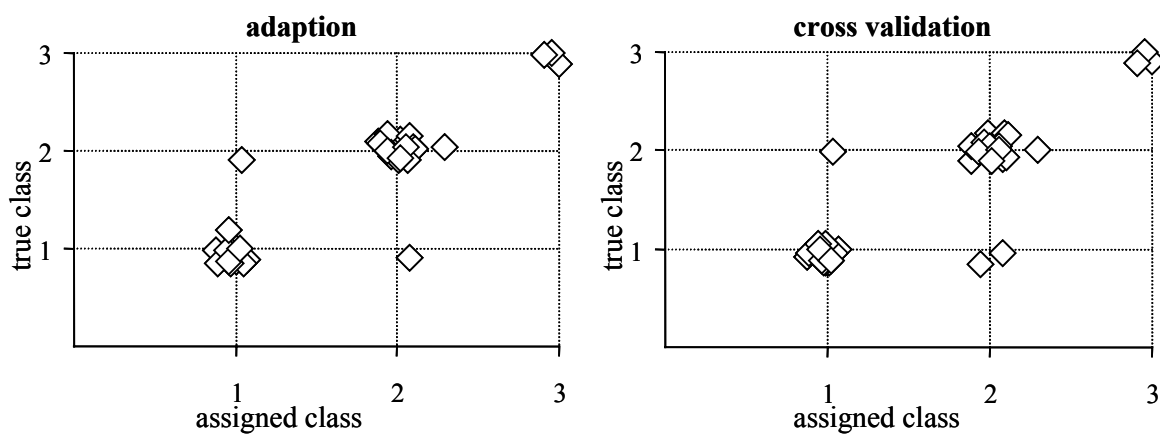
In addition, three novel flavour precursors were identified as sugar esters, i.e. (3-methylbutanoyl)-1-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranoside (**AK3**), (3-methylbutanoyl)-6-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranoside (**AK4**) and (3-Methyl-2-butenoyl)-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-apiofuranoside (**AK5**).



#### *Multi-element analysis of caffeine for authenticity assessment of green coffee*

The knowledge of the origin of food and its ingredients is actually one of the major topics for the food industry. For the assignment of the geographic origin of green coffee we determined the ratios of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^2\text{H}/^1\text{H}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  of extracted caffeine by means of elemental analyser/isotopic mass spectrometry (EA-IRMS).

To check the suitability of the analytical data obtained by EA-IRMS we used statistical calculations, i.e. (i) linear discrimination analysis (LDA) and (ii) validation via classification and regression trees (CART).



In the course of adaption one sample of class 1 (origin Africa) was assigned to class 2 (origin middle and south America) and vice versa, resulting in an error rate of 5.1 %. Using cross validation three of the 39 analyzed samples were assigned incorrectly resulting in an error rate of 7.7 %. Samples of class 3 (synthetic caffeine) were discriminated from that of natural origin at a rate of 100 %.





## F Literatur

- Abelson, P.H., Hoering, T.C., Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1961**, *47*, 623-632.
- Adhikari, J., Adhikari, S., Achaya, K.T., Glucosinolates in the seeds of Indian brassicas and *Eruca sativa*. *J. Oil Technol. Assoc. India* **1989**, *21*, 13-14.
- Agrawal, P.K., Bansal, M.C., Flavonoid glycosides. In: Carbon-13 NMR of flavonoids. Studies in organic chemistry, *39*. Agrawal, P.K. (Ed.). Elsevier, Amsterdam **1989**, 283-364.
- Akritopoulou-Zanze, I., Nakanishi, K., Stepowska, H., Grzeszczyk, B., Zamojski, A., Bero-va, N., Configuration of heptopyranoside and heptofuranoside side chains: 2-anthroate, a powerful chromophor for exciton couplet circular dichroism. *Chirality* **1997**, *9*, 699-712.
- Aleksandrov, J.L., Gall, L.N., Krasnov, N.V., Nikolaev, V.I., Shkourov, V.A., Mass spectro-metric analysis of thermally unstable compounds of low volatility by the extraction of ions from solution at atmospheric pressure. *J. Anal. Chem. USSR* 1986, 1227-1236 (übersetzt aus *Zh. Anal. Khim.* **1985**, *40*, 1570-1580).
- Alsberg, B.K., Goodacre, R., Rowland, J.J., Kell, D.B., Classification of pyrolysis mass spectra by fuzzy multivariate rule induction-comparison with regression, *K*-nearest neighbour, neural and decision-tree methods. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *348*, 389-407.
- Ames, J.M., Guy, R.C.E., Kipping, G.J., Effect of pH and temperature on the formation of volatile compounds in cysteine/reducing sugar/starch mixtures during extrusion cooking. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1885-1894.
- Apffel, J.A., Brinkmann, U.A.T., Frei, R.W., Evers, E.A., Gas-nebulized direct liquid introduction interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 2280-2284.
- Ashihara, H., Crozier, A., Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*, 407-413.
- Ashurst, P.R., Dennis, M.J., (Eds.) Food authentication. Blackie Academic & Professional, London **1996**.

- Atkins, C.A., Ritchie, A., Rowe, P.B., McCairns, E., Sauer, D., De novo purine synthesis in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) an soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiol.* **1982**, *70*, 55-60.
- Averett, S.E., Bohm, B.A., Eight flavonol glycosides in *Pyrola* (*Pyrolaceae*). *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1995-1996.
- Azzara, C.D., Campbell, L.B. Off-flavors of diary products. In: Off-Flavours in foods and beverages. Charalambous, G. (Ed.). Elsevier, New York **1992**, 329-373.
- Baertschi, P., Absolute  $^{18}\text{O}$  content of standard mean ocean water. *Earth Planet. Sci. Lett.* **1976**, *31*, 341-344.
- Bailey, M.E., Rourke, T.J., Gutheil, R.A., Wang, C.Y.J., Undesirable flavours of meat. In: Off-Flavours in foods and beverages. Charalambous, G. (Ed.). Elsevier, New York **1992**, 127-169.
- Baltenweck-Guyot, R., Trendel, J.-M., Albrecht, P., New hemiterpene glycosides in *Vitis vinifera* wine. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1326-1327.
- Barakat, H.H., El-Mousallamy, A.M.D., Souleman, A.M.A., Awadalla, S., Flavonoids of *Ochradenus baccatus*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3777-3779.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer, Berlin **2001**.
- Bender, M.M., Variations in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochem.* **1971**, *10*, 1239-1244.
- Beninger, C.W., Abou-Zaid, M.M., Flavonol glycosides from four pine species that inhibit early instar gypsy moth development. *Biochem. System Ecol.* **1997**, *25*, 505-512.
- Benner, R.L., Stedman, D.H., Universal sulfur detection by chemiluminescence. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1268-1271.
- Berger, R.G., Aroma biotechnology, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1995**.
- Bianco, V.V., Rocket, an ancient underutilized vegetable crop and its potential. In: Rocket Genetic Resources Network, Report of the first meeting, Lissabon **1994**.

- Bicchi, C.P., Binello, A.E., Pellegrino, G.M., Vanni, A.C., Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1549-1555.
- Bishop, C.T., Gas-liquid chromatography of carbohydrate derivatives. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1964**, *19*, 95-147.
- Blakely, C.R., Carmody, J.J., Vestal, M.L., A new soft ionization technique for mass spectrometry of complex molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5931-5933.
- Block, E.J., Flavor artifacts. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 692.
- Boelens, M.H., van Gemert, L.J., Volatile character-impact sulfur compounds and their sensory properties. *Perfumer and Flavorist* **1993**, *18*, 29-39.
- Bonnländer, B., Baderschneider, B., Messerer M., Winterhalter, P., Isolation of two novel terpenoid glucose esters from riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1474-1478.
- Breitmaier, E., Voelter, W., Carbon-13 NMR Spectroscopy. VCH, Weinheim **1987**, 452-453.
- Breitmaier, E., Structure elucidation by NMR in organic chemistry, Wiley, Chichester, U.K., **1993**.
- Brenninkmeijer, C.A.M., van Geel, B., Mook, W.G., Variations in the deuterium/hydrogen and oxygen-18/oxygen-16 ratios in cellulose extracted from a peat bog core. *Earth Planet. Sci. Lett.* **1982**, *61*, 283-290.
- Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., Peterlongo, F., Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J. Chromatography A.* **1998**, *825*, 9-16.
- Bruins, A.P., Covey, T.R., Henion, J.D., Ion spray interface for combined liquid chromatography / atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2642-2646.
- Buchanan, J.M., A backward glance. In: Comprehensive Biochemistry, Volume 36. Neuberger, A., Van Deenen, L.L.M., Semenza, G., (Eds.). Elsevier, Amsterdam **1986**, 1-69.
- Burdock, G.A., (Ed.), Fenaroli's handbook of flavor ingredients. CRC Press Inc., Florida, **1995**.

- Busch, K.L., Gish, G.L., McLuckey, S.A., Mass spectrometry / mass spectrometry: techniques and applications of tandem mass spectrometry. VCH Publishers, New York **1988**.
- Buttery, R.G., Guadagni, C.G., Ling, L.C., Seifert, R.M., Lipton, W., Additional volatile components of cabbage, broccoli, and cauliflower. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 829.
- Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L.C., Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 540-544.
- Cerny, M.S., Taube, E., Battaglia, R., Identification of bis-(4-isothiocyanatobutyl) disulfide and its precursor from rocket salad (*Eruca sativa*). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3835-3839.
- Chassagne, D., Crouzet, J., Bayonove, L.C., Vrillouet, J.-M., Baumes, R.L., 6-O- $\alpha$ -L-Arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1497-1500.
- Clarke, R.J., Vitzthum, O.G., (Eds.), Coffee: recent developments. Blackwell, Oxford **2001**.
- Cole, R.A., Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in *Cruciferae*. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 759-762.
- Conway, W.D., Countercurrent chromatography, apparatus, theory, applications. VCH, Weinheim **1990**.
- Cos, P., Calomme, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Van den Berghe, D., Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2000**, *22*, 207-341.
- Craig, H., Carbon 13 in plants and the relationship between carbon 13 and carbon 14 variations in nature. *J. Geol.* **1954**, *62*, 115-149.
- Craig, H., Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1957**, *12*, 133-149.
- Craig, H., Isotopic variations in meteoric waters. *Science* **1961a**, *133*, 1702-1703.
- Craig, H., Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters. *Science* **1961b**, *133*, 1833-1834.

- Cuyckens, F., Ma, Y.L., Pocsfalvi, G., Claeys, M., Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. *Analisis* **2000**, *28*, 888-895.
- Czeczot, H., Biological activities of flavonoids – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2000**, *9*, 3-13.
- Czerny, M., Grosch, W., Potent odorants of raw *Arabica* coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 868-872.
- Danho, D., Naullet, N., Martin, G.J., Deuterium, carbon and nitrogen isotopic analysis of natural and synthetic caffeine. Authentication of coffees and coffee extracts. *Analisis* **1992**, *20*, 179-184.
- Dansgaard, W., The O<sup>18</sup> abundance in fresh water. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1954**, *6*, 241-260.
- Dansgaard, W., Stable isotopes in precipitation. *Tellus* **1964**, *16*, 436-468.
- De Niro, M.J., Epstein, S., Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* **1977**, *197*, 261-263.
- De Niro, M.J., Epstein, S., Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1978**, *42*, 495-506.
- De Roos, K.B., Meat flavor generation from cysteine and sugars. In: Flavor Precursors: Thermal and enzymatic conversions. ACS Symposium Series 490, Teranishi, R., Takeoka, G.R., Guntert, M. (Eds.). American Chemical Society, Washington DC **1992**, 203-216.
- Deans, D.R., Use of heart cutting in gas chromatography: a review. *J. Chromatogr.* **1981**, *203*, 19-28.
- Degenhardt, A., Winterhalter, P., Isolation of natural pigments by high speed CCC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 1745-1764.
- Deines, P., The isotopic composition of reduced organic carbon. In: Fritz, P., Fontes, J.C., (Eds.). Handbook of environmental isotope geochemistry, 1. The terrestrial environment, A, Elsevier, Amsterdam **1980**, 329-406.
- Demole, E., Enggist, P., Ohloff, G., 1-p-Menthene-8-thiol: a powerful flavor impact constituent of grapefruit juice (*Citrus paradisi* MacFayden). *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 1785.
- Dennis, M.J., Recent developments in food authentication. *Analyst* **1998**, *123*, 151-156.

- Deuser, W.G., Hunt, J.M., Stable isotope ratios of dissolved inorganic carbon in the Atlantic. *Deep Sea Res.* **1969**, *16*, 221-225.
- Dillon, V.M., Overton, J., Grayer, R.J., Harborne, J.B., Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 599-603.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B., Molecular beams of macroions, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-2249.
- Dunbar, J., Wilson, A.T., Determination of geographic origin of caffeine by stable isotope analysis. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 590-592.
- Dutton, G.G.S., Applications of gas-liquid chromatography to carbohydrates: Part I. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1973**, *28*, 11-160.
- Dutton, G.G.S., Applications of gas-liquid chromatography to carbohydrates: Part II. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1974**, *30*, 9-110.
- Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.F., Hydroxyisoflavones as antioxidants for edible oils. *Food Chem.* **1983**, *11*, 161-166.
- Edwards, R., S-Adenosyl-L-methionine metabolism in alfalfa cell cultures following treatment with fungal elicitors. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1163-1169.
- Egloff, C.P., Phenolglykoside einheimischer *Salix* Arten. Dissertation **1982**, ETH Zürich.
- Engel, K.-H., Tressl, R., Formation of aroma components from nonvolatile precursors in passion fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 998-1002.
- Engel, K.-H., The importance of sulfur-containing compounds to fruit flavors. In: Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress, Teranishi, R., Wick, E.L., Hornstein, I., (Eds.). Kluwer, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, **1999**, 265-273.
- Epstein, S., Mayeda, T., Variations of  $^{18}\text{O}$  content of waters from natural sources. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1953**, *4*, 213-224.
- Escarpa, A., González, M.C., Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *J. Chromatography A.* **2000**, *897*, 161-170.

- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P., The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5-51.
- Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J., Glucosinolates and their breakdown products in food and plants. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 123-201.
- Fernald, M.L., Gray's manual of botany. Dioscorides Press, Portland <sup>1</sup>**1993**, 709.
- Ferreres, F., Esteban, E., Carpena-Ruiz, R., Jimenez, M.A., Tomas-Barberan, F.A., Acylated flavonol sophorotriosides from pea shoots. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1443-1446.
- Formica, J.V., Regelson, W., Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food. Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 1061-1080.
- Frank, I.E., Classification models: discriminant analysis, SIMCA, CART. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1989**, *5*, 247-256.
- Franke, W., Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Thieme, Stuttgart <sup>6</sup>**1992**, 322-323.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Kinsella, J.E., Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **1993**, *342*, 1103-1104.
- Friebolin, H., Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Wiley VCH, Weinheim, <sup>3</sup>**1999**.
- Friedman, I., Deuterium content of natural waters and other substances. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1953**, *4*, 89-103.
- Fritz, P., Fontes, J.C., Introduction. In: Fritz, P., Fontes, J.C., (Eds.). Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, 1. The Terrestrial Environment, A, Elsevier, Amsterdam **1980**, 1-19.
- Garcia, G.M., Huang, S.K., Stansbury, W.F., Optimization of the atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry interface. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 59-65.
- Garlick, G.D., The stable isotopes of oxygen. In: Wedepohl, K.H., (Ed.). Handbook of Geochemistry, 8 B. Springer, Heidelberg, New York, Berlin **1969**.

- Gawronski, J., Gawronska, K., Wynber, H., Alkaloid-catalyzed asymmetric addition of thio-carboxylic S-acids to cyclohex-2-en-1-ones. Absolute configuration of the adducts by O,S-dibenzoate Cotton effect. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 7, 307-308.
- Gawronski, J., Determination of absolute and relative configuration by chiroptical methods. In: Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*, Vol. E21a, Thieme, Stuttgart, New York **1995**, 499-533.
- Gibbings, J.C., Two dimensional separations: concept and promise. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1259.
- Gilfilian, E.S.J., The isotopic composition of sea water. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 406-408.
- Gluchoff-Fiasson, K., Fiasson, J.L., Waton, H., Quercetin glycosides from European aquatic *Ranunculus* species of subgenus *batrachium*. *Phytochemistry* **1997**, 45, 1063-1067.
- Goldberg, I., Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Chapman & Hall, London **1994**.
- Gómez-Campo, C., An introduction to the diversity of rocket (*Eruca* and *Diplotaxis* species) and their natural occurrence within the Mediterranean region. In: Rocket Genetic Resources Network, Report of the first meeting, November **1994**, Lissabon.
- Gonfiantini, R., Gratziu, S., Tongiorgi, E., Oxygen isotope *compositions* of water in leaves. In: *Isotopes in Radiation in Soil Plant Nutrition Studies*, IAEA, Wien **1965**, 405-410.
- Gonfiantini, R., Standards for stable isotope measurements in natural compounds. *Nature* **1978**, 271, 534-536.
- Gorin, P.A.J., Mazurek, M., Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance studies on methyl aldofuranosides and their O-alkyl derivatives. *Carbohydr. Res.* **1976**, 48, 171-186.
- Grayer, R.J., Harborne, J.B., A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **1994**, 37, 19-42.
- Guerrero, G., Suárez, M., Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2454-2458.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., Cordonnier, R.E., The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* **1985**, 331, 83-90.



- Gunata, Y.Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C.L., Cordonnier, R., Sequential enzymatic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* **1988**, *184*, 139-149.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Tapiero, C., Cordonnier, R.E., Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -D-glycosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1232-1236.
- Guo, W., Hosoi, R., Sakata, K., Watanabe, N., Yagi, A., Ina, K., Luo, S., (S)-Linalyl, 2-phenylethyl, and benzyl disaccharide glycosides isolated as aroma precursors from Oolong tea leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 1532-1534.
- Hageman, R., Nief, G., Roth, E., Absolute isotopic scale for deuterium analysis of natural waters. Absolute D/H ratio for SMOW. *Tellus* **1970**, *22*, 712-715.
- Hamence, J.H., Taylor, D., The composition of rapeseed meals, part I: The determination of the isothiocyanate present in *Eruca sativa*, a cruciferous seed, present in some rapeseed meals. *J. Assoc. Publ. Analysts* **1978**, *16*, 49-57.
- Harada, N., Nakanishi, K., Circular Dichroic Spectroscopy – Exciton coupling in organic stereochemistry. University Science Book, Mill Valley, California **1983**.
- Harada, N., Saito, A., Ono, H., Gawronski, J., Gawronska, K., Sugioka, T., Uda, H., Kuriuki, T., A CD method for determination of the absolute stereochemistry of acyclic glykols. 1. Application of the CD exciton chirality method to acyclic 1,3-dibenzoate systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3842-3852.
- Harada, N., Saito, A., Ono, H., Murai, S., Li, H.-Y., Gawronski, J., Gawronska, K., Sugioka, T., Uda, H., A CD method for determination of the absolute stereochemistry of acyclic glykols. 2. Application of the CD exciton chirality method to acyclic 1,2-dibenzoate systems. *Enantiomer* **1996**, *1*, 119-138.
- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., Kinoshito, T., Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glykorrhiza inflata*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 125-129.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481-504.
- Haribal, J., Renwick, J.A.A., Oviposition stimulants for the Monarch butterfly: flavonol glycosides from *Asclepias curassavica*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 139-144.

- Hartmann-Schreier, J., Über  $\beta$ -Glucosidase ( $\beta$ -D-Glucosidoglucohydrolase EC 3.2.1.21) der Papaya-Fruchtpulpe (*Carica Papaya* L.). Dissertation **1987**, Universität Würzburg.
- Henderson, J.F., Paterson, A.R.P., Nucleotide metabolism – an introduction. Academic Press, New York **1973**.
- Henion, J.D., Drug analysis by continuously monitored liquid/chromatography/mass spectrometry with a quadrupole mass spectrometer. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1687-1693.
- Herion, R., Herion G., Multivariate Datenanalyse: Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York **1994**, 67-97.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, J.B., Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.
- Heusinger, G., Mosandl, A., Chirale, schwefelhaltige Aromastoffe der gelben Passionsfrucht (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Darstellung der Enantiomeren und absolute Konfiguration. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 507-510.
- Heyworth, R., Walker, P.J., Almond-emulsin  $\beta$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-galactosidase. *J. Biochem.*, **1962**, *83*, 331-335.
- Hillaire-Marcel, G. Isotopes and Food. In: Fritz, P., Fontes, J.C., (Eds.) Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, 2. The Terrestrial Environment, B, Elsevier, Amsterdam **1986**, 507-548.
- Hines, R.L., Electrostatic atomization and spray painting. *J. Appl. Phys.* **1966**, *3*, 2730-2736.
- Hirose, F., Ashihara, H., Interrelationship between the pentose phosphate pathway and nucleotide synthesis in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Plant Science Lett.* **1984**, *35*, 123-126.
- Hodnick, W.F., Duval, D.L., Pardini, R.S., Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selective flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 573-580.
- Hoefs, J., Stable Isotope Geochemistry, Springer, Berlin, Heidelberg, New York **1973**.
- Hör, K., Authentizitätskontrolle von Aromastoffen:  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Analytik mittels on-line Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) als Baustein einer Multielement-Isotopenverhältnisanalyse. Dissertation, Universität Würzburg **2001**.

- Hörster, H., Monoterpenglykoside, eine Diskussion über ihre biologische Bedeutung und Möglichkeiten zur Synthese dieser Verbindungen. In: Vorkommen und Analytik ätherischer Öle. Kubeczka, K.H., (Hrsg.) Thieme, Stuttgart, **1979**, 34-40.
- Hollman, P.C.H., de Vries, J.H.M., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B., Katan, M.V., Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Amer. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1276-1282.
- Hollman, P.C.H., van Trijp, J.M.P., Buysman, M.N., van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., Katan, M.B., Relative bioavailability of the antioxidant quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* **1997**, *418*, 152-156.
- Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 937-942.
- Humpf, H.-U., Isolierung und Charakterisierung von Glykokonjugaten C<sub>13</sub>-norisoprenoider Aromastoffvorstufen. Dissertation **1992**, Universität Würzburg.
- Humpf, H.-U., Zhao, N., Berova, N., Nakanishi, K., Schreier, P., Absolute stereochemistry of natural 3,4-dihydroxy- $\beta$ -ionone glycosides by the CD exciton chirality method. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1761-1765.
- Iribarne, J.V., Thomson, V.A., On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287-2294.
- Ishag, K.E.A., Jork, H., Zeppezauer, M., Mono- und Sesquiterpenalkoholglykoside. 1. Mitteilung: Synthese und physikalisch-chemische Daten primärer Alkohol- $\beta$ -D-glucopyranoside. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1985**, *321*, 331-336.
- Jankun, J., Selman, S.H., Swieroz, R., Jankun, E.S., Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* **1997**, *387*, 561.
- Josefsson, E., Pattern, content, and biosynthesis of glucosinolates in some cultivated *Cruciferae*. Svaläf, Swedish Seed Association, Sweden, **1970**.
- Joseleau, J.-P., Chambat, G., Vignon, M., Barnoud, F., Chemical and <sup>13</sup>C NMR studies on two arabinans from the inner bark of young stems of *Rosa glauca*. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 165-175.
- Kaffee-Digest 1, Daten, Hintergründe, Welt, Europa und Deutschland. Schriftenreihe des Deutschen Kaffee-Verbandes e.V., Hamburg, **1999**, 2-21.

- Kaffee-Text, Kaffee: Produkt der Entwicklungsländer, Welthandelsgut und Genussmittel. Schriftenreihe des Deutschen Kaffee-Verbandes e.V., Hamburg, **2/90**, 3-7.
- Kalinowski, H.-O., Berger, S., Braun, S.,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. Thieme, Stuttgart **1984**, 178-192.
- Kasai, R., Suzuo, M., Askawa, J., Tanaka, O., Carbon-13 chemical shifts of isoprenoid- $\beta$ -D-glucopyranosides and - $\beta$ -D-mannopyranosides. Stereochemical influences of algycone alcohols. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *2*, 175-178.
- Kasai, R., Okohara, M., Asakawa, J., Mizutani, K., Tanaka, O.,  $^{13}\text{C}$  NMR study of  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomeric pairs of D-mannopyranosides and L-rhamnopyranosides. *Tetrahedron* **1979**, *35*, 1427-1432.
- Katsuki, T., Sharpless, K.B., The first practical method for asymmetric epoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974-5976.
- Keeling, C.D., The concentration and isotopic abundances of carbon dioxide in rural and marine air. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1961**, *24*, 277-298.
- Keeling, C.D., Mook, W.G., Tans, P.P., Recent trends in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of atmospheric carbon dioxide. *Nature* **1979**, *277*, 121-123.
- Kikuzaki, H., Sato, A., Mayahara, Y., Nakatani, N., Galloylglucosides from berries of *Pimenta dioica*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 749-752.
- Kim, H.J., Wood, E.R., Shin, C.G., Park, H., A new flavonol gallate ester from *Acer* and its inhibitory activity against HIV-1 integrase. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 145-148.
- Kitayoka, M., Kadokawa, H., Sugano, J., Ichikawa, K., Taki, J., Takaishi, S., Iijima, Y., Tsutsumi, S., Boriboon, M., Akiyama, T., Prenylflavonoids: A new class of non-steroidal phytoestrogen (Part I). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure activity relationship. *Planta Medica* **1998**, *64*, 511-515.
- Kirchhoff, E., Schieberle, P., Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4304-4311.
- Kjaer, A., Mass spectra of isothiocyanates, *Acta Chem. Scand.* **1963**, *17*, 2143-2154.
- Koenigs, W., Knorr, E., Über einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957-981.

- Konishi, S., Inoue, T., Takahashi, E., Localization of the carbon in caffeine biosynthesized from N-methyl carbon of gamma-glutamylmethanamide in tea plants. *Plant Cell Physiol.* **1972**, *13*, 695-702.
- Kováčik, V., Skamla, J., Joniak, D., Kosíková, B., Massenspektrometrie einiger Modellsubstanzen des Lignins, I. *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 1513-1522
- Koziet, J., Rossmann, A., Martin, G.J., Ashurst, P.R., Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetable juices. A European inter-laboratory comparison. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *271*, 31-38.
- Krahl, D., Windheuser, U., Zick, F.-K., Data Mining: Einsatz in der Praxis. Bonn <sup>1</sup>**1998**.
- Krammer, G., Winterhalter, P., Schwab, W., Schreier, P., Glycosidically bound aroma compounds in fruits of Prunus species: Apricot (*P. armenica*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 778-781.
- Kreis, P., Braunsdorf, R., Dietrich, A., Hener, U., Maas, B., Mosandl, A., Enantioselective analysis of linalool – scope and limitations. In: Prog. Flavour Precursor Stud. Proc. Int. Conf. **1993**, (Meeting Date 1992), Schreier, P., Winterhalter, P., (Eds.), 77-82.
- Krings, U., Berger, R.G., Biotechnological production of flavors and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 1-8.
- Krivan, V., Barth, P., Morales, A.F., Multielement analysis of green coffee and its possible use for the determination of origin. *Mikrochim. Acta* **1993**, *110*, 217-236.
- Kroopnick, P., Craig, H., Atmospheric oxygen: Isotopic composition and solubility fractionation. *Science* **1972**, *175*, 54-55.
- Kühnau, J., The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics.* **1974**, *24*, 117-191.
- Lé-Nguyén, B., Glykosidsynthesen von Sesqui- und Diterpenalkoholen. Dissertation **1984**, Universität Hamburg.
- Leland, J.V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T.E., (Eds.), Gas chromatography-olfactometry: The State of the Art (Proceedings of a Symposium held at the 219<sup>th</sup> ACS National Meeting in New Orleans, Louisiana during August of 1999). [In: ACS Symp. Ser. 2001, 782].

- Leitzmann, C., Watzl, B., Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag Stuttgart, **1995**.
- Leoni, O., Iori, R., Calmieri, S., Esopsito, E., Mengatti, E., Cortesi, R., Nastruzzi, C., Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and in vitro antiproliferative studies. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1799-1806.
- Li, G., Ohtani, T., A new method for the synthesis of 5- and 6-membered 2-thioxo-1,3-O,N-heterocycles. *Heterocycles* **1997**, *45*, 2471-2474.
- Li, W., Chan, C., Leung, H., Yeung, H., Xiao, P., Xanthones and flavonoids of *Polygala caudata*. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1998**, *4*, 415-417.
- Lindsay, R.C., Josephson, D.B., Olafsdottir, G., In: Seafood quality determination, Krammer, D.E., Liston, J. (Eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam **1986**, 221-234.
- Loveys, B.R., Millborrow, B.V., Isolation and characterization of 1'-O-abscisic acid- $\beta$ -D-glucopyranoside from fruit of *Lupinus luteus*. *Agr. Biol. Chem.* **1981**, *8*, 571-589.
- Maarse, H., Van Der Heij, D.G., (Eds.), Trends in Flavor Research. (Proceedings of the 7<sup>th</sup> Weurman Flavor Research Symposium, Noordwijkerhout, The Netherlands, 15<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> June 1993.). Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- Mahran, G.H., Kadry, H.A., Thabet, C.K., El-Olemy, M.M., Al-Azizi, M.M., Schiff Jr., P.L., Wong, L.K., GC/MS analysis of volatile oil from *Eruca sativa* seeds. *Int. J. Pharmacognosy* **1992**, *30*, 135-137.
- Maier, H.G., Wewetzer, H., Bestimmung von Diterpen-Glykosiden im Bohnenkaffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1978**, *167*, 105-107.
- Mayer, F., Grosch, W., Aroma simulation on the basis of the odorant composition of roasted coffee headspace. *Flav. Fragr. J.* **2001**, *16*, 180-190.
- Marino, C.N., Tamames, E.L., Jares, C.M.G., Contribution to the study of the aromatic potential of three Muscat *Vitis vinifera* varieties: identification of new compounds. *Food Sci. Technol Int.* **1995**, *1*, 105-116.
- Marks, H.S., Hilson, J.A., Leichtweis, H.C., Stoewsand, G.S., S-Methylcysteine sulfoxide in *Brassica* vegetables and formation of methyl methanethiosulfinate from Brussels sprouts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2098-2101.

- Marston, A., Hostettmann, K., Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *J. Chromatogr.* **1994**, *658*, 315-341.
- Martin, G.J., Multisite and multicomponent approach for the stable isotope analysis of aromas and essential oils. In: Fruit flavors: biogenesis, characterization and authentication. ACS Symp. Ser. 596 (Fruit Flavors), Rouseff, R.R., Leahy, M.M., (Eds.), American Chemical Society, Washington DC **1995**, 79-93.
- Martin, J.M., Pablos, F., González, A.G., Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta* **1998**, *46*, 1259-1264.
- Massiot, G., Lavaud, C., Besson, V., Couplage NRM à ongue distance entre protons dans les pyranoses. Mise en évidence et applications. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1990**, *127*, 440-445.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, R., Rojas, I., Bye, R., Linares, E., Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica* **1997**, *63*, 31-35.
- Mattila, P., Astole, J., Kumpulainen, J., Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5834-5841.
- Mazzafera, P., Carvalho, A., Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea* L.) by interspecific hybridization. *Euphytica* **1992**, *59*, 55-60.
- Mbairaroua, O., Thon-That Thang, Tapiero C., Synthèses de 6-O- $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosides de monoterpène. *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 79-99.
- McFadden, W.H., Schwartz, H.L., Evans, S., Direct analysis of liquid chromatographic effluents. *J. Chromatogr.* **1976**, *122*, 389-396.
- McGregor, D.I., Mullin, W.J., Fenwick, G.R., Review of analysis of glucosinolates. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1983**, *66*, 825-849.
- Melzer, E., Schmidt, H.-L., Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8159-8164.
- Menon, A.N., Chacko, S., Narayanan, C.S., Free and glycosidically bound volatiles of pepper (*Piper nigrum* L.). *J. Essent. Oil Res.* **2001**, *13*, 166-169.

- Mistry, B.S., Reineccius, G.A., Jasper, B.L., Comparison of gas chromatographic detectors for the analysis of volatile sulfur compounds in foods. In: Sulfur compounds in foods, ACS Symposium Series 564 (Sulfur Compounds in Foods), Mussinan, C.J., Keelan, M.E. (Eds.). American Chemical Society, Washington DC **1994**, 224-235.
- Miyase, T., Sano, M., Yoshino, K., Nonaka, K., Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (III). *Phytochemistry* **1999a**, *52*, 311-319.
- Miyase, T., Hoguchi, H., Chem, X.-M., Sucrose esters and xanthone C-glycosides from the roots of *Polygala sibirica*. *J. Nat. Prod.* **1999b**, *62*, 993-996.
- Mizutani, K., Kasai, R., Tanak, O., <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of α- and β-anomeric series of alkyl L-arabinopyranosides. *Carbohydr. Res.* **1980**, *87*, 19-26.
- Mosandl, A., Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils. *Food Rev. Int.* **1995**, *11*, 597-664.
- Mosandl, A., Enantioselective analysis. In: Flavourings. Ziegler, E., Ziegler, H., (Eds.). Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 595-633.
- Mussinan, C.J., Keelan, J.E. (Eds.), Sulfur compounds in foods (Developed from a Symposium at the 206<sup>th</sup> National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, Illinois, August 22-27, 1993). ACS Symp. Ser. 564, ACS, Washington **1994**.
- Näf, R., Velluz, A., Sulphur Compounds and some uncommon esters in durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Flav. Fragr. J.* **1996**, *11*, 295-303.
- Nakanishi, K., Berova, N., The exciton chirality method. In: Circular dichroism principles and applications. Nakanishi, K., Berova, N., Woody, R., (Eds.). VCH Publishers, New York **1994**, 361-398.
- Nielsen, J.K., Olsen, K.E., Petersen, M.K., Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 539-544.
- Nier, A.O.A, redetermination of the relative abundances of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon and potassium. *Phys. Rev.* **1950**, *77*, 789-793.
- Niessen, W.M.A., Tinke, A.P., Liquid chromatography-mass spectrometry – General principles and instrumentation. *J. Chromatogr. A* **1995**, *703*, 37-57.



- Nijssen, L.M., Visscher, C.A., Maarse, H., Boelens, M.H., (Eds.), Volatile compounds in foods, qualitative and quantitative data, Seventh Edition, **1999**.
- Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K.I., Berhow, J., Hasegawa, S., High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in *Citrus* with a photodiode-array detector. *J. Chromatography A* **1994**, 667, 59-66.
- Nygaard, P., Deoxyribonucleotide pools in plant tissue culture. *Physiol. Plant.* **1972**, 26, 29-33.
- Ogutuga, D.B.A., Norhtcote, D.H., Biosynthesis of caffeine in tea callus tissue. *Biochem. J.* **1970**, 117, 715-720.
- Ohloff, G., (Ed.), Riechstoffe und Geruchssinn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York **1990**, 1-76.
- Ohya, I., Shinozaki, Y., Tobita T., Takahashi, H., Matsuzaki, T., Sucrose esters from the surface lipids of *Petunia hybrida*. *Phytochemistry* **1996**, 41, 787-789.
- O'Leary, M.H., Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* **1981**, 20, 553-567.
- Oliveira, J.M., Maia, M.O., Baumes, R.L., Bayonove, C.L., Free and bound aromatic components of *Loureiro* and *Alvarinho* grape varieties from the Vinhos Verdes region. *Wein-Wiss.* **2000**, 55, 13-20.
- Ono, M., Yoshida, A., Ito, Y., Nohara, T., Phenethyl alcohol glycosides and isopentenol glycoside from fruit of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry*, **1999**, 51, 819-823.
- Ormrod, D.P., Landry, L.G., Conklin, P.L., Short term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation of flavonoid-deficient *Arabidopsis mutants*. *Physiologia Plantarum* **1995**, 93, 602-610.
- Pabst, A., Untersuchungen über glykosidisch gebundene Aromastoffe in Himbeeren (*Rubus idaeus*, L.). Dissertation **1991**, Universität Würzburg.
- Pabst, A., Barron, D., Etiévant, P., Schreier, P., Studies on the enzymatic hydrolysis of bound aroma constituents from raspberry fruit pulp. *J. Agric. Food Chem.* **1991a**, 39, 173-175.
- Pabst, A., Barron, D., Sémon, E., Schreier, P., Isolation of a novel linalool disaccharide glycoside from raspberry fruit. *Tetrahedron Lett.* **1991b**, 32, 4885-4888.

- Paulsen, H., Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide. *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 184-204.
- Paulsen, H., Lé-Nguyén, B., Sinnwell, V., Heemann, V., Seehofer, F., Synthese von Glykosiden von Mono-, Sesqui- und Diterpenalkoholen. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1513-1536.
- Pawan, K.A., NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307-3330.
- Pickenhagen, W., Brönner-Schindler, H., Enantioselective synthesis of (+)- and (-)-cis-2-methyl-4-propyl-1,3-oxathioane and their olfactive properties. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 947-952.
- Prodoliet, J., Baumgartner, M., Martin, Y.-L., Remaudt, G., Determination of the geographic origin of green coffee by stable isotope techniques. (ASIC, 17<sup>e</sup> colloque, Nairobi), *Colloq. Sci. Int. Cafe* **1997**, *17*, 197-200
- Rahman, W., Ilyas, M., Usmani, J.N., Flavonoids from *Eruca sativa* Mill. *J. Indian Chem. Soc.* **1969**, *46*, 286.
- Rele, D., Zhao, N., Nakanishi, K., Berova, N., Acyclic 1,2-/1,2-mixed pentols. Synthesis and general trends in bichromophoric exciton couplet circular dichroic spectra. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2759-2776.
- Reuber, S., Bornmann, J.F., Weissenböck, G., A flavonoid mutant of barley exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in primary leaves. *Plant Cell Environ.* **1996**, *19*, 593-599.
- Richter, H., Obermann, H., Spitteller, G., Über einen neuen Kauran-18-säure-glycopyranosylester aus grünen Kaffeebohnen. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 1963-1970.
- Richter, H., Spitteller, G., Über ein neues Atractyligenin-Glykosid aus grünen Kaffeebohnen. *Chem. Ber.* **1978**, *111*, 3506-3509.
- Richter, H., Spitteller, G., Über ein neues Furokauran-glykosid aus grünen Kaffeebohnen. *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 1088-1092.
- Rosa, E.A.S., Heaney, R.K., Fenwick, G.R., Ports, C.A.M., Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* **1997**, *19*, 99-215.
- Roscher, R., Biosynthese und Metabolismus von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanon (Furaneol®). Dissertation **1998**, Universität Würzburg.

- Ruff, C., Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: Bestimmung des  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisses mittels on-line Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) als Baustein einer Multielement-Isotopenanalyse. Dissertation, Universität Würzburg **2001**.
- Saleh, N.A.M., Majak, W., Towers, G.H.N., Flavonoids of *Equisetum* species. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1095-1099.
- Scarpellino, R., Soukup, R.J., Key flavours of heat reactions of food ingredients. In: Flavor Science, Acree, T.E., Teranishi, R., (Eds.). ACS, Washington **1993**, 309-335.
- Scheline, R.R., CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds. CRC Press, Boca Raton, Fl. **1991**.
- Schlüter, M., Gmelin, R., Abnormale enzymatische Spaltung von 4-Methylthiobutylglucosinolat in Frischpflanzen von *Eruca sativa*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 3427-3431.
- Schmidt, H.-L., Gleixner, G., Isotopic patterns in natural compounds origin and importance in authenticity analysis. In: Natural Product Analysis. Schreier, P., Herderich, M., Humpf, H.-U., Schwab, W. (Eds.), Vieweg, Wiesbaden **1998**, 271-280.
- Schmidt, C.O., Krammer, G.E., Gatfield, I., Hilmer, J.-M., Sommer, H., Meier, L., Herbrand, K., Werkhoff, P., Multielement IRMS of flavor compounds. *Isot. Environ. Health Stud.* **1999**, *35*, 275.
- Schmidt, H.-L., Werner, R.A., Roßmann, A.,  $^{18}\text{O}$  Pattern and biosynthesis of natural plant products. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 9-32.
- Schneider, C., Schreier, P., Humpf, H.-U., Exciton-coupled circular dichroism (ECCD) in acyclic hydroxylated dienes: A sensitive method for the direct stereochemical assignment of lipoxygenase products. *Chirality* **1997**, *9*, 563-567.
- Schomburg, G., Weeke, F., Müller, F., Oreans, M., Multidimensional gas chromatography (MDGC) in capillary columns using double oven instruments and a newly designed coupling piece for monitoring detection after preseparation. *Chromatographia* **1983**, *16*, 87-89.
- Schomburg, G., Husmann, H., Podmaniczky, L., Weeke, F., Rapp, A., Coupled gas chromatographic methods for separation, identification and quantitative analysis of complex mixtures: MDGC, GC-MS, GC-IR, LC-GC. In: Analysis of Volatiles. Schreier, P., (Ed.). Würzburg **1984**, 121-150.

- Schomburg, G., Two-dimensional gas chromatography: principles, instrumentation, methods. *J. Chromatogr. A* **1995**, 703, 309-325.
- Schreder, B., Lukacs, Z., Schmitt, M., Schreier, P., Humpf, H.-U., 1-Naphthoic acid: A new type of asymmetric chromophore for exciton-coupled circular dichroism (ECCD). *Tetrahedron Asym.* **1996**, 7, 1543-1546.
- Schreier, P., Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Hüthig, Heidelberg **1984**.
- Schreier, P., Bernreuther, A., Huffer, M., Analysis of chiral organic molecules. De Gruyter, Berlin, New York, **1995**, 132-133.
- Schreier, P., Enzymes and flavor biotechnology. In: Biotechnology of aroma compounds, Berger, R.G., (Ed.) Band 55: Advances in biochemical engineering biotechnology, Scheper, T., (Ed.) Springer, Berlin, Heidelberg **1997**, 51-72.
- Schreier, P., Herderich, M., Humpf, H.-U., Schwab, W., (Eds.) Natural Product Analysis: Chromatography – Spectroscopy – Biological Testing. Vieweg & Sohn, Braunschweig / Wiesbaden, **1998**.
- Schultz, T.H., Flath, R.A., Mon, T.R., Egging, S.B., Teranishi, R., Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, 446-449.
- Schutte, L., Flavor precursors in Food. In: Phenolic, sulfur, and nitrogen compounds in food flavors; ACS Symposium Series 26, Charalambous, G., Katz, I., (Eds.). American Chemical Society, Washington DC **1976**, 96-113.
- Schwab, W., Untersuchungen über nichtflüchtige Metabolite pflanzlicher Aromastoffe. Dissertation, Universität Würzburg, **1989**.
- Schwab, W., Scheller, G., Schreier, P., Glycosidically bound aroma components from sour cherry. *Phytochemistry* **1990**, 29, 607-612.
- Sessions, A.L., Burgoyne, T.W., Schimmelman, A., Hayes, J.M., Fractionation of hydrogen isotopes in lipid biosynthesis. *Org. Geochem.* **1999**, 30, 1193-1200.
- Shankaranarayana, M.L., Raghavan, B., Abraham, K.O., Natarajan, C.P., Sulphur compounds in Flavours. In: Food Flavours Part A. Introduction. Morton, I. D., Macleod, A.J. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, **1982**, 169-281.

- Shaw, P., Ammons, J., Braman, R., Volatile sulfur compounds in fresh orange and grapefruit juices: identification, quantitation, and possible importance to juice flavor *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 778-781.
- Shaw, P.E., Wilson, C.W., Volatile sulfides in headspace gases of fresh and processed citrus juices. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 685.
- Shearer, R., Gas chromatography and flameless sulfur chemiluminescence detection. *Am. Lab.* **1994**, *26*, 34-41.
- Skaltsa, H., Vrykokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G., Manetas, Y., UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs in *Quercus ilex*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 987-900.
- Smith, B.N., Epstein, S., Biochemistry of the stable isotopes of hydrogen and carbon in salt marsh biota. *Plant Physiol.* **1970**, *46*, 738-742.
- Smith, B.N., Epstein, S., Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants. *Plant Physiol.* **1971**, *47*, 380-384.
- Snatzke, G., Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I. *Chemie in unserer Zeit* **1981**, *15*, 78-87.
- Spencer, G.F., Daxenbichler, M.E., Gas chromatography-mass spectrometry of nitriles, isothiocyanates and oxazolidinethiones derived from cruciferous glucosinolates. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 359-367.
- Spiller, M.A., The coffee plant and its processing. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1984**, *158*, 75-89.
- Stahl-Biskup, E., Monoterpene glycosides, state-of-the-art. *Flav. Fragr. J.* **1987**, *2*, 75-82.
- Stevenson, P.C., Haware, M.T., Maackia in *Cicer bijunngum* associated with resistance to *Botrytis*. *Biochem. System. Ecol.* **1999**, *27*, 761-767.
- Stott, K., Stonehouse, J., Keeler, J., Hwang, T.L., Shaka, A.J., Excitation sculpting in high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: Application to selective NOE experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4199-4200.
- Strauss, C.R., Williams, P.J., Wilson, B., Dimitriadis, E., Formation and identification of aroma compounds from non-volatile precursors in grapes and wine. *Found. Biotech. Ind. Ferment. Res.* **1984**, *3*, 51-60.

- Strauss, C.R., Gooley, P.R., Williams, P.J., Application of droplet countercurrent chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenoids, phenols and other constituents of grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 519-524.
- Suárez, M., Duque, C., Wintoch, H., Schreier, P., Glycosidically bound aroma compounds from the pulp and the peelings of lulo fruit (*Solanum vestissimum* D.). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1643-1645.
- Suhaj, M., Kovac, J., Methods for detection of food adulteration and food authentication. 3. Meat and meat products. *Bull. Potravin. Vysk* **2000**, *39*, 241-254.
- Suzuki, T., The participation of S-adenosylmethionine in the biosynthesis of caffeine in the tea plant. *FEBS Letters* **1972**, *24*, 18-20.
- Suzuki, T., Ashihara, H., Walzer, G.R., Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 255-2584.
- Teranishi, R., Wick, E.L., Hornstein, I., (Eds.) Flavor chemistry: 30 years of progress. Kluwer, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, **1999**.
- Thevenet, S., Wernicke, A., Belniak, S., Descotes, G., Bouchu, A., Queneau, Esterification of unprotected sucrose with acid chlorides in aqueous medium: kinetic reactivity versus acyl- or alkyloxycarbonyl-group migrations. *Carbohydr. Res.* **1999**, *318*, 52-66
- Thiébaud, D., Rosset, R., Modern countercurrent chromatography. *LC-GC Int.* **1993**, *6*, 154-162.
- Thomson, B.A., Iribarne, J.V., Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4451-4463.
- Tijburg, L.B.M., Malvy, D., Mattern, T., Folts, J.D., Weisgerber, U.M., Katan, M.B., Bruckert, E., Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Cah. Nutr. Diet.* **2000**, *35*, 135-145.
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R., Dubourdieu, D., Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flav. Fragr. J.* **1998**, *13*, 159-162.
- Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M.T., Beck, I., Hocquaux, J., Braun, A.M., Oliverose, E., Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen quenching. *J. Photochem. Photobiol.* **1993**, *19*, 205-215.

- Tressl, R., Kersten, E., Nittka, C., Rewicki, D., Formation of sulfur-containing flavor compounds from [<sup>13</sup>C]-labeled sugars, cysteine, and methionine, In: Sulfur compounds in Foods, ACS Symposium Series 564, Mussinan, C.J., Keelan, M.E. (Eds.). American Chemical Society, Washington DC **1994**, 224-235.
- Uchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., Usmanhany, K., Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 3369-3372.
- Van Trigt, R., Kerstel, E.R.T., Visser, G.H., Meijer, H.A.J., Stable isotope ratio measurements on highly enriched water samples by means of laser spectroscopy. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2445-2452.
- Vaughan, J.C., The structure and utilization of oil seeds. Jamba, rocket, taramira (*Eruca sativa* Lam.). Chapman and Hall, London <sup>1</sup>**1970**, 59-61.
- VO EG Nr. 2232-96 des europäischen Parlaments und des Rates vom 28.10.1996 zur Festlegung eines Gemeinschaftsverfahrens für Aromastoffe, die in oder auf Lebensmitteln verwendet werden oder verwendet werden sollen (<http://europa.eu.int/scad+/leg/de/lvb/-121081.htm>).
- Voirin, S.G., Baumes, R.L., Sapis, J.-C., Bayonove, C.L., Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatography* **1992**, *595*, 269-281.
- Wagner, H., Pharmazeutische Biologie, Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart **1988**, 104-106.
- Wagner, K.G., Backer, A.I., Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. In: International Review of Cytology, Volume 134, Jeon, K.W., Friedlander, M., (Eds.). Academic Press, San Diego **1992**, CA, 1-84.
- Walker, A.F., Plants as functional foods. *Spec. Publ. – R. Soc. Chem.* **2000**, *248* (Functional Foods II), 113-127.
- Wang, H.K., Xia, Y., Yang, Z.Y., Morris, N.S.L., Lee, K.H., Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumour and anti-HIV agents. *Adv. Experiment. Med. Biol.* **1998**, *439*, 191-225.
- Wang, H.K., The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2103-2119.

- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K., Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *11*, 152-160.
- Warwick, S.I., Black, L.D., Molecular relationships in subtribe Brassicinae (*Cruciferae*, tribe *Brassicaceae*). *Can. J. Bot.* **1993**, *71*, 906-918.
- Warwick, S.I., New Taxonomic views within *Eruca* and *Diplotaxis* genera in the light of hybridization and molecular findings. In: Rocket Genetic Resources Network, Report of the first meeting, November **1994**, Lissabon.
- Watanabe, N., Nakajima, R., Watanabe, S., Moon, J.-H., Inagaki, J., Sakata, K., Yagi, A., Ina, K., Linalyl and bornyl disaccharide glycosides from *Gardenia jasminoides* flowers. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 457-459.
- Way, K., Fano, L., Scott, M.R., Thew, K., Nuclear data. A collection of experiments values of half-lives, radiation energies, relative isotopic abundances, nuclear movements and cross-sections. *Natl. Bur. Standards U.S. Circ.* **1950**, 499.
- Weber, B., Haag, H.-P., Mosandl, A., Stereoisomere Aromastoffe LIX. 3-Mercaptohexyl- und 3-Methylthiohexylalkanoate – Struktur und Eigenschaften der Enantiomeren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 426-428.
- Weber, B., Chirale Schwefelhaltige Aromastoffe. Dissertation Universität Frankfurt, **1996**.
- Weckerle, B., Michel, K., Balazs, B., Schreier, P., Toth, G., Quercetin-3,3',4'-tri-O- $\beta$ -D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* Mill. *Phytochemistry* **2001a**, *57*, 547-551.
- Weckerle, B., Schreier, P., Humpf, H.-U., A new one step strategy for the stereochemical assignment of acyclic 2- and 3-sulfanyl-1-alkanols using the CD exciton chirality method. *J. Org. Chem.* **2001b**, im Druck.
- Werkhoff, P., Brennecke, S., Bretschneider, W., Güntert, M., Hopp, R., Surburg, H., Chirospecific analysis in essential oil, fragrances and flavor research. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 307-328.
- Werner, R.A., Kornxl, B.E., Rossmann, A., Schmidt, H.-L., On-line determination of  $\delta^{18}\text{O}$  values of organic substances. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *319*, 159-164.
- Whelan, T., Sackett, W.M., Benedict, C.R., Carbon isotope discrimination in a plant processing the C4 dicarboxylic acid pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1970**, *41*, 1205-1210.



- Wickman, F.E., Variations in the relative abundance of the carbon isotopes in plants. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1952**, *2*, 243-254.
- Widder, S., Measurement of flavor release by sensory and instrumental methods. *Dragoco Rep.* **1998**, *3*, 101-111.
- Widder, S., Lüntzel, C.S., Dittner, T., Pickenhagen, W., 3-Mercapto-2-methylpentan-1-ol, a new powerful aroma compound. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 418-423.
- Wiesler, W.T., Nakanishi, K., Relative and absolute configurational assignments of acyclic polyols by circular dichroism. 1. Rationale for a simple procedure based on the exciton chirality method. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9205-9213.
- Williams, C.A., Harborne, J.B., Flavone and flavonol glycosides. In: *Flavonoids*, Harborne, J.B. (Ed.), **1988**, 303-328.
- Williams, C.A., Houlst, J.R.S., Harborne, J.B., Greenham, J., Eagles, J., A biologically active lipophilic flavonoid from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 267-270.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, T., Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 766-772.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., Massy-Westropp, R.A., Use of C-18 reversed phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and norisoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatogr.* **1982**, *235*, 471-480.
- Willoughby, R.C., Browner, R.F., Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectroscopy. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2626-2631.
- Winkler, F.J., Application of natural abundance stable isotope mass spectrometry in food control. In: *Chromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food Safety*, Frigerio, A., Milon, H., (Eds.). Elsevier, Amsterdam **1984**, 173-190.
- Winter, M., Furrer, A., Willhalm, B., Thommen, W., Identification and synthesis of two new organic sulfur compounds from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1613.
- Winterhalter, P., Untersuchungen über Aromastoffvorstufen in Papaya- (*Carica papaya*, L.) und Quittenfrüchten (*Cydonia oblonga*, Mill.). Dissertation **1988a**, Universität Würzburg.

- Winterhalter, P., Schreier, P., Free and bound C<sub>13</sub> norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1988b**, *36*, 1251-1256.
- Winterhalter, P., Schreier, P., C<sub>13</sub>-norisoprenoid glycosides in plant tissues: an overview on their occurrence, composition and role as flavor precursors. *Flav. Fragr. J.* **1994**, *9*, 281-287.
- Winterhalter, P., Carotenoid-derived aroma compounds: Biogenetic and biotechnological aspects. In: *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*; ACS Symp. Ser. 637, Takeoka, G.R., Teranishi, R., Williams, P.J., Kobayashi, A., (Eds.). American Chemical Society, Washington DC **1996**, 295-308.
- Winterhalter, P., Skouroumounis, G.K., Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. In: *Biotechnology of aroma compounds*, Berger, R.G., (Ed.) Vol. 55: *Advances in biochemical engineering biotechnology*, Scheper, T., (Ed.) Springer, Berlin, Heidelberg **1997a**, 73-106.
- Winterhalter, P., Messerer, M., B. Bonnländer, Isolation of the glucose ester of (*E*)-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid from Riesling wine. *Vitis* **1997b**, *36*, 55-56.
- Winterhalter, P., Knapp, H., Straubinger, J., Fornari, S., Watanabe, N., Application of counter-current chromatography to the analysis of aroma precursors in rose flowers. In: *Flavor Analysis: Developments in isolation and characterization*; ACS Symp. Ser. 705 (Flavor Analysis), Mussinan, C.J., Morello, M.J., (Eds.), American Chemical Society, Washington DC **1998**, 181-192.
- Winterhalter, P., Knapp, H., Straubinger, M., Water soluble aroma precursors. Analysis, structure, and reactivity. In: *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*, Teranishi, R., Wick, E.L., Hornstein, I., (Eds.). Kluwer, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, **1999**, 255-264.
- Wintoch, H., Krammer, G., Schreier, P., Glycosidically bound aroma compounds from two strawberry fruit species, *Fragaria vesca* f. *semperflorens* and *Fragaria x ananassa*, cv. Korona. *Flav. Fragr. J.* **1991**, *6*, 209-215.
- Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B., Malvy, D., Remesy, C., Antioxidants in tea. *Cah. Nutr. Diet.* **2000**, *35*, 123-133.
- Wysocki, V.H., In: *Mass spectrometry in the biological sciences*. Gross, M.L., (Ed.). Kluwer, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow **1992**, 59-77.

- Wulff, G., Röhle, G., Ergebnisse und Probleme der O-Glykosidsynthese. *Angew. Chem.* **1974**, *86*, 173-208.
- Yakir, D., De Niro, M.J., Oxygen and hydrogen isotope fractionation during cellulose metabolism in *Lemna gibba* L. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 325-332.
- Yamashita, M., Fenn, J.B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1984a**, *88*, 4451-4459.
- Yamashita, M., Fenn, J.B., Negative ion production with electrospray ion source. *J. Phys. Chem.* **1984b**, *88*, 4671-4675.
- Yoshimoto, K., Itatani, Y., Shibata, Y., Tsuda, Y., Utilization of sugars in organic synthesis. Part IV. Carbon-13 nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidations. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 208-219.
- Yost, R.A., Enke, C.G., Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2274-2275.
- Zhao, N., Berova, N., Nakanishi, K., Rohmer, M., Mougenot, P., Jurgens, U.J., Structures of two bacteriohopanoids with acyclic pentol side-chains from the cyanobacterium Nostoc PCC 6720. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2777-2788.
- Zhou, P., Berova, N., Nakanishi, K., Knani, M., Rohmer, M., Microscale CD method for determining absolute configurations of acyclic amino tetrols and amino pentols. Structures of aminobacteriohopanepolyols from the methylotrophic bacterium *Methylococcus luteus*. *J. Am. Chem. Soc.* **1991a**, *113*, 4040-4042.
- Zhou, P., Berova, N., Nakanishi, K., Rohmer, M., Assignment of absolute stereochemistry of aminopolyols by the bichromophoric exciton chirality method. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991b**, 256-258.
- Zhou, P., Verova, N., Wiesler, W.T., Nakanishi, K., Assignment of relative and absolute configuration of acyclic polyols and aminopolyols by circular dichroism – trends follow Fischer's sugar family tree. *Tetrahedron* **1993a**, *49*, 9343-9352.
- Zhou, P., Zhao, N., Rele, C.N., Verova, N., Nakanishi, K., A chiroptical/chemical strategy for configurational assignments of acyclic 1,3-skipped polyols: model 1,2,4,6-tetrols. *J. Am. Chem. Soc.* **1993b**, *115*, 9313-9314.

Ziegler, H., Osmond, C.B., Stichler, W., Trimborn, P., Hydrogen isotope discrimination in higher plants: Correlations with photosynthetic pathway and environment. *Planta* **1976**, *128*, 85-92.

## Publikationen

### 1 Veröffentlichungen

- [1] Adam, W., Lukacs, Z., Saha-Möller, C.R., Weckerle, B., Schreier, P., Microbial asymmetric CH oxidations of simple hydrocarbons: A novel monooxygenase activity of the topsoil microorganism *Bacillus megaterium*. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 16, 2923-2926.
- [2] Hauck, T., Weckerle, B., Schwab, W., Metabolism of ethyl tiglate in apple fruits leads to the formation of small amounts of (*R*)-ethyl 2-methylbutanoate. *Enantiomer* **2000**, 5, 505-512.
- [3] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., On-line HRGC-IRMS determination of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values of flavour compounds - On the way to multi-element isotope ratio analysis for authenticity assessment. In: Frontiers of flavour science, Schieberle, P., Engel, K.-H., (Eds.). DFA, Garching **2000**, 107-110.
- [4] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., Schreier, P., Coupled gas chromatographic techniques in biogenetic and flavour authenticity studies. In: Flavour science for the 21<sup>st</sup> century, Tsuruta, H., (Ed.). Takasago Symp. Proc., 39, Takasago, Tokyo **2000**.
- [5] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie zur Bestimmung des  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnisses von Benzaldehyd in Lebensmitteln. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **2000**, 96, 243-247.
- [6] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P.,  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratio analysis of flavor compounds by on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS): benzaldehyde. *J. High Resol. Chromatogr.* **2000**, 23, 357-359.

- [7] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: Benzaldehyd in alkoholischen Getränken. *Alkohol-Industrie* **2000**, *13*, 144-145.
- [8] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) zur Bestimmung des  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnisses. *Lebensmittelchemie* **2000**, *54*, 145-146.
- [9] Tóth, G., Roth, M., Weckerle, B., Schreier, P., Structural elucidation of two novel products from the soybean lipoxygenase-catalysed dioxygenation of curcumin. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 51-54.
- [10] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Flavour authenticity studies by  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratio determination using on-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 21-25.
- [11] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P.,  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratio analysis of flavor compounds by on-line gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS): citral. *Flav. Fragr. J* **2001**, *16*, 344-348.
- [12] Weckerle, B., Bastl-Borrmann, R., Richling, E., Hör, K., Ruff, C., Schreier, P., Cactus pear (*Opuntia ficus indica*) flavour constituents - Chiral evaluation (MDGC-MS) and isotope ratio (HRGC-IRMS) analysis. *Flav. Fragr. J.* **2001**, *16*, 360-363.
- [13] Weckerle, B., Michel, K., Balázs, B., Schreier, P., Tóth, G., Quercetin 3,3',4'-tri-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* (Mill.). *Phytochemistry* **2001**, *57*, 547-551.
- [14] Weckerle, B., Schreier, P., Humpf, H.-U., A new one step strategy for the stereochemical assignment of acyclic 2- and 3-sulfanyl-1-alkanols using the CD exciton chirality method. *J. Org. Chem.*, im Druck.

- [15] Weckerle, B., Gáti, T., Tóth, G., Schreier, P., 3-Methylbutanoyl and 3-methylbut-2-enoyl disaccharides from green coffee beans (*Coffea arabica*). *Phytochemistry*, zur Veröffentlichung eingereicht.

## 2 Posterbeiträge

- [1] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., On-line HRGC-IRMS determination of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  values of flavour compounds - On the way to multi-element isotope ratio analysis for authenticity assessment. 9<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium, Freising, 22.-25. Juni 1999.
- [2] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., Schreier, P., On-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS):  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratio analysis of citral from various essential oils. International Symposium on Essential Oils, Hamburg, 10.-13. September 2000.
- [3] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., On-line gas chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-P-IRMS):  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratio analysis of benzaldehyde from various sources. 23<sup>th</sup> International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, 05.-10. Juni 2000.
- [4] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Authentizitätskontrolle von Aromastoffen: Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (HRGC-IRMS) zur Bestimmung des  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnisses. Deutscher Lebensmittelchemiker-Tag, Stuttgart-Hohenheim, 11.-13. September 2000.
- [5] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Determination of  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratios of natural products by on-line gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry (HRGC-IRMS). DGF Joint international congress and expo 'Lipids, fats and oils - Opportunities and responsibilities in the new century', Würzburg, 08.-10. Oktober 2000.
- [6] Weckerle, B., Michel, K., Balázs, B., Schreier, P., Tóth, G., Quercetin 3,3',4'-tri-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* (Mill.). GDCh Jahrestagung Chemie 2001, Universität Würzburg, 23.-29. September 2001.

### 3 Vorträge

- [1] Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., Schreier, P., Pyrolysis isotope ratio analysis (P-IRMS) - Experiences with the novel on-line HRGC coupled techniques for the determination of  $^2\text{H}/^1\text{H}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ratios. SIGN meeting, Rostock, 29.-30. September **2000**.
- [2] Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Flavour authenticity studies by multi-element HRGC-IRMS techniques for determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  and  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratios. 1<sup>st</sup> French Meeting on Stable Isotopes - 1<sup>st</sup> French Meeting on Environmental Chemistry, Nancy, 13.-15. Dezember **2000**.



## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN

*Name:* Bernhard Weckerle  
*Anschrift:* Von-Paris-Str. 10, 86159 Augsburg  
*Familienstand:* ledig  
*Staatsangehörigkeit:* deutsch  
*Geburtsdatum:* 29.11.1972  
*Geburtsort:* Augsburg  
*Eltern:* Paul Weckerle, Hotelkaufmann  
 Gertraud Weckerle, geb. Guggemos, Bankkauffrau

### AUSBILDUNG

*Schulausbildung:* 1979-1983: Grundschule am Eichenwald, Neusäß  
 1983-1992: Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg  
 Juli 1992: Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

*Zivildienst:* 07/1992-09/1993: Sozialstation Augsburg-Pfersee, Stadtbergen

*Hochschulausbildung:* 11/1993-12/1997: Studium der Lebensmittelchemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
 10/1995: Lebensmittelchemische Vorprüfung  
 12/1997: Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

*Auslandspraktikum:* 01/1998-03/1998: ETS Laboratories, Napa Valley, CA, USA

*Seit 05/1998:* Wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
 05/1998-07/1999: Studenten- und Praktikumsbetreuung, Erstellung von Vorlesungsskripten  
 08/1999-10/2001: Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit



## Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Instrumentell-analytische Techniken zur Charakterisierung von Naturstoffen aus Rucola (*Eruca sativa* Mill.) und Rohkaffee (*Coffea arabica*)“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

(Bernhard Weckerle)