



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik

Strukturchemische und sensorische Charakterisierung
von Guaiansesquiterpenlactonen in Chicorée (*Cichorium
intybus L. var. foliosum Hegl*) und C₁₇₋₂₁-Oxylipinen in
Avocado (*Persea americana Mill. cv. Hass*)

Andreas Georg Degenhardt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Th. F. Hofmann

2. Univ.-Prof. Dr. M. Rychlik

Die Dissertation wurde am 11.10.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt am 09.02.2012 angenommen.

Für meine Eltern, meinen Bruder und meine Ehefrau

Vorwort

Am 1. Februar 2005 begann ich – Andreas Degenhardt – unter der Leitung meines Doktorvaters Professor Dr. Thomas Hofmann am *Institut für Lebensmittelchemie* der *Westfälischen Wilhelms-Universität Münster* mit der Durchführung des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit. Ohne die Empfehlung von Professor Dr. Armin Mosandl, Leiter des *Instituts für Lebensmittelchemie* der *Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*, hätte ich meinen Doktorvater niemals kennen gelernt bzw. hätte ihm niemals an den *Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik* an die *Technischen Universität München* folgen können, wo ich ab dem 1. Oktober 2007 als Wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig war. Nach insgesamt 40 Monaten endete am 31. Mai 2008 die Generierung der Daten dieser Arbeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Professor Hofmann für die Überlassung dieser interessanten Thematik, für die Bereitstellung der hervorragenden Forschungsinfrastruktur, seine intensive Betreuung sowie für seine zahlreichen Ideen, welche diese Arbeit maßgeblich zu dem gemacht haben, was sie ist: das Ergebnis harter, langer und erfolgreicher Arbeit. Der mindestens gleiche Anteil Dankbarkeit gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne deren Rückhalt und großzügige Unterstützung ich diese Arbeit nicht hätte anfertigen können. Mein Dank gilt im Weiteren all denen, die die technischen Voraussetzungen der Analytik erfüllt haben; die mir mit Rat und Tat konstruktiv zur Seite standen; die mir ihre Zungen für sensorische Experimente zur Verfügung gestellt haben; die mich immer wieder motiviert haben; die mir bei Problemen mit offenen Ohren und offenem Herzen beistanden sowie all denen, die dazu beigetragen haben, dass mir diese Zeit in angenehmer Erinnerung bleiben wird.

Herzlichen Dank.

Publikationen

Degenhardt, A. G.; Hofmann, T. (2010) Bitter-Tasting and Kokumi-Enhancing Molecules in Thermally Processed Avocado (*Persea americana Mill.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(24): 12906-12915.

Degenhardt, A. G.; Neue, K.; Hofmann, T. (2011) Sensory and structural characterization of the bitter-tasting phytochemicals in chicory (*Cichorium intybus L. var. foliosum Hegl*). In: *Advances and Challenges in Flavor Chemistry and Biology* (Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Schieberle, P.), DFA Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising, ISBN 978-3-938896-38-9: 352-356.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biochemie des Bittergeschmacks	2
1.2	Chicorée	5
1.2.1	Kulturgeschichte und Anbau	5
1.2.2	Kenntnisstand zu Bitterstoffen im Chicorée.....	8
1.3	Avocado.....	13
1.3.1	Kulturgeschichte und Anbau	13
1.3.2	Kenntnisstand zu den Bitterstoffen in der Avocado	20
2	Ziele der Arbeit	23
3	Ergebnisse	25
3.1	Bitterstoffe im Chicorée (<i>Cichorium intybus L. var. foliosum Hegi</i>)	25
3.1.1	Aktivitätsorientierte Identifizierung von Bitterstoffen im Chicorée	25
3.1.2	Psychophysikalische Evaluation gereinigter Chicorée-Bittersstoffe	56
3.1.3	Quantitative Analyse bitterer Sesquiterpenlactone im Chicorée	62
3.1.4	Quantitative Analyse bitterer Guaianesquiterpenlactone in Korbblütlern	66
3.1.5	Diskussion	70
3.2	Bitterstoffe in der Avocado (<i>Persea americana Mill. cv. Hass</i>)	73
3.2.1	Einfluss der thermischen Verarbeitung auf das Geschmacksprofil von Avocadofruchtfleisch.....	73
3.2.2	Aktivitätsorientierte Fraktionierung von erhitzter Avocadopulpe	75
3.2.3	Sensorische Charakterisierung identifizierter Avocado-Inhaltsstoffe	84
3.2.4	Konzentrationen und Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren der Verbindungen 1-12 in frischer und erhitzter Avocadopulpe	89
3.2.5	Rekonstruktion der Bitterkeit in frischer Avocadopulpe	92
3.2.6	Zeitabhängige Entwicklung von Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren ausgewählter Geschmacksstoffe während der Erhitzung von Avocadopulpe ...	93
3.2.7	Diskussion	95
4	Experimenteller Teil	99
4.1	Materialien und Reagenzien	99
4.1.1	Untersuchungsmaterialien	99
4.1.2	Reagenzien.....	100
4.1.3	Verbrauchsmaterialien	101
4.2	Chicorée – Vorbereitung und Durchführung von Analysen.....	102
4.2.1	Gravimetrische Bestimmung des Trockenmasse- und des Wassergehaltes ..	102
4.2.2	Sequenzielle Extraktion und sensorische Bewertung der Extrakte	102
4.2.3	Untersuchung der Chicorée-Fractionen mittels RP-HPLC-DAD	103
4.2.4	Isolierung der Inhaltsstoffe der Chicorée-Fractionen mittels HPLC	105
4.2.5	Enzymatische Konformationsbestimmung von β -Glucose.....	107

4.2.6	Geschmacksverdünnungsanalyse Chicorée-EtAc-Fraktion B.....	108
4.2.7	Geschmacksverdünnungsanalyse der Chicorée-Wasserfraktion C	108
4.2.8	Bestimmung der Bitterschwellenwerte und Beschreibung der Bittergeschmacksqualitäten	109
4.2.9	Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehungen.....	110
4.2.10	Quantifizierung identifizierter Sesquiterpenlactone im Chicorée mittels HPLC- UV/VIS.....	111
4.2.11	Quantifizierung von Cichoriosid B	112
4.2.12	Quantifizierung identifizierter Sesquiterpenlactone in verschiedenen Regionen im Chicorée-Salatkopf	114
4.2.13	Untersuchung von Korbblütlern auf Chicorée-Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe via RP-HPLC-MS/MS-Multimethode.....	115
4.3	Avocado – Vorbereitung und Durchführung von Analysen	118
4.3.1	Herstellung von Avocadopüree	118
4.3.2	Geschmacksprofilanalyse nativer und erhitzter Avocados.....	118
4.3.3	Gravimetrische Bestimmung des Trockenmasse- und des Wassergehaltes ..	118
4.3.4	Evaluation der Bitterkeit in Abhängigkeit von der Temperatur und der Erhitzungsdauer.....	119
4.3.5	Sequenzielle Extraktion und sensorische Bewertung der Extrakte	119
4.3.6	Untersuchung der aus erhitzter Avocadopulpe gewonnenen Fraktion B mittels RP-HPLC-UV/VIS-ELSD.....	121
4.3.7	Isolierung der Inhaltsstoffe der Fraktion B mittels präparativer HPLC.....	122
4.3.8	Geschmacksverdünnungsanalysen der Fraktion B	123
4.3.9	Erhitzte Avocadopulpe – Schwellenwertbestimmungen der Inhaltsstoffe der Fraktion B sowie von Monoglyceriden und weiteren Derivaten.....	125
4.3.10	Quantifizierung der identifizierten Inhaltsstoffe 1-12.....	126
4.3.11	Durchführung des Experiments zur Rekonstruktion der Bitterkeit in frischem Avocadopüree.....	130
4.4	Experimente der Kernresonanzspektroskopie (NMR) zur Strukturidentifizierung geschmacksaktiver Verbindungen.....	131
4.4.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	131
4.4.2	¹ H- ¹ H-Verschiebungskorrelation (COSY)	131
4.4.3	Heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (HMQC)	132
4.4.4	Heteronucleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC)	132
4.4.5	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT).....	132
4.5	Verwendete mathematische Operationen – Formelverzeichnis.....	133
4.5.1	Berechnung des Trockenmassegehaltes	133
4.5.2	Berechnung des Wassergehaltes.....	133
4.5.3	Berechnung des arithmetischen Mittels (Mittelwert)	133
4.5.4	Berechnung der Standardabweichung	134
4.5.5	Berechnung des geometrischen Mittels.....	134
4.5.6	Berechnung von Responsefaktoren	135
4.5.7	Berechnung von Konzentrationen über IS-Peakflächen	135
4.5.8	Berechnung der DoT-Faktoren.....	136
4.6	Sensorische Analysen.....	137
4.6.1	Durchführende Personen – Sensorikpanel.....	137

4.6.2	Geschmacksprofilanalyse	138
4.6.3	Geschmacksverdünnungsanalyse	138
4.6.4	Triangeltest (Dreieckstest)	138
4.6.5	Half-Mouth-Test	138
4.6.6	Schwellenwertbestimmung	139
4.6.7	Dosis-Wirkungskurven	139
5	Spektroskopische Daten zu identifizierten Geschmacksstoffen	141
5.1	Verbindungen aus Chicorée.....	141
5.1.1	<i>11β,13-Dihydrolactucin</i> (1)	141
5.1.2	<i>Lactucin</i> (2)	142
5.1.3	<i>8-Desoxylactucin</i> (3)	142
5.1.4	<i>11β,13-Dihydro-8-desoxylactucin</i> (4).....	143
5.1.5	<i>Lactuopicrin</i> (5)	144
5.1.6	<i>Cichoriosid B</i> (6)	145
5.1.7	<i>Cichoriensäure</i> (7)	146
5.2	Verbindungen aus Avocado	147
5.2.1	<i>1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in</i> (1)	147
5.2.2	<i>1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en</i> (2)	147
5.2.3	<i>1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in</i> (3)	148
5.2.4	<i>1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en</i> (4)	149
5.2.5	<i>1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en</i> (5).....	149
5.2.6	<i>1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan</i> (6)	150
5.2.7	<i>1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en</i> (7)	151
5.2.8	<i>(Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien</i> (8).....	151
5.2.9	<i>(Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien</i> (9)	152
5.2.10	<i>(Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien</i> (10).....	153
5.2.11	<i>1-Linoleoylglycerol</i> (11)	154
5.2.12	<i>1-Stearoylglycerol</i> (12)	155
6	Zusammenfassung	157
7	Abbildungsverzeichnis.....	161
8	Tabellenverzeichnis.....	165
9	Literaturverzeichnis.....	167
	Lebenslauf.....	175

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
APCI	(<i>engl.</i>) Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AU	(<i>engl.</i>) Absorption Units
Bd.	Band
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CE	(<i>engl.</i>) Collision Energy [eV]
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CoA	Coenzym A
COSY	(<i>engl.</i>) Correlated Spectroscopy
cv.	(<i>engl.</i>) Cultivar, (<i>deutsch</i>) Kulturvarietät oder Sorte
CXP	(<i>engl.</i>) Cell Exit Potential [eV]
<i>d</i>	deutert
DAD	(<i>engl.</i>) Diode Array Detector
DEPT	(<i>engl.</i>) Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DoT	(<i>engl.</i>) Dose over Threshold, (<i>deutsch</i>) Dosis(faktor) über der Schwellenwertkonzentration oder Geschmacksaktivitätswert (GAW)
DP	(<i>engl.</i>) Declustering Potential [eV]
ECU	Ecuador
ELSD	(<i>engl.</i>) Evaporative Light Scattering Detector
<i>engl.</i>	englisch, englische Abkürzung/ Bezeichnung/ Sprache
ES	Externer Standard, externe Standardverbindung
ESI	(<i>engl.</i>) Electron Spray Ionization
ESP	Spanien
EtAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
et al.	(<i>lateinisch</i>) et alii, et aliae, (<i>deutsch</i>) und andere
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FAO	(<i>engl.</i>) Food and Agriculture Organization (of the United Nations)

F. H. Wigg.	Friedrich Heinrich Wiggers (deutscher Botaniker)
FID	Flammenionisationsdetektor
FRA	Frankreich
g	Gramm
GAW	Geschmacksaktivitätswert
GC	Gaschromatographie
GER	Deutschland
Glc	β -D-Glucose
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GVA	Geschmacksverdünnungsanalyse
GVF	Geschmacksverdünnungsfaktor
h	(<i>engl.</i>) hour, (<i>deutsch</i>) Stunde
Hegi	Gustav Hegi (schweizerischer Botaniker)
HMBC	(<i>engl.</i>) Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	(<i>engl.</i>) Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	(<i>engl.</i>) High-Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IS	Interner Standard
ISR	Israel
IUPAC	(<i>engl.</i>) International Union of Pure and Applied Chemistry
kg	Kilogramm
l	Liter
L.	Carl von Linné (schwedischer Botaniker)
LC	(<i>engl.</i>) Liquid Chromatography
Ltd.	(<i>engl.</i>) Limited Company
m	Meter
M	Molarität [mol/l]; (absolute) Molekülmasse [g/mol]
MA	Massachusetts
MeOH	Methanol
MEX	Mexiko
mg	Milligramm
MG	Monoglycerid
μ l	Mikroliter
MHz	Megahertz
Mill.	Philip Miller (englischer Botaniker)
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Mol (Stoffmenge)
Mrd.	Milliarden
MRM	(<i>engl.</i>) Multiple Range Monitoring
MS	(<i>engl.</i>) Mass Spectrometry, Mass Spectrometer
n. Chr.	nach Christi Geburt
n. d.	nicht detektierbar
nm	Nanometer
NMR	(<i>engl.</i>) Nuclear Magnetic Resonance
ODS	Octadodecylsulfat
o. g.	oben genannte
<i>p</i>	para
PA	Pennsylvania
p. A.	(<i>lateinisch</i>) pro analysi, (<i>deutsch</i>) für die Analyse
PER	Peru
pH	(<i>lateinisch</i>) potentia hydrogenii
ppm	(<i>engl.</i>) Parts per million
psi	(<i>engl.</i>) Pound-force per square inch, (<i>deutsch</i>) Pfund pro Quadrat- zoll
RP	(<i>engl.</i>) Reversed Phase, (<i>deutsch</i>) Umkehrphase
RSA	Südafrika
RT	(<i>engl.</i>) Retention Time, (<i>deutsch</i>) Retentionszeit [min]
s	Sekunde
SPE	(<i>engl.</i>) Solid-phase extraction, (<i>deutsch</i>) Festphasenextraktion
SUI	Schweiz
TM	Trockenmasse
TMS	Tetramethylsilan
U	(<i>engl.</i>) Unit, (<i>deutsch</i>) Enzymaktivität; Umdrehungszahl
UN	(<i>engl.</i>) United Nations
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV/VIS	(<i>engl.</i>) Ultraviolett/Visible (Spectroscopy)
V	Volumen; Volt
var.	(<i>engl.</i>) Variety, (<i>deutsch</i>) Varietät
v. Chr.	vor Christi Geburt
vgl.	vergleiche

vs.	(<i>lateinisch</i>) versus, (<i>deutsch</i>) gegen, gegenübergestellt
V/V	(<i>engl.</i>) Volume to Volume, (<i>deutsch</i>) Volumenanteil [%] zu Volumenanteil [%]
WHO	(<i>engl.</i>) World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
1D	eindimensional
2D	zweidimensional

Symbole

Å	Ångström (Längeneinheit)
δ	Chemische Verschiebung [ppm]
Ø	Durchmesser, Kaliber
[]	Einheit (einer Messgröße)
J	Kopplungskonstante [Hz]
(+/-)	Positiver/negativer Ionisierungsmodus
%	Prozent
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung; Massenübergang
λ	Wellenlänge [nm]
Ω	Elektrischer Widerstand

Erläuterungen

Die Bezeichnung „Chicorée“ steht, wenn nicht anders angegeben, für den durch Treiben im Dunkeln gewonnenen gebleichten Blattkopf der Zichorie (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegl).

Die Bezeichnung „Avocado“ bezieht sich, wenn nicht anders angegeben, auf das pürierte Fruchtfleisch der Avocadosorte „Hass“ (*Persea americana* Mill. cv. *Hass*).

Die Literaturhinweise sind unter Aufführung des erstgenannten Autors mit der Bezeichnung „et al.“ – als Synonym für alle weiteren beteiligten Autoren – und des Erscheinungsjahres in Klammern angegeben und im Literaturverzeichnis vollständig hinterlegt.

Orthografie und Grammatik entsprechen dem „Duden – Die deutsche Rechtschreibung“, 24. Auflage, Dudenverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich 2006.

Aufgrund ihrer komplexen Strukturen werden die in der Arbeit beschriebenen Substanzen nicht entsprechend der IUPAC-Nomenklatur, sondern mit den in der Fachliteratur üblichen Trivialnamen bezeichnet.

Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz „®“ versehen.

1 Einleitung

Der Geschmackssinn ist die einzige Sinnesleistung, welche vom Menschen fast stets gezielt stimuliert werden kann. Die Wahrnehmungen über Auge, Nase, Haut und Ohr lassen sich häufig nicht von uns beeinflussen. Da ein Mensch aber frei entscheiden kann, was er isst oder trinkt, sind unsere Geschmacksrezeptoren jene Sinneszellen, welche wir intendiert reizen können – und wir tun es durch die bewusste Wahl der von uns aufgenommenen Lebensmittel. Alle Kulturen haben daher eine Küche bzw. Kochkunst entwickelt, um der täglichen Nahrung einen anregenden Geschmack zu verleihen. Mit dem technischen Fortschritt haben sich daraus sogar Industrien und Forschungszweige wie die Lebensmitteltechnologie oder die Lebensmittelchemie entwickelt.

Wie bedeutend der Geschmack ist, zeigt die Tatsache, dass ein Lebensmittel erst dann als gelungen angesehen wird, wenn es einen bestimmten Geschmack entfaltet. Ernährungsbiologisch müsste allerdings ein Nahrungsmittel mit höherem Nährwert (Mineralstoff-, Vitamingehalt etc.) stets gegenüber einem mit besserem Geschmack bevorzugt werden. Dass dem nicht so ist, illustrieren bspw. Kinder, die süßere Speisen gegenüber Gemüse präferieren. Die Lebensmittelindustrie hat diesen Sachverhalt erkannt. Die Erforschung, der Gebrauch und die Suche nach „neuen“ – natürlichen, naturidentischen oder künstlichen – Geschmacksstoffen sind daher einer der wichtigsten Zweige dieser Industrie. Die vorliegende Dissertation will sich diesem Gebiet am Beispiel der Bitterkeit widmen. Die Bitterkeit als eine der fünf Geschmacksrichtungen soll dabei in ausgesuchten Pflanzen – Avocado und Chicorée – näher untersucht werden. Wie entsteht die Bitterkeit in diesen Pflanzen? Durch was wird sie beeinflusst? Diese Fragen sollen in der vorliegenden Dissertation diskutiert und beantwortet werden. Als Grundlage wurden dabei instrumentell-analytische und human-sensorische Verfahren durchgeführt, deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden.

1.1 Biochemie des Bittergeschmacks

Der bittere Geschmack ist ein Geschmackssinn bzw. eine gustatorische Wahrnehmung, welche der Kontrolle und der Bewertung der Nahrung dient.

Als Bitterstoffe werden alle chemischen Verbindungen bezeichnet, die einen bitteren Geschmack auslösen. Dabei sind Bitterstoffe wie das Alkaloid Coffein beim Genuss von Kaffee oder Hopfenbitterstoffe in Bier akzeptiert und geradezu erwünscht. Andererseits sind bestimmte pharmakologisch wirksame Substanzen derartig bitter, dass diese nur in Gegenwart von Zucker oder anderen stark süßenden Substanzen als Medikamente verabreicht werden können. In einer weiteren Anwendungsform werden Bitterstoffe gezielt eingesetzt, um das versehentliche Verschlucken von gesundheitsschädigenden Verbindungen zu verhindern. So dient beispielsweise Denatoniumbenzoat, eine der am bittersten schmeckenden Substanzen, der Vergällung von Ethanol, sodass der Alkohol nicht mehr für den menschlichen Genuss geeignet ist.



Abbildung 1: Der bittere Geschmack (Adriaen Brouwer, 1605/06-1638). Bildnachweis: Mit freundlicher Genehmigung durch das Städelsche Kunstinstitut, Frankfurt am Main, Deutschland 2010.

Die Wahrnehmung der Bitterkeit erfolgt nach Wechselwirkung von Bitterstoff und Geschmacksrezeptorproteinen, welche in den Membranen der Geschmacksrezeptorzellen lokalisiert sind (Behrens et al. 2008). Die Geschmacksrezeptorzellen sind in sogenannten Geschmacksknospen angeordnet, die sich auf der Zunge in den Geschmackspapillen sowie auf den Schleimhäuten der Mundhöhle befinden. Darüber hinaus wurden Geschmacksknospen auf dem weichen Gaumen (Velum palatinum), Kehldeckel (Epiglottis), Kehlkopf (Larynx) und im Schlund (Pharynx) nachgewiesen (Behrens et al. 2008). Eine Geschmacksknospe besteht aus 50-150 Geschmacksrezeptorzellen (Lindemann 2001; Chandrashekar et al. 2006). Die auf der Zunge angeordneten Papillen sind gemäß ihrer Form nach Wall-, Blätter-, Pilz- und Fadenpapillen unterteilt. Die Pilzpapillen (*Papillae fungiformes*) sind auf den vorderen zwei Dritteln der menschlichen Zungenoberfläche lokalisiert, die Wallpapillen (*Papillae vallate*) und die Blätterpapillen (*Papillae foliate*) befinden sich im hinteren Drittel des Zungenrückens, Letztere an den äußeren Zungenrändern. Die Fadenpapillen (*Papillae filiformes*) dienen ausschließlich der Beurteilung mechanischer Eigenschaften aufgenommenener Lebensmittel und enthalten daher keine Geschmacksknospen (Chandrashekar et al. 2006).

Die Rezeptorzellen innerhalb der Geschmacksknospen sind nach morphologischen Kriterien in vier verschiedene Typen, genannt Typ I-IV, klassifiziert. Zellen der Typen I-III sind an der Oberfläche, Zellen des Typs IV auf dem Grund der Geschmacksknospen lokalisiert. Somit können Zellen der Typen I-III mit Geschmacksstoffen in Wechselwirkung treten und gelten somit als Geschmacksrezeptorzellen, in der englischen Sprache als „Taste Receptor Cells“ (TRCs) bezeichnet. Die bislang größte Anzahl identifizierter TRCs gehören dem Typ II an, gefolgt von einer geringeren Anzahl TRCs vom Typ III. Zur Wahrnehmung der Bitterkeit sind ca. 25 verschiedene Rezeptoren bekannt (Meyerhof 2005). Gemäß ihrer genetischen Codierung werden diese in sogenannte Genfamilien eingeteilt, wie bspw. nach der TAS2R-Nomenklatur von Bufe et al. (2002). Ein Bitterstoff kann unter Umständen jedoch mehrere Rezeptoren aktivieren, im Gegenzug kann ein Rezeptor mitunter durch verschiedene Bitterstoffe aktiviert werden. So bildet z. B. die Expression des „*hTAS2R46*“-Rezeptors, der menschliche Hauptrezeptor für Bitterkeit, die chemosensorische Grundlage für die Bitterkeit von Sesquiterpenlactonen (Brockhoff et al. 2007). Die bekannten menschlichen (humanen) TAS2R-Gene sind dabei auf den Chromosomen 5, 7 und 12 lokalisiert. Das *hTAS2R1*-Gen ist als einzige Ausnahme im Chromosom 5 codiert,

während alle weiteren hTAS2R-Gene in dichten Aggregationen in den Chromosomen 7 und 12 verschlüsselt vorliegen (Behrens et al. 2006).

Die Entstehung der elektrochemischen Reizsignale, die letztendlich im Gehirn in der Geschmackserkennung münden, werden durch die an die Geschmacksrezeptorzellen gekoppelten G-Proteine initiiert. Chandrashekar et al. (2006) beschrieben die resultierende intrazelluläre Signalkaskade folgendermaßen: An die G-Protein-gekoppelten Rezeptorzellen ist das heterotrimere G-Protein Gustducin gebunden. Die Bindung von Bitterstoffen an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zur Dissoziation des Gustducins in die α -Untereinheit und in ein β - γ -Dimer. Diese aktivieren die Phospholipase C β 2 (PLC β 2), die in der Zellmembran befindliches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) in die beiden Sekundärbotenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert. IP $_3$ bewirkt durch Öffnung von IP $_3$ -gesteuerten Calciumkanälen des Endoplasmatischen Reticulums die Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration. Das hat die Öffnung von TRPM5-Kanälen („Transient Receptor Potential Protein M5“) und die Depolarisation der Geschmackszelle zur Folge. Dabei kommt es durch die TRCs zur Ausschüttung von Adenosintriphosphat (ATP), einem Neurotransmitter (Behrens et al. 2008), woraufhin ein Aktionspotential bzw. ein elektrochemisches Reizsignal entsteht. Unabhängig, ob bitter, süß, sauer, salzig oder umami, werden die verschlüsselten Reizsignale der einzelnen Geschmacksqualitäten in der Zelle in neutrale elektrochemische Signale transformiert und über Neurotransmitter an den Synapsen, ansonsten über ionenvermittelte Aktionspotentiale zum Gehirn geleitet und verarbeitet. Der Mechanismus der Signalübertragung von den Geschmacksrezeptorzellen auf die afferenten Nerven zur Weiterleitung in das Gehirn ist jedoch noch ungeklärt.

1.2 Chicorée

1.2.1 Kulturgeschichte und Anbau

„Chicorée“, auch unter den Synonymen „Salatzichorie“, „Bleichzichorie“, „Treibzichorie“ und „Brüsseler Salat“ (LWG 2007) bekannt, ist der durch Treiben im Dunkeln gebleichte Blattkopf einer Kulturform zur Blattnutzung (*var. foliosum*) der Zichorie, stellt eine Kulturvarietät der Gemeinen Wegwarte (*Cichorium intybus L.*) dar und gehört zu der Pflanzenfamilie der Asteraceae bzw. der Korbblütengewächse (**Abbildung 2**).



Abbildung 2: Chicorée (*Cichorium intybus L. var. foliosum* Heg)

Eine weitere Kulturvarietät ist die Kulturform zur Wurzelnutzung (*var. sativum*), deren geröstete Wurzel als Kaffee-Ersatz verwendet wird (Körber-Grohne 1995; Die Zeit 2005). Die Gemeine Wegwarte bildet eine Rübe aus, die im Durchschnitt 15 cm lang und 3 bis 5 cm dick ist (Franke 1997). Die Salatblätter sind hellgrün und weiß, bei längerer Lagerung werden sie rot-fleckig. Die Wegwarte wächst an trockenen, sonnigen Stellen und ist von Mitteleuropa bis Westsibirien, Vorder- und Mittelasien, im Mittelmeergebiet und in Nordafrika verbreitet (Körber-Grohne 1995).

Ursprüngliche Herkunftsregionen der Gemeinen Wegwarte sind die Gebiete des Balkans sowie Kleinasien, gegenwärtige Kultivierungsregionen des Chicorées sind Europa, Südwestasien, die östlichen USA, Teile Nordostafrikas, Südafrika, Australien und Neuseeland (**Abbildung 3**).

Die Kulturgeschichte der Gemeinen Wegwarte geht bis in die Zeit der alten Griechen und Römer zurück. Sie kultivierten die Pflanze seit etwa 300 v. Chr., um sie als Heil- und Gemüsepflanze einzusetzen. Neben den Blättern, die als Salat dienten, nutzte

man in der Antike die Stängel, Blüten, Samen und Wurzeln als Infusionen für pharmazeutische Anwendungen (Schmiedeberg 1912).

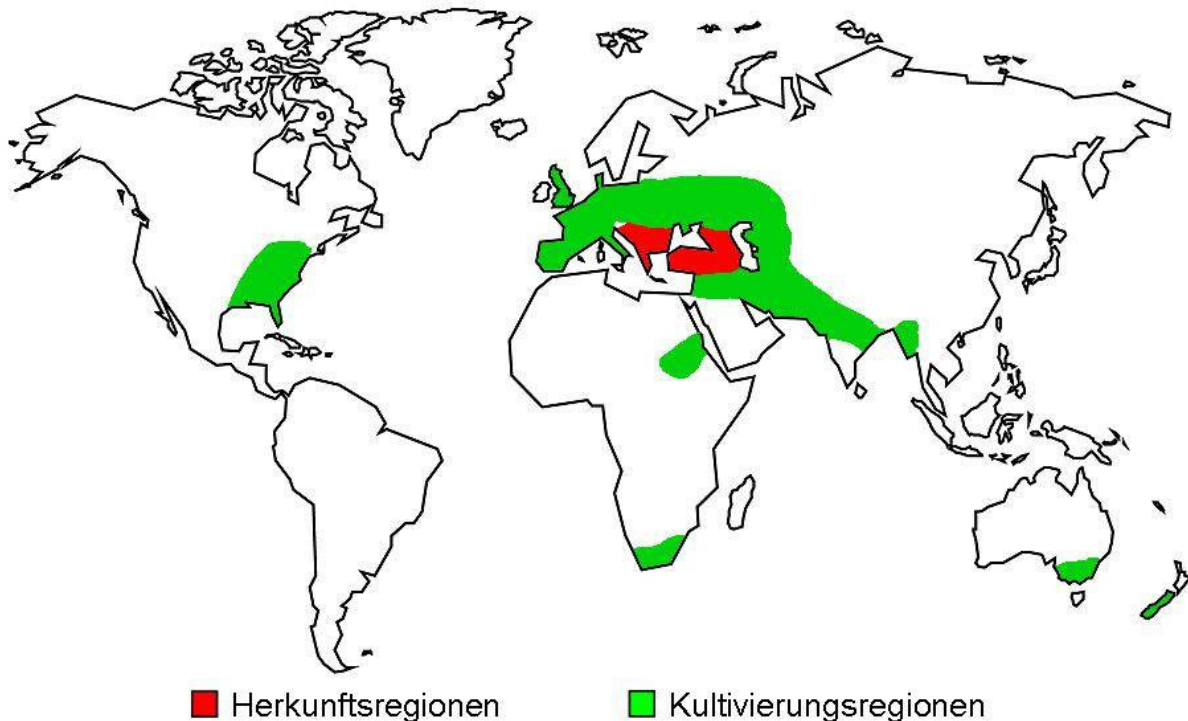


Abbildung 3: Herkunfts- und Kultivierungsregionen der Gemeinen Wegwarte (Universität Hamburg 2006). Bildnachweis: Mit freundlicher Genehmigung durch Paul von Sengbusch, Heide, Deutschland 2009.

Im Mittelalter verwendeten die Araber die Wegwarte als Arznei- und Nahrungsmittel. In Europa wurde sie als Medizin und als „Zaubertrank“, ein Getränk mit psychosomatischer Wirkung, verwendet (Leclercq 1992). So ist aus dem Jahre 1666 bekannt, dass Wegwarte als Zutat für Abführmittel Verwendung fand (Wolf 1666). Darüber hinaus wurde die Gemeine Wegwarte seit Ende des 17. Jahrhunderts zur Herstellung von Zichorienkaffee verwendet. Die Wurzeln wurden hierfür geröstet, anschließend gemahlen und dienten als Kaffee-Ersatz. Auch während des Zweiten Weltkrieges wurde in Deutschland die Zichorienwurzel in großen Mengen als Kaffee-Ersatz verwendet, da echter Kaffee aufgrund von mangelnden Importmöglichkeiten sehr teuer war.

Die Entwicklung des Chicorées von der Zichorie bis zur heutigen Salatzichorie ist geschichtlich nicht genau definiert. Diesbezüglich gibt es drei verschiedene Überlieferungen.

Die erste Überlieferung besagt, dass Monsieur Brézier, ein Chefgartenbauer am Botanischen Garten in Brüssel, die ersten Chicorées 1846 zog. Er ließ demnach die Wurzeln von *Cichorium intybus* L. im Freiland wachsen. Bei der Sprossung verhüllte er die Pflanzen jedoch lichtdicht, damit diese möglichst wenige Bitterstoffe entwickeln konnten. Aufgrund der Dunkelheit blieben die Blätter bleich (Schäfer 2006).

Eine andere Version beschreibt, dass die Art des Treibens auf eine zufällige Beobachtung zurückgeht. Demnach haben belgische Bauern im Jahr 1870 ihre Zichorienwurzeln aufgrund einer ungewöhnlich hohen Ernte im Gewächshaus gelagert. Im darauf folgenden Winter entdeckten sie, dass die Wurzeln kräftige Knospen ausgebildet hatten (Franke 1997).

Die dritte Überlieferung geht zurück in die revolutionären Zeiten um 1830 und stammt wiederum aus Belgien. Die Zichorienwurzel wurde zu dieser Zeit speziell zur Verwendung als Kaffee-Ersatz gezüchtet. Da die Bauern in dieser Zeit Angst hatten, ihre Wurzeln abliefern zu müssen, versteckten sie diese durch Abdecken mit Erde. Die weißen Blätter sollen später zufällig entdeckt worden sein (Schäfer 2006).

Auch wenn die drei Überlieferungen deutlich voneinander abweichen, so scheint jedoch festzustehen, dass die Entstehung des ersten Chicorées im Belgien des 19. Jahrhunderts stattfand.

Die Chicorée-Produktion erfolgt heute in vier Stufen (Schäfer 2006): In der ersten Stufe wird die Chicorée-Wurzel erzeugt, indem das Chicorée-Saatgut im Mai im Freiland ausgesät und zwischen September und November geerntet wird. In der zweiten Produktionsstufe werden die Wurzeln in Kühlräumen eingelagert. Dort herrschen Temperaturen zwischen -1 bis +3 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95 bis 97 %. Die Lagerzeit kann zwischen einer Woche und acht Monaten betragen. Dadurch ist eine ganzjährige Chicorée-Produktion gewährleistet. Im dritten Schritt folgt das Treiben der Wurzeln. Die Wurzeln werden aufrecht in Kunststoffkisten gelegt und dann in lichtdichten Räumen aufgestellt. Innerhalb von 20 bis 25 Tagen treibt der unbedeckte Chicorée bei Raumtemperatur und regelmäßiger Zufuhr von Nährstofflösung und Wasser aus. Die Dunkelheit bewirkt, dass die Pflanze kein Chlorophyll ausbildet, wodurch die erwünschte blasse Farbe des Chicorées erhalten bleibt. Zum Schluss erfolgt das „Brechen“, das heißt die Trennung des Salats von der Wurzel sowie das anschließende Reinigen, Sortieren und Verpacken.

Chicorée wird geschätzt wegen seines feinen bitteren Geschmacks. Die Chicorée-Blätter können sowohl roh als Salat sowie gedünstet als Gemüse verzehrt werden. Die Verwendung des Chicorées in roher Form findet hauptsächlich in den USA und in Deutschland statt. In Belgien, Frankreich und den Niederlanden wird er dagegen hauptsächlich gedünstet verzehrt. Das macht sich auch in dem Pro-Kopf-Verbrauch bemerkbar: Dieser lag 2003 im Jahresdurchschnitt in Belgien bei ca. 8,6 kg, in Frankreich bei etwa 3,7 kg und in Deutschland bei 200-400 g (Schäfer 2006).

1.2.2 Kenntnisstand zu Bitterstoffen im Chicorée

Es ist literaturbekannt und auch nachgewiesen, dass Chicorée seinen typischen bitteren Geschmack durch das bittere Sesquiterpenlacton Intybin erhält. Intybin ist eine andere Bezeichnung für den Bitterstoff Lactucopicrin (Schmitt 1940), welcher erstmals 1862 in Lactucarium, dem eingedickten Milchsaft der *Lactuca virosa* L., identifiziert worden ist (Schenk et al. 1937). Ebenfalls aus Lactucarium wurde bereits 1833 der Bitterstoff Lactucin identifiziert (Schenk et al. 1937) und 1953 in Chicorée-Wurzeln nachgewiesen (Zinke et al. 1953). Die Identifizierung von 8-Desoxylactucin erfolgte 1984 (Leclercq 1984; Pyrek 1985), 1990 wurden die bitteren Sesquiterpenlactonderivate 11 β ,13-Dihydrolactucin und 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin als Bitterstoffe der Chicorée-Wurzel beschrieben (Van Beek et al. 1990). Bei den identifizierten Bitterstoffen handelt es sich somit zumeist um Sesquiterpenlactone mit einem Eudesman-, Germacran- oder Guaian-Skelett; zum Letzteren zählt das Lactucopicrin (Leclercq 1992). Die Biosynthese von Guaian-, Germacran- und Eudesmanderivaten postulierte de Kraker 1998 durch den Mevalonat-Farnesyldiphosphat-Germacradien-Bildungsweg (**Abbildung 4**) unter Wirkung der Germacren-Cyclase sowie Germacran-Synthase (de Kraker et al. 1998).

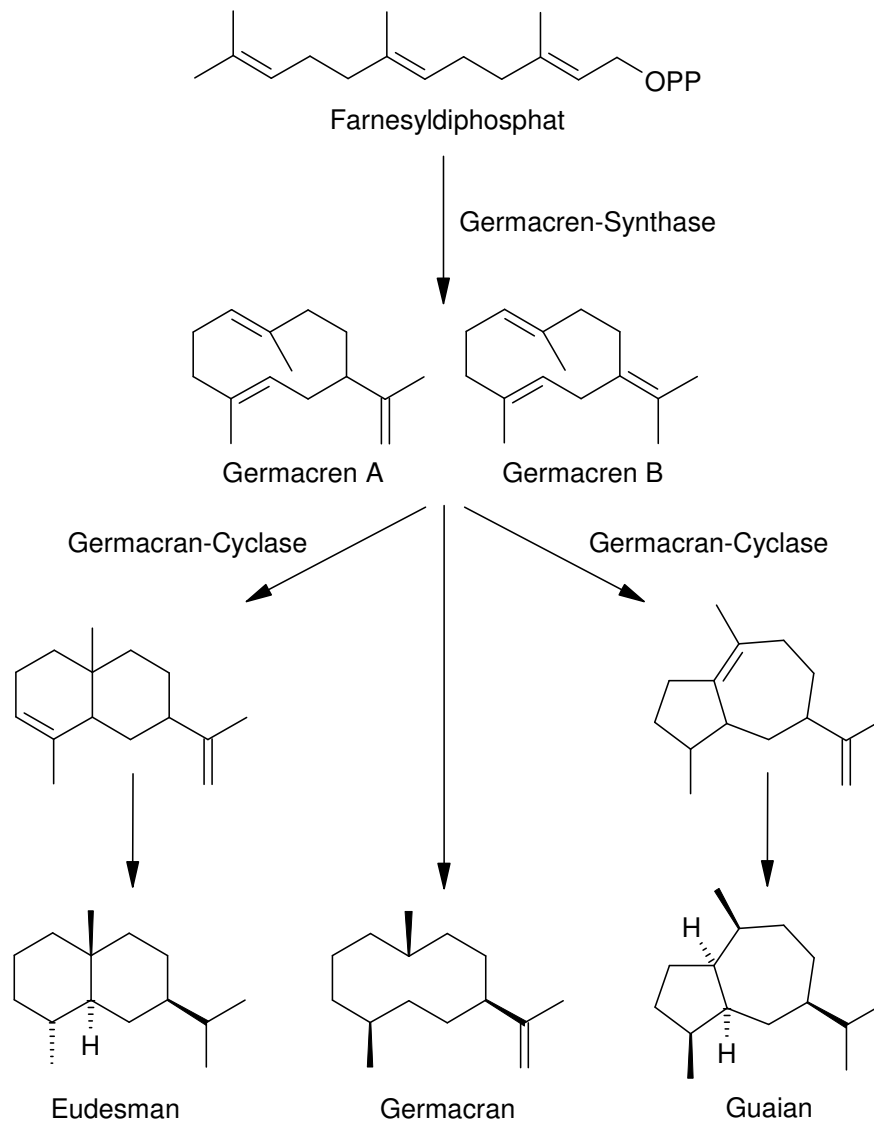


Abbildung 4: Biosynthesewege zur Bildung von Eudesman-, Germacran- und Guaian-Molekülgerüsten aus Farnesyldiphosphat.

Im Jahr 2002 schlug wiederum de Kraker einen Biosyntheseweg vor, wobei die Verbindung (+)-Costunolid als Vorstufe der Chicorée-Sesquiterpenlactone angesehen und ein vierstufiger Bildungsmechanismus postuliert wurde (de Kraker et al. 2002):

In der ersten Stufe zyklisiert Farnesyldiphosphat unter Einfluss von (+)-Germacren-A-Synthase, einer Sesquiterpen-Synthase, zu (+)-Germacren A. In der zweiten Stufe erfolgt durch das Cytochrom-P450-Enzym (+)-Germacren-A-Hydrolase die Hydroxylierung der Isoprenylseitenkette. Während der dritten Stufe läuft die Oxidation von Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-ol über die Aldehydstufe Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-al zur Germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-säure in Gegenwart von NADP(H)⁺-abhängigen Dehydrogenasen ab. Für die vierte Stufe wird die Postulierung einer

Hydroxylierung an der C₆-Position der Germacatrien-12-säure und anschließender Lactonisierung zum (+)-Costunolid vermutet (**Abbildung 5**).

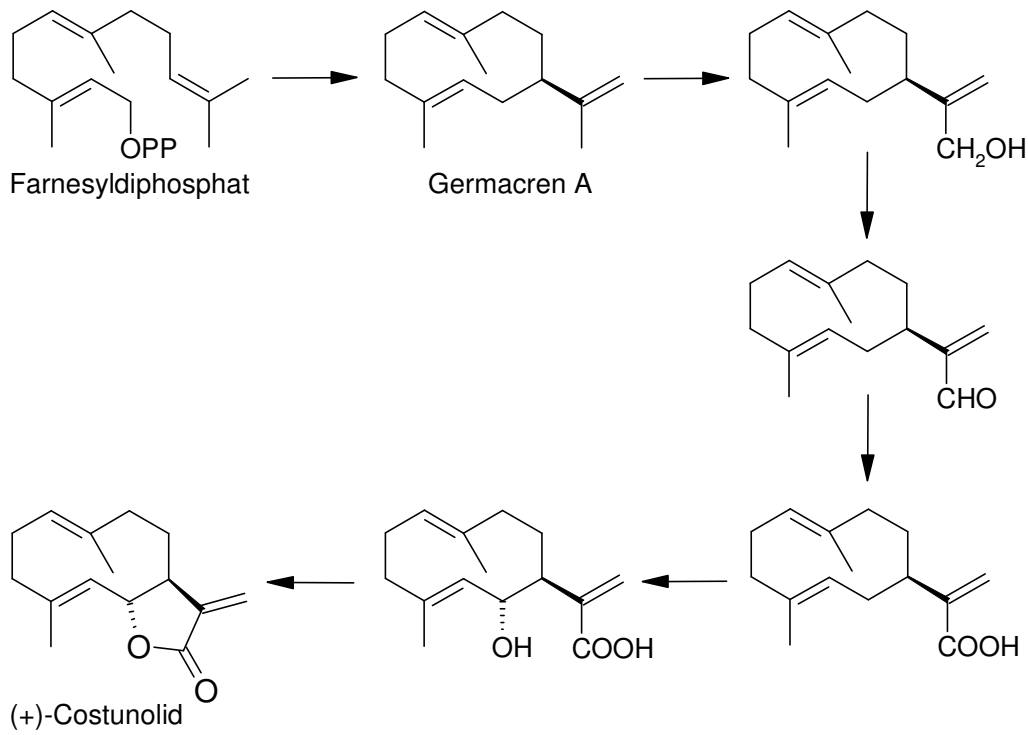


Abbildung 5: Schema zur Bildung von (+)-Costunolid als Vorstufe von Sesquiterpenlactonen in Chicorée.

Aus den Wurzeln von *Cichorium intybus L.* wurden von Seto et al. (1988) mit drei Eudesman- (**Abbildung 6**), drei Germacran- (**Abbildung 7**) und sieben Guaian-Derivaten (**Abbildung 8**) insgesamt 13 Sesquiterpenlactone isoliert und identifiziert. Der Strukturnachweis erfolgte via Massenspektrometrie, Infrarot-Spektrenanalyse sowie ¹H- und ¹³C-Kernresonanzspektroskopie. Bei den glykosidischen Verbindungen wurde zusätzlich eine Hydrolyse durchgeführt. Hierdurch konnten Aglykon und Zucker noch einmal separat nachgewiesen und die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen bekräftigt werden (Nishimura et al. 1986; Seto et al. 1988).

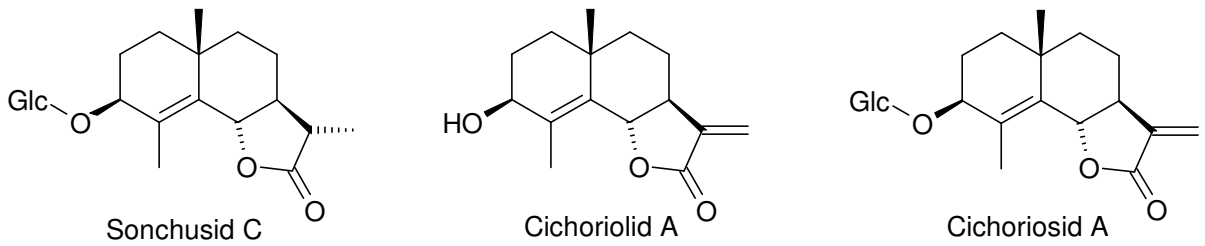


Abbildung 6: Eudesman-Derivate in der Chicorée-Wurzel (Seto et al. 1988).

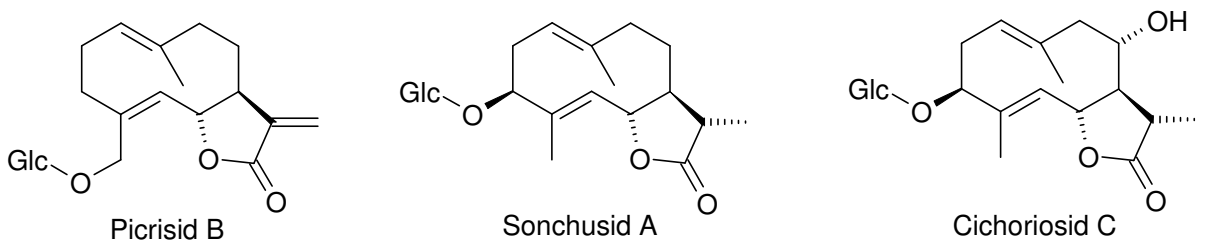


Abbildung 7: Germacran-Derivate in der Chicorée-Wurzel (Seto et al. 1988).

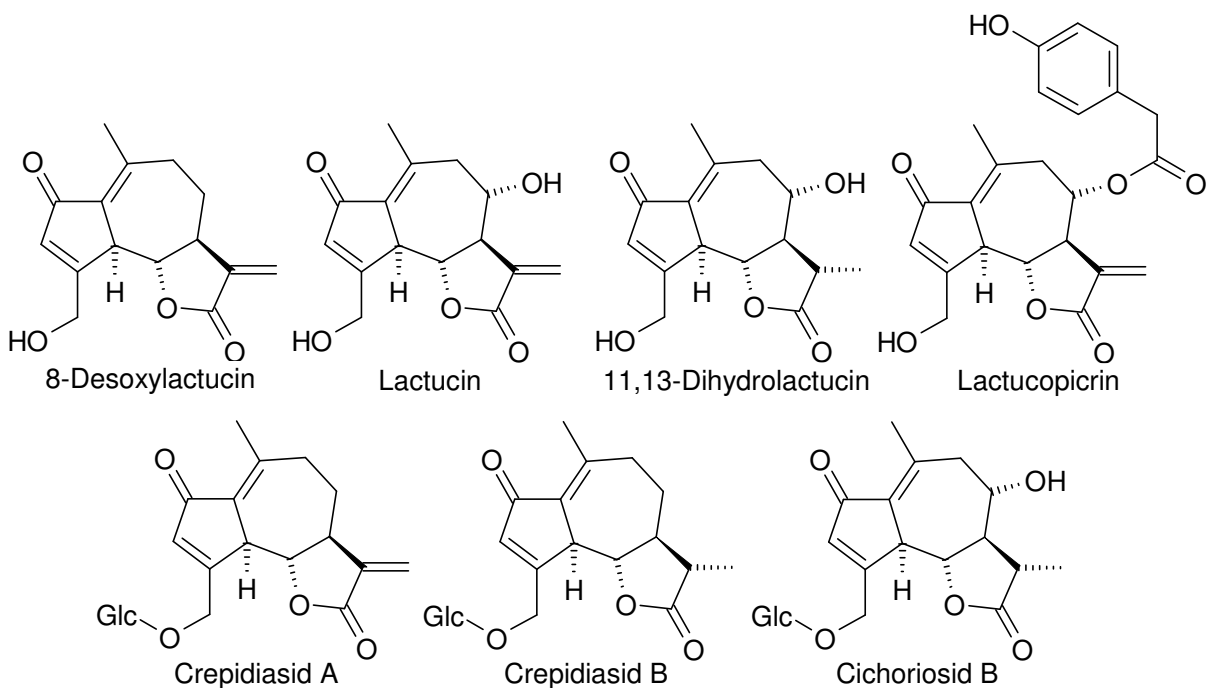


Abbildung 8: Guaian-Derivate in der Chicorée-Wurzel (Seto et al. 1988).

Obwohl die Blätter der Salatzichorie verzehrt werden, wurden der sensorischen Beitrag einzelner Bitterstoffe und deren Bedeutung bisher nur wenig erforscht. Es ist bekannt, dass die guaianartigen Sesquiterpenlactone $11\beta,13$ -Dihydrolactucin, Lactu-

cin, 8-Desoxylactucin, 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin und Lactucopicrin in der Salatichorie vorhanden sind (Price et al. 1990; Kisiel 2001), jedoch existieren bislang kaum human-sensorische Daten der einzelnen, gereinigten Verbindungen. Diese Guaiansesquiterpenlactone zeigen antivirale und antibakterielle Wirkung und nehmen eine Schlüsselfunktion bei der Abwehr von Fraßfeinden ein (Bennett 2001).

Die Existenz glycosidischer Sesquiterpenlactone in Salatblättern des Chicorées wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. So existieren auch keinerlei Daten bezüglich ihrer Geschmacksqualitäten oder sonstigen sensorischen Eigenschaften. Lediglich Price et al. (1989) schlossen nach enzymatischer Hydrolyse via „Cellulase Typ II“ und anschließendem Nachweis der Aglykone auf das Vorhandensein von Lactucinglycosid und Lactucopicringlycosid, wobei exakte Strukturangaben ausblieben.

1.3 Avocado

1.3.1 Kulturgeschichte und Anbau

Die Avocado (*Persea americana Miller*) stammt ursprünglich aus dem Gebiet zwischen dem zentralen und östlichen Hochland von Mexiko, welches sich durch das heutige Guatemala bis zur pazifischen Küste von Mittelamerika erstreckt (Whiley et al. 2002). Archäologische Funde von Samen haben bewiesen, dass es die Avocado bereits vor über 10.000 Jahren in diesem geografischen Gebiet gegeben hat. Im Vergleich zu jüngeren Funden zeigen Samenfundstücke aus den Höhlen des Tehuacán Valley (Puebla State, MEX), dass eine fortschreitende Zunahme der Samengröße aufgetreten war, was vermutlich mit einer Zunahme der Fruchtgröße einherging (Smith 1966, 1969). Um 7800 v. Chr. wurde die Frucht bereits in Oaxaca (MEX) angebaut und von den Azteken genutzt.

Die Inkas brachten die Avocado aus der Provinz Palta (ECU) in das Cuzco-Tal (PER), wo sich ihre Hauptstadt befand. Bei archäologischen Ausgrabungen im Moche-Tal (PER) wurden Avocadofunde aus der Zeit von 4000-3000 v. Chr. und 3500-1500 v. Chr. freigelegt (Pozorski 1976).

Für die Ureinwohner Mittelamerikas war die Avocado ein wichtiges Nahrungsmittel, welches sie schmeichelhaft „Butter des Waldes“ (Lehari et al. 1999) nannten. Ein Name, der zum einen vom cremigen Fruchtfleisch, aber auch von den nahrhaften Inhaltsstoffen herrühren konnte. Bis zur Entdeckung Amerikas durch Christoph Columbus 1492 wurde die Avocado ausschließlich im nördlichen Südamerika sowie in Mittelamerika angebaut (Whiley et al. 2002) und von den hiesigen Einwohnern genutzt. Erstmals in Schriftform erwähnte der spanische Forscher Martin F. de Enciso die Butterfrucht in seinen Aufzeichnungen „Summa de Geografia“ im Jahre 1519 (Lehari et al. 1999).

Sehr bald nach der Konquisition durch die Spanier wurden verschiedene Avocadoarten in den Antillen verbreitet (Popenoe 1920). Um 1600 brachten Europäer sie nach Südspanien. Doch die Versuche, die Avocado auch in Spanien anzubauen, schlugen zunächst fehl. Erst im Laufe des 17. Jahrhunderts gelang ihnen der Anbau auf der Iberischen Halbinsel. In den folgenden 200 Jahren trat die Avocado ihren Siegeszug um die ganze Welt an: 1750 wurde sie in Afrika kultiviert, 1833 kam sie

nach Florida. In der Mitte des 19. Jahrhunderts erreichte sie schließlich Kalifornien und von dort aus eroberte sie Asien (Rias-Bucher 1998).

Der am häufigsten verwendete Name für die Frucht von *Persea americana* Mill. lautet „Avocado“. Darüber hinaus sind die Bezeichnungen „Advocaat“ (niederländisch), „Aguate“ (spanisch), „Ahuacate“ (spanisch), „Alligatorbirne“ (deutsch), „Avocabirne“ (deutsch), „Butterbirne“ (deutsch), „Butterfrucht“ (deutsch) oder „Palta“ (in südamerikanischen Ländern) gebräuchlich oder gebräuchlich gewesen (Whiley et al. 2002). „Avocado“ als Name leitet sich von dem aztekischen Wort „*ahuacatl*“ (Franke 1997; Lehari et al. 1999; Duncann 2006) ab, das auch „Hoden“ bedeutet.

Als Beerenfrüchte mehrjähriger Pflanzen gelten Avocados als Obst (Lehari et al. 1999). Die Gattung *Persea* (*P.*) ist aus hölzernen magnolienartigen Vorfahren hervorgegangen. Als weitere Arten wurden *P. schiedeana* Nees und *P. parvifolia* Williams beschrieben. *P. americana* ist eine variable Art, welche durch verschiedene Taxa, botanische Varietäten und Unterarten gekennzeichnet ist (Whiley et al. 2002). Der immergrüne Strauch oder bis zu 15 Meter hohe Baum trägt dunkelgrüne, spitzovale Blätter und end- oder seitenständige dichasiale Blütenstände sehr kleiner grünlicher, protogynen Blüten mit sechs Perianthblättern, neun Staubblättern und einem Fruchtblatt. Der oberständige Fruchtknoten mit nur einer Samenanlage wächst zu einer Beere von Birnengestalt von bis zu 12 cm Länge heran. Hinsichtlich der Bestäubung durch Insekten liegt bei *Persea* eine Besonderheit vor, weil es zwei Typen gibt: Typ A öffnet seine Blüten vormittags, wobei nur die Narbe belegungsfähig ist, und schließt sich wieder am Mittag. Die Staubbeutel der gleichen Blüte entlassen dagegen ihren Pollen erst bei erneuter Blütenöffnung am Nachmittag des folgenden Tages. Beim Typ B öffnen sich die Blüten nachmittags zur Bestäubung ihrer Narben, während die Staubbeutel erst am Vormittag des nächsten Tages funktionsfähig werden. Jeder Typ allein kann daher nicht bestäubt werden, und ein Fruchtansatz ist nur möglich, wenn beide Typen zugleich am Standort vorhanden sind. Diese sogenannte „synchrone Dichogamie“ verhindert die Selbstbestäubung und ist beim Plantagenanbau zu berücksichtigen. Die Blüten neuerer Sorten wie *Fuerte* und *Hass* bleiben jedoch zwei Tage lang geöffnet und ermöglichen daher eine Eigenbestäubung. Hat mit Hilfe von Bienen oder anderen Insekten eine erfolgreiche Bestäubung stattgefunden, wächst die Frucht heran. Unter dem derben, glänzend dunkelgrünen bis braunroten Exokarp der reifen Früchte findet sich ein butterweiches, cremefarbiges, unmittelbar

unter der Schale aus dem Exokarp entstandenes grünes Fruchtfleisch, das den harten, braunen, eiförmigen Samen umschließt (Franke 1997).

Da die Kultivierung der Avocado auf eine lange Tradition zurückblicken kann, existieren heute über 400 verschiedene Sorten, die längst nicht alle auf den Markt kommen. Die Avocadosorten werden in drei Kategorien (Lehari et al. 1999) oder in Abhängigkeit ihres kulturhistorischen Ursprungs in drei „Urformen“ (Rias-Bucher 1998), „Ökotypen“ (Franke 1997) oder „Varietäten“ (Whiley et al. 2002) eingeteilt: Die erste Form, der dünnchalige „*mexikanische Typ*“ (Hochlandform), stammt aus dem Hochland von Mexiko und weist Früchte von 60-300 g und bis zu 30 % Fettgehalt auf. Die zweite Form ist der rauschalige „*Guatemala-Typ*“ (Montanform) aus dem Hochland von Zentralamerika mit lang gestielten, dick- und narbenschaligen, sehr großen Früchten von 500-600 g Gewicht und 10-15 % Fettgehalt sowie mit kleineren Samen. Der „*westindische Typ*“ (Tieflandform) aus dem zentralamerikanischen Tiefland mit glatter, ledriger Schale, großem Kern, kurz gestielten, glatt-, aber zähschaligen und großen Früchten bei 3-7 % Fettgehalt stellt die dritte Form dar. – „*Mexikanischer Typ*“, „*Guatemala-Typ*“ und „*westindischer Typ*“ weisen unterschiedliche Merkmale von gartenbaulichen Besonderheiten auf. Da die Zentren ihrer Herkunft deutlich verschieden sind, wird angenommen, dass vor der Kolonisierung Amerikas durch die Europäer die genetische Reinerbigkeit dieser Typen lange gewahrt blieb bzw. eine Vermischung nicht stattfinden konnte, weil diese durch geografische Barrieren voneinander isoliert waren und zwischen den mittelamerikanischen Völkern nur geringe Tausch- oder Handelsaktivitäten herrschten (Storey et al. 1986). Erst als die spanischen Eroberer Handelswege in und nach Mittelamerika errichtet hatten, ergaben sich Möglichkeiten zur Hybridbildung zwischen den unterschiedlichen botanischen Typen. Hybridisierungen hatten signifikante Konsequenzen: Die gegenwärtig wichtigsten Kulturvarietäten *Fuerte* und *Hass* sind Hybride aus dem „*mexikanischen*“ und dem „*Guatemala-Typ*“. Weitere bekannte Kulturvarietäten sind *Bacon*, *Edranol*, *Etinger*, *Pinkerton*, *Reed*, *Ryan*, *Sharwil*, *Shepard*, *Wurtz* und *Zutano* (Whiley et al. 2002).

Die Avocadosorte *Hass*, welcher in der vorliegenden Arbeit besondere Aufmerksamkeit gewidmet ist (**Abbildung 9**), entstand zufällig erst in den späten 1920er Jahren aus einem zufällig gepflanzten Avocadobaumsetzling im Garten von Rudolf Hass, einem ehemaligen deutschen Briefträger, der nach Kalifornien ausgewandert war (Lehari et al. 1999). Die hohe Qualität des Fruchtfleisches, die hohe Ertragsmenge

und die spätere Reifung im Vergleich zur Sorte *Fuerte* veranlassten Rudolf Hass 1935 zur Patentanmeldung der Sorte *Hass*. Der ursprüngliche *Hass*-Avocado-Baum, vom dem weltweit alle Avocados der Sorte *Hass* abstammen, starb 2002 (California Avocado Society 2009). Genetisch wird die *Hass*-Sorte vom „*Guatemala-Typ*“ dominiert, wobei auch einige Gene des „*mexikanischen Typs*“ nachweisbar sind. Die *Hass*-Frucht erreicht ein Gewicht von 140-400 g, wobei der Fruchtfleischanteil 66-70 % ausmacht. Das Fruchtfleisch besitzt durch sein kräftiges und nussartiges Aroma sowie durch seine Cremigkeit eine sehr hohe Qualität, welche die *Hass* als eine der besten Avocado-Sorten der Welt auszeichnet. Erlangt die *Hass*-Avocado Genussreife, so ändert sich die Farbe der Schale von grün in schwarz, was sich als praktischer Vorteil für den Verbraucher erweist. In den letzten 50 Jahren hat sich die *Hass* zur dominierenden Sorte in den subtropischen Anbaugebieten entwickelt. Im Jahr 2000 betrug der *Hass*-Anteil, gemessen an der Avocadogesamtproduktion, in Neuseeland 96 %, in Mexiko und Kalifornien je 90 %, in Chile 80-85 %, in Spanien 73 %, in Australien 70 %, in Südafrika 31 % und in Israel 27 % (Whiley et al. 2002).



Abbildung 9: *Hass*-Avocados (*Persea americana* Mill. cv. *Hass*)

Je nach Typ wachsen Avocados in den Tropen und Subtropen: Der „*mexikanische Typ*“ verträgt Frost bis -3 °C und gedeiht auch im Mittelmeerraum. Der „*westindische Typ*“ hingegen braucht tropische Temperaturen. Auf den Plantagen in Anbaugebieten werden die Bäume durch Zurückschneiden bei Höhen von etwa acht Metern gehalten, damit die Baumkronen einfacher zugänglich und abzuernten sind.

In Abhängigkeit von der Sorte werden die Früchte neun bis 18 Monate nach der Blüte gepflückt, wenn sie reif, aber noch hart sind. Die Früchte werden bei der Ernte einzeln abgeschnitten. So verbleibt noch ein Stück vom Stiel an der Frucht, wodurch diese vor Schimmelbefall geschützt wird, da der Stielansatz die empfindlichste Stelle

ist, an der sich Schimmel ansiedeln kann. Außerdem verläuft der Nachreifeprozess optimal, wenn der Stängelansatz an der Frucht belassen wird. Avocados erreichen nämlich am Baum nur die sogenannte Baumreife, aber nicht die Genussreife. Diese stellt sich erst nach dem Pflücken ein. Während des Transports und der Lagerung erfolgt gewöhnlich die Nachreifung.

Außer im tropischen Amerika wird die Avocado heute weltweit angebaut. Die Avocadoweltproduktion ist in den letzten 46 Jahren um mehr als das Vierfache angestiegen. Wurden 1961 weltweit noch 716.359 Tonnen erzeugt, so waren es 2007 bereits 3.363.124 Tonnen, was einer 4,7-fachen Erhöhung entspricht. Die Weltbevölkerung erhöhte sich hingegen im gleichen Zeitraum um den Faktor 2,1 von 3,09 Mrd. im Jahr 1961 auf 6,67 Mrd. im Jahr 2007 (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). Demnach ist die Nachfrage nach dieser Frucht gestiegen.

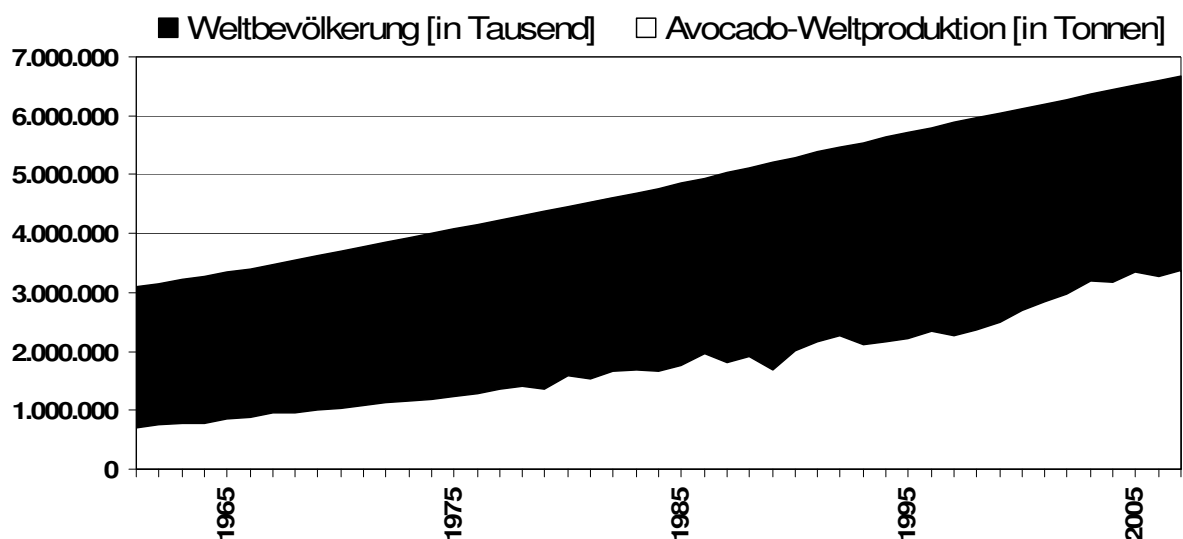


Abbildung 10: Zeitliche Entwicklung der Avocadoweltproduktion 1961-2007 (FAO 2009) und der Weltbevölkerung 1961-2007 (UN 2009).

Laut Angaben der California Avocado Society (Naamani 2007) waren im Jahre 2007 die zwölf bedeutsamsten Anbauländer, aufgelistet nach deren Avocadoproduktion in Tonnen [t] (vgl. **Abbildung 11**): Mexiko (1.000.000 t), Chile (220.000 t), USA (180.000 t), Peru (100.000 t), Südafrika (80.000 t), Israel (70.000 t), Spanien (60.000 t), Australien (40.000 t), die Dominikanische Republik (30.000 t), Kenia (20.000 t), Neuseeland (16.000 t) und Marokko (10.000 t).

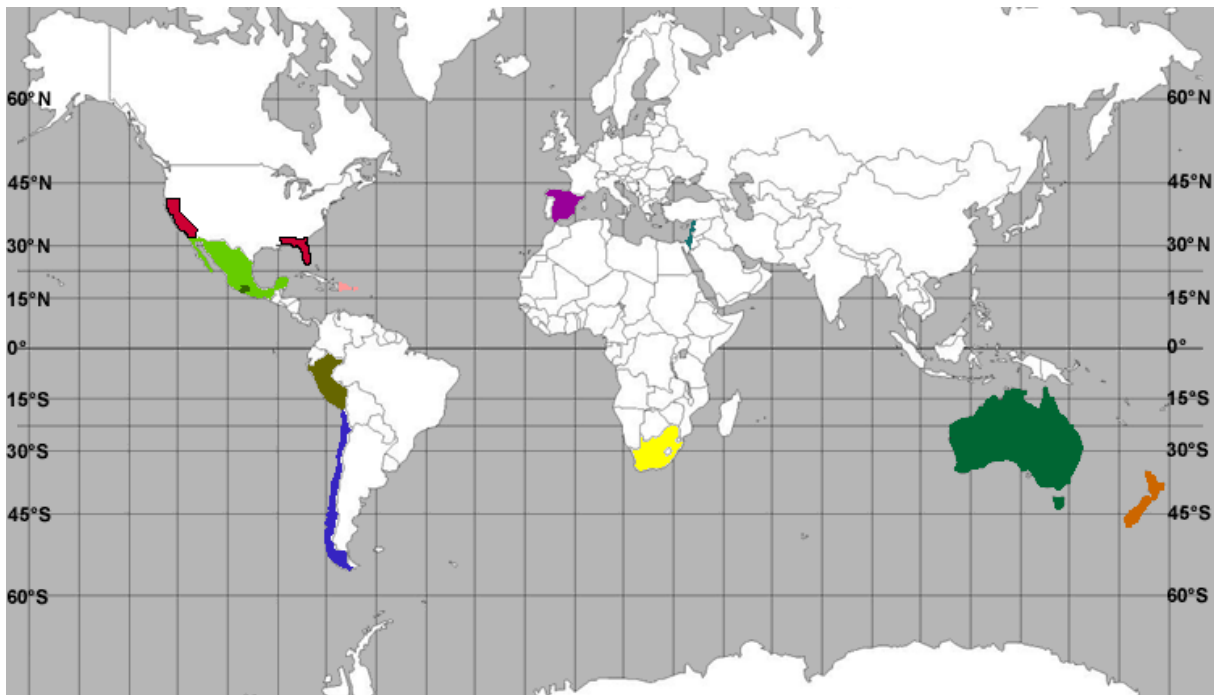


Abbildung 11: Hauptanbauregionen von Avocados (Hofshi Foundation 2009). Bildnachweis: Mit freundlicher Genehmigung durch Reuben Hofshi, Fallbrook, Kalifornien, USA 2009.

Avocados sind als Frischobst ganzjährig zu kaufen. Sie kommen einzeln unverpackt in den Handel und werden nicht nach Gewicht, sondern stückweise verkauft. Gemäß „Codex Standard for Avocado“ (FAO 2005) aus dem *Codex Alimentarius*, einer Sammlung von Normen für die Lebensmittelsicherheit und -produktqualität, die von den UN-Organisationen FAO und WHO seit 1963 herausgegeben wird, werden international folgende drei Qualitätsklassifikationen in absteigender Qualität gehandelt: „*Extra*“ *Class*, *Class I* und *Class II*. Schaut man auf das Angebot innerhalb der Qualitätsklassen, so findet man Avocados in folgenden drei Reifegraden: Die harte Frucht für den Vorrat, die halbweiche für den übernächsten Tag und/oder die weiche für das Abendessen am selben Tag. Eine reife Frucht gibt auf leichten Druck etwas nach und beim Schütteln der Frucht ist im Innern zu hören, wie sich der Kern etwas bewegt.

In Guatemala und dessen Nachbarländern ist die Avocado ein Grundnahrungsmittel unterer Bevölkerungsschichten (Popenoe 1920). Aber auch als Zutat in weitverbreiteten, aufwendig zubereiteten, traditionellen Gerichten wird die Avocado verwendet; so beispielsweise in Mexiko, wo die international bekannte Spezialität *Guacamole* aus pürierter Avocadopulpe, Tomaten, Zwiebeln, Knoblauch, Limonensaft, Jalapeño, Koriander, Peperoni und Salz zubereitet und als Dip oder Brotaufstrich verzehrt wird. In

einigen Ländern wird die Avocadofrucht mit Zucker, in Eiscreme oder in Milchshakes verzehrt (Whiley et al. 2002). Zum Kochen ist die Avocado ungeeignet, da bei Erhitzung oder Lagerung der Pulpe bei hohen Temperaturen Fehlgerüche und Bitterstoffe gebildet werden. Die wachsende Beliebtheit der mexikanischen Küche, vorwiegend in den Ballungszentren der Erde, induziert eine weitere Steigerung des Anbaus, so dass die Bekanntheit und Anwendung von Avocados in Zukunft sich weiter erhöhen wird.

Das essbare Fruchtfleisch der Avocado besitzt einen sahnigen Geschmack und einen nussartigen Geruch. Reife Früchte zeichnen sich durch ein gleichmäßig grünfarbendes, weiches, streichfähiges Fruchtfleisch, einer Schale mit schwarzen Pünktchen und durch einen leicht auszubaren Stielansatz aus. Überreife Früchte zeigen ausgeprägte schwarze Flecken auf der Schale und schwarze Schlieren im Fruchtfleisch. Unreife Früchte sind hart oder, falls zu früh gepflückt, schrumpelig und ohne Aroma (Rias-Bucher 1998). Das Fruchtfleisch der Avocado besitzt ein neutrales, im weitesten Sinne nussartiges Aroma, das sowohl zu süßen als auch zu pikanten Gerichten passt (Lehari et al. 1999).

Die Avocado gilt als eine der ernährungsbiologisch wertvollsten Früchte. Sie ist reich an B-Vitaminen und Vitamin E. Außerdem enthält sie die wichtigsten Mineralstoffe, insbesondere Kalium und Magnesium sowie die Spurenelemente Eisen und Kupfer (vgl. Scherz et al. 2000). Des Weiteren ist die Avocado besonders reich an essenziellen Aminosäuren (Lehari et al. 1999). Avocado enthält soviel Eiweiß wie kein anderes Obst und wird im Fettgehalt nur von Oliven übertroffen. Das Avocadofett besteht zu großen Teilen aus ungesättigten Fettsäuren wie Linol- und Ölsäure. Der Nährwert von Avocadopulpe ist abhängig vom „Ökotyp“ (Franke 1997), von der Kulturvarietät, den Wachstumsbedingungen der Pflanze sowie von dem Alter der Frucht.

Ein weiteres Anwendungsgebiet findet die Avocadofrucht in der Kosmetik, wo Avocadoöl in Kombination mit anderen Ingredienzen beispielsweise zur Pflege der Haut angewendet wird. Pürierte Avocadopulpe wird bei kosmetischen Gesichtsbearbeitungen eingesetzt.

Den Vorteilen der Avocado steht jedoch eine ansteigende Zahl von Menschen gegenüber, die allergisch auf diese Frucht reagieren. So sind gegenwärtig bereits mehr als ein Prozent der US-amerikanischen und mexikanischen Bevölkerung gegen die

Avocado sensibilisiert. Das Hauptallergen hat dabei Endochitinase-Aktivität und ist bekannt als „*Prs a 1*“ (Sowka et al. 1998).

1.3.2 Kenntnisstand zu den Bitterstoffen in der Avocado

Im Gegensatz zu anderen Lebensmitteln kann die Avocado in Abhängigkeit vom thermischen Prozess oder vom Trocknungsprozess an der Luft nicht zubereitet werden, ohne dass Aroma- und Geschmacksfehler auftreten. Beim Aufkochen, längerem Heißhalten und auch beim Einfrieren werden Avocados bitter (Rias-Bucher 1998; Lehari et al. 1999). Bates (1970) beschrieb diesbezüglich einen unangenehmen, scharfen, mundbelegenden Geschmack und einen unangenehmen anhaltenden Nachgeschmack, welcher mit einer Bitterkeit einhergeht.

Im Jahr 1931 wurde der Bittergeschmack erhitzter Avocadopulpe durch Harrold (1931) allgemein als „chininartig“ bitter bezeichnet. Zwanzig Jahre später wurde das Auftreten von Fehleraromen und Fehlgeschmack in einer Rezension von Cruess et al. (1951) dokumentiert, wobei jedoch keine konkreten molekularen Ursachen für eine Zunahme der Bitterkeit nach thermischer Behandlung von Avocados aufgeführt werden konnten. Erst Ben-Et (1973) gelang es, mit 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en und 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en erstmalig und bislang alleinig zwei Verbindungen (**Abbildung 12**) aus erhitzter Avocadopulpe zu isolieren und diese als Bitterstoffe zu identifizieren.

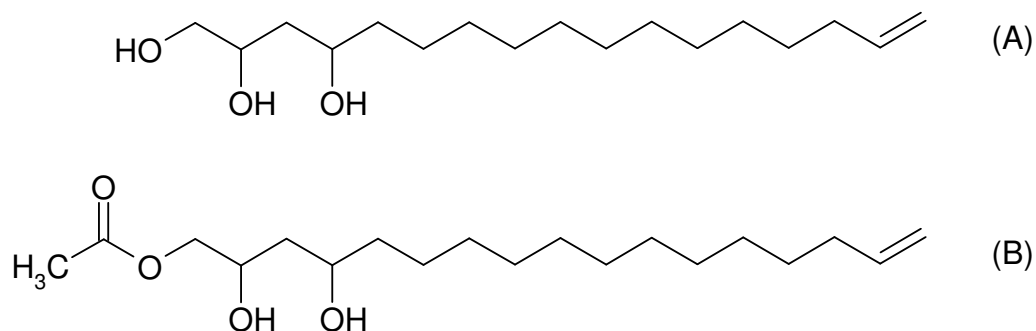


Abbildung 12: Molekülstrukturen von 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (A) und 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (B).

Es blieb jedoch unklar, ob diese Verbindungen zum Bittergeschmack thermisch verarbeiteter Avocadoprodukte beitragen, oder ob des Weiteren bisher nicht beschriebene Bitterstoffe in der Avocado existieren.



2 Ziele der Arbeit

Die Klärung kausaler Zusammenhänge zwischen individuellen Geschmackspräferenzen und Ernährungsverhalten legt interindividuelle Variationen in der Ausstattung mit Geschmacksrezeptorgen nahe und setzt die Klärung der dem Geschmack zugrunde liegenden Moleküle voraus. Da insbesondere die individuelle Bitterwahrnehmung mit der Verzehrpräferenz pflanzlicher Lebensmittel wie z.B. Chicorée oder erhitzter Avocado zusammenzuhängen scheint, gilt es die diesen Bittergeschmack induzierenden Verbindungen zunächst zweifelsfrei zu identifizieren.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, die den Bittergeschmack von Chicorée sowie erhitzter Avocado ursächlichen Substanzen unter Nutzung von Arbeitsweisen der molekularen Sensorik strukturell und funktionell zu charakterisieren. Hierfür sollten aus diesen Lebensmitteln gewonnene Lösungsmittelextrakte unter Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse aktivitätsorientiert fraktioniert, die Bitterstoffe lokalisiert und nach Isolierung und chromatographischer Reinigung mittels LC/MS- und NMR-spektroskopischen Untersuchungen in deren Struktur geklärt werden. Nach sensorischer Charakterisierung (Geschmacksschwellenwerte, Dosis/Wirkungs-Funktionen) sollten anschließend die Geschmacksstoffe in Chicorée bzw. erhitzter Avocado quantifiziert und anhand von Konzentrations/Wirkungs-Überlegungen in deren Geschmacksbeitrag gewichtet werden. Anhand quantitativer Studien sollten abschließend die lokale Verteilung der Bitterstoffe innerhalb des Chicorée-Salatkopfes sowie deren Bildungsverläufe in Avocadopüree in Abhängigkeit der Erhitzungstemperatur und -zeit untersucht werden.



3 Ergebnisse

3.1 Bitterstoffe im Chicorée (*Cichorium intybus L. var. foliosum Hegl*)

Vor den Untersuchungen wurden Chicorée-Salatköpfe zunächst zerkleinert und gefriergetrocknet (Trockenmasse: 5,7 g/100 g). Die sensorische Analyse getrockneten Materials ergab eine süßliche sowie eine kräftig bittere Note. Die Analyse der Zucker Glucose, Fructose und Saccharose ergab einen mittleren Gesamtgehalt von 43,0 g/100 g TM, was mit dem Süßgeschmack des Untersuchungsmaterials korrelierte. Zur Identifizierung der bitteren Inhaltsstoffe wurde das gefriergetrocknete Blattmaterial im Folgenden fraktioniert.

3.1.1 Aktivitätsorientierte Identifizierung von Bitterstoffen im Chicorée

3.1.1.1 Sequenzielle Lösungsmittelextraktion

Um erste Erkenntnisse bezüglich der Hydrophobität geschmacksaktiver Inhaltsstoffe zu erhalten, wurde das gefriergetrocknete Chicorée-Blattmaterial einer aktivitätsorientierten Fraktionierung durch sequenzielle Extraktion mit organischen Lösungsmitteln unterzogen.

Das Untersuchungsmaterial wurde zuerst mit Methanol, der verbliebene Rückstand mit einer Methanol-Wasser-Mischung extrahiert. Die vom unlöslichen Rückstand durch Filtration isolierten Extrakte wurden nach deren Vereinigung im Vakuum vom Methanol befreit und mit Ethylacetat extrahiert, woraus die Ethylacetat- und die Wasserfraktion resultierten (**Abbildung 13**).

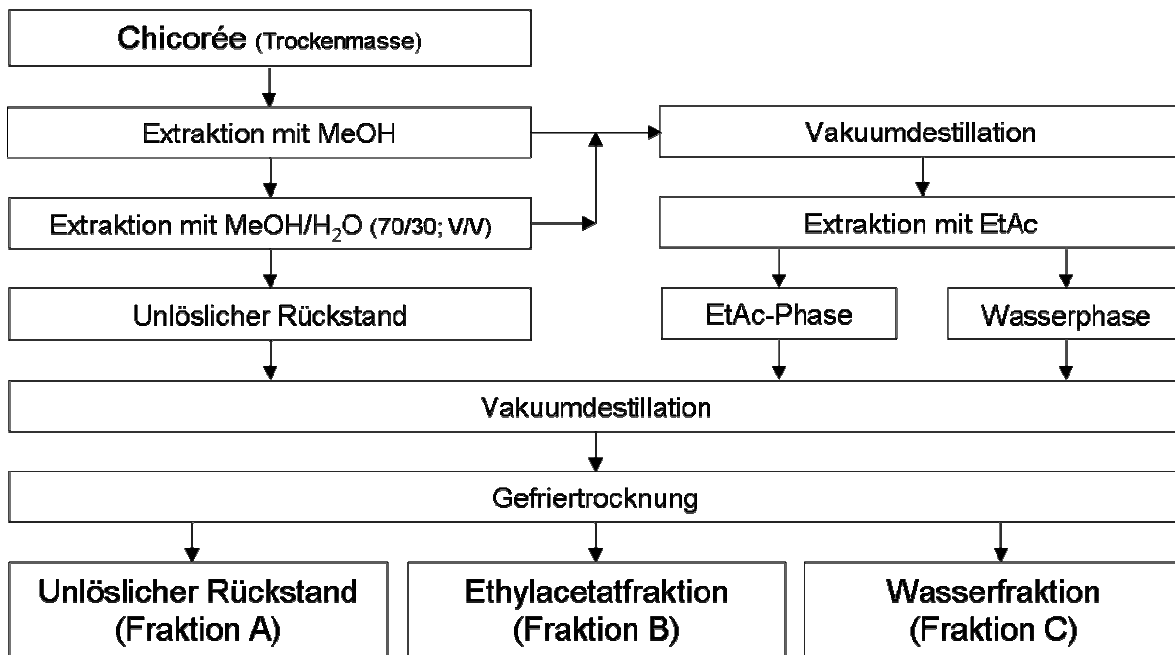


Abbildung 13: Chicorée-Extraktionsschema

Somit resultierten mit dem unlöslichen Rückstand (Fraktion A), der Ethylacetatfraktion (Fraktion B) und der Wasserfraktion (Fraktion C) insgesamt drei Fraktionen.

Von allen Fraktionen wurden nach Gefriertrocknung die Ausbeuten gravimetrisch bestimmt sowie deren relative Intensitäten der Bitterkeit im Vergleich sensorisch ermittelt. Mit einer Ausbeute von 70,4 % bildeten die Bestandteile der wasserlöslichen Fraktion C den höchsten Anteil und die ethylacetatlösliche Fraktion B mit 1,6 % den geringsten Anteil an der Chicorée-Trockenmasse. Die Ausbeute des unlöslichen Rückstandes (Fraktion A) betrug 27,7 %. Somit belief sich die Gesamtausbeute der Extraktion auf 99,7 %, sodass die Extraktionsverluste mit 0,3 % vernachlässigbar gering ausfielen (**Tabelle 1**).

Die sensorische Analyse des unlöslichen Rückstandes A erfolgte aufgrund dessen Wasserunlöslichkeit durch Verkostung der Trockenmasse, welche sich als ohne jeglichen Geschmack präsentierte und somit nicht weiter untersucht wurde. Ethylacetat- und Wasserfraktion wurden in natürlich vorliegenden Konzentrationsverhältnissen in einprozentigen, ethanolischen Lösungen miteinander sensorisch verglichen und deren relative Bitterintensitäten auf einer Skala von 0-5 bewertet. – Als Referenzlösungen dienten Sensorikwasser (pH 6,5) mit einem definierten Bitterwert von 0 sowie eine wässrige Coffeinlösung (1,0 g/l) mit einem definierten Bitterwert von 5. – Mit einem Intensitätswert von 4,7 war die relative Bitterkeit der Fraktion B gegenüber dem

Wert 2,0 der Fraktion C mehr als 2,3-fach höher, obwohl der gelöste Anteil der Fraktion B von 1,6 % gegenüber der Wasserfraktion C mit 70,4 % um exakt den Faktor 44 geringer ausgefallen war.

Tabelle 1: Extraktionsausbeuten und relative Bittergeschmacksintensitäten der Chicorée-Fraktionen A-C

Chicorée-Fraktionen	Ausbeute [g/100 g TM]	Relative Intensität der Bitterkeit ^a
A	27,7	0,0
B	1,6	4,7
C	70,4	2,0

^a Bestimmungen in 1%igem ethanolischen *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5) mittels Half-Mouth-Test.

Zur Isolierung und Identifizierung der Schlüsselbitterstoffe wurden die Fraktionen B und C mittels präparativer HPLC weiter aufgetrennt und mittels Geschmacksverdünnungsanalyse nach Bitterstoffen untersucht.

3.1.1.2 Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) und Identifizierung von Bitterstoffen der Fraktion B

Um die geschmacksaktiven von den geschmacklosen Verbindungen abzutrennen, wurde die Fraktion B vollständig in Methanol gelöst und mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase unter Anwendung eines Wasser-Acetonitril-Gradienten fraktioniert. Die Ethylacetatfraktion B wurde dadurch in die 15 Fraktionen B1-B15 aufgetrennt (**Abbildung 14**) und durch Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse (Frank et al. 2001) in ihren relativen Geschmacksaktivitäten gewichtet. Hierzu wurden die einzelnen gefriergetrockneten HPLC-Fraktionen in gleichen Volumina Wasser gelöst und anschließend stufenweise um den Faktor 2 verdünnt. Im Anschluss wurden die zu verkostenden Proben den Sensorikern in der Reihe steigender Konzentrationen angeboten. Jede einzelne Verdünnungsstufe wurde mehrfach von dem Sensorikpanel im Vergleich zu einem Blindwert aus Sensorikwasser in einem sogenannten Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004) verkostet.

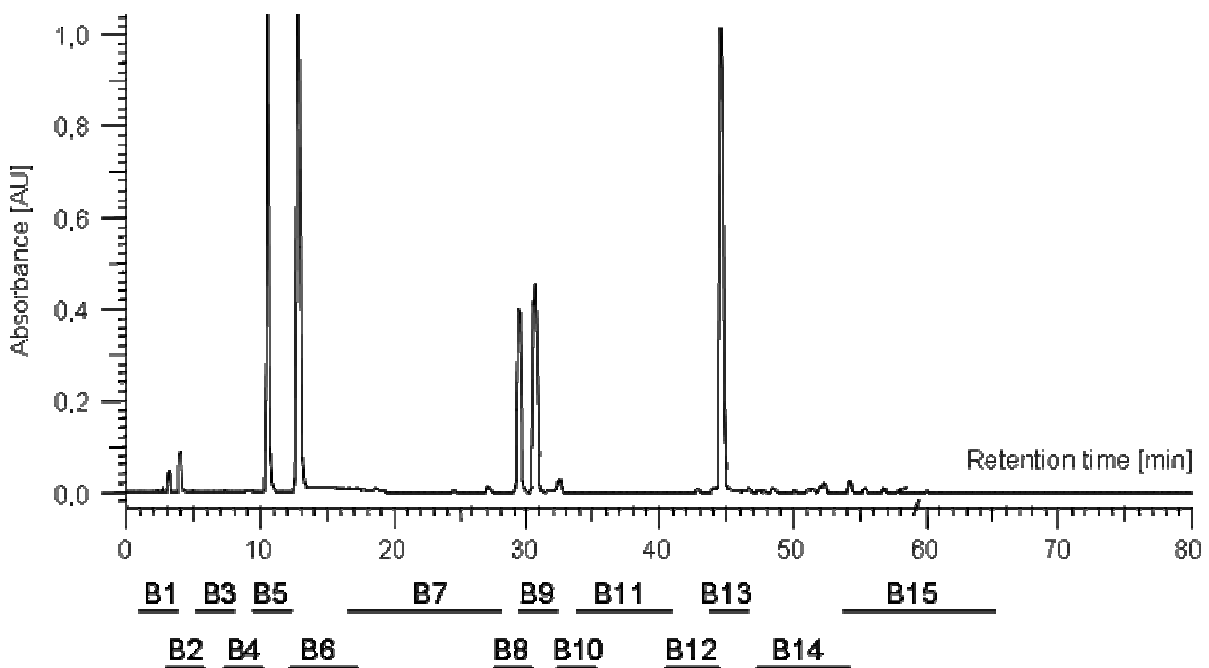


Abbildung 14: Präparatives RP-HPLC-UV/VIS-Chromatogramm ($\lambda = 258 \text{ nm}$) der Chicorée-Ethylacetatfraktion.

Die Verdünnungsfaktoren jeder einzelnen Fraktion, bei der gerade noch eindeutig ein Bittergeschmack gegenüber den Blindproben erkannt wurde, wurden gemittelt und als Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVFs) angegeben. Simultan wurde die Geschmacksqualität der jeweiligen Fraktion angegeben. Die Ergebnisse der Geschmacksverdünnungsanalyse der Chicorée-Fraktion B zeigen, dass insgesamt neun der 15 Fraktionen bitter waren (**Tabelle 2**). Die Qualitäten der Bitterkeit dieser neun Fraktionen charakterisierten die Panelisten als identisch. Mit einem Geschmacksverdünnungsfaktor (GVF) für Bitterkeit von jeweils 128 zeigten die Fraktionen B5, B6 und B13 die größten Effekte, gefolgt von Fraktion B9 mit einem GVF von 16 sowie den Fraktionen B8, B10 und B15 mit GVFs von jeweils 8. Die Fraktionen B3 und B12 präsentierten sich lediglich bis zu den Verdünnungsstufen 1:4 und 1:2 als bitter, die Fraktionen B4, B7 und B14 waren geschmacklos. Als aufrauend adstringierend wurden die Fraktionen B1 und B2 beschrieben.

Tabelle 2: Geschmacksqualitäten und Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVF) isolierter Subfraktionen B1-B15

HPLC-Fraktion ^a	Geschmacksqualität ^b	GVF ^b	Identifizierte Verbindung ^c
B1	aufrauende Adstringenz	2	
B2	aufrauende Adstringenz	4	
B3	bitter	4	
B4	geschmacklos	< 1	
B5	bitter	128	1
B6	bitter	128	2
B7	geschmacklos	< 1	
B8	bitter	8	3
B9	bitter	16	4
B10	bitter	8	
B11	geschmacklos	< 1	
B12	bitter	2	
B13	bitter	128	5
B14	geschmacklos	< 1	
B15	bitter	8	

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 14**. ^b Bestimmungen mittels Half-Mouth-Test. ^c Angaben gemäß **Abbildung 16, 20, 24, 25 und 29**.

Die Verbindungen, die mit den höchsten GVFs bewertet wurden, wurden im Folgenden mittels HPLC-DAD-Spektroskopie, HPLC-MS/MS- und NMR-Experimente in deren chemischen Strukturen untersucht.

Die Fraktionen B5, B6, B8, B9 und B13 beinhalteten jeweils nur eine Substanz – genannt **1**, **2**, **3**, **4** und **5** –, welche mittels instrumentell-analytischer Techniken als 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), Lactucin (**2**), 8-Desoxylactucin (**3**), 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (**4**) und Lactucopicrin (**5**) identifiziert werden konnten. Die Untersuchung der aus der Ethylacetatfraktion B der Chicorée-Salatblätter isolierten Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** via RP-HPLC-DAD indizierte das Vorliegen von Sesquiterpenlactonderivaten: Die DAD-Spektren mit einem Wellenlängenbereich von 200 bis

400 nm zeigten, dass die bei den Retentionszeiten von 10,1 min (**1**), 12,9 min (**2**), 29,2 min (**3**), 30,7 min (**4**) und 44,8 min (**5**) eluierenden Verbindungen ein durchweg ähnliches Absorptionsverhalten mit einem jeweils identischen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 258 nm besaßen.

Die Molekülstrukturen dieser Verbindungen wurden durch massenspektrometrische und kernresonanzspektroskopische Untersuchungen bestätigt. Die erhaltenen Daten korrelierten mit denen von Deng et al. (2001), Seto et al. (1988) und Ren et al. (2003). Die isolierten Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** sind allesamt Guaian-Derivate, bestehen aus drei Ringen – einem Fünfring, einem Siebenring und einem Lactonring – mit Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C-1 und C-10 sowie zwischen C-3 und C-4. Sie besitzen jeweils eine Carbonylgruppe am C-2, eine Methylgruppe am C-10, eine Hydroxymethylengruppe am C-4 und identisch konfigurierte Stereozentren.

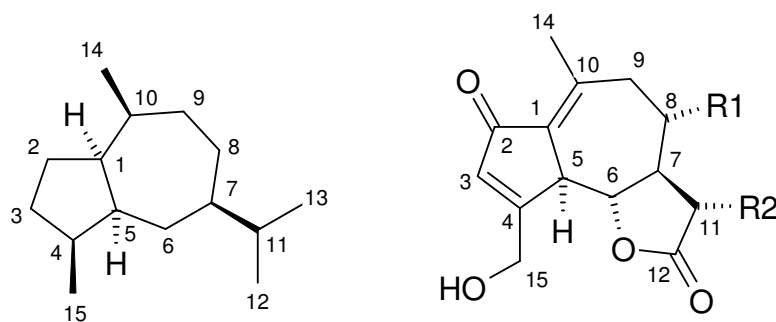


Abbildung 15: Molekülstruktur von Guaian (links) und allgemeine Molekülgrundstruktur der in Fraktion B identifizierten Guaiansesquiterpenlactone (rechts).

Die Moleküle **1**, **2**, **3**, **4** und **5** tragen Stereozentren mit folgenden Konfigurationen an den Kohlenstoffatomen C-5 (*S*), C-6 (*R*) und C-7 (*R*). **1**, **2** und **5** besitzen zudem Stereozentren am Kohlenstoffatom C-8, an dem eine Hydroxylgruppe in *S*-Konfiguration gebunden ist. Die Stereozentren C-11 der Verbindungen **1** und **4** sind *S*-konfiguriert. Im Folgenden sind die Arbeiten zur Strukturidentifizierung detailliert dargestellt.

Identifizierung von 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**) in Fraktion B5:

Die erhaltene Fraktion B5 wurde als stark bitter charakterisiert und beinhaltete lediglich eine Verbindung (**1**) (**Abbildung 16**). Die Substanz **1** besaß laut DAD-Spektrum in einer Wasser/Acetonitril-Mischung von 85/15 (V/V) bei einer Wellenlänge von 258 nm ein lokales Absorptionsmaximum.

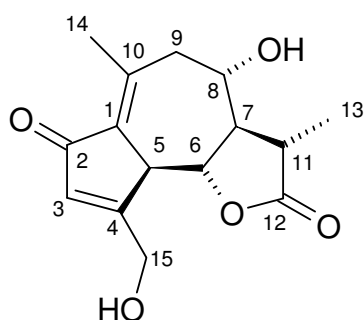


Abbildung 16: Molekülstruktur von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).

Die LC-MS/MS-Analyse im ESI-Positiv-Modus ergab ein Pseudomolekülkation $[M+H]^+$ mit m/z 279. Durch die Detektionen des Ammoniumadduktkations $[M+NH_4]^+$ mit m/z 296 wurde auf eine Gesamtmolekülmasse von 278 g/mol geschlossen (**Abbildung 17**). Die Detektion im ESI-Negativ-Modus ergab ein Pseudomolekülanion $[M-H]^-$ mit m/z 277; Signale von m/z 313 und m/z 323 wurden als Chlorid- ($[M+Cl]^-$) und Formiatadduktanionen ($[M+Formiat]^-$) interpretiert, sodass eine Gesamtmolekülmasse von 278 g/mol bestätigt werden konnte.

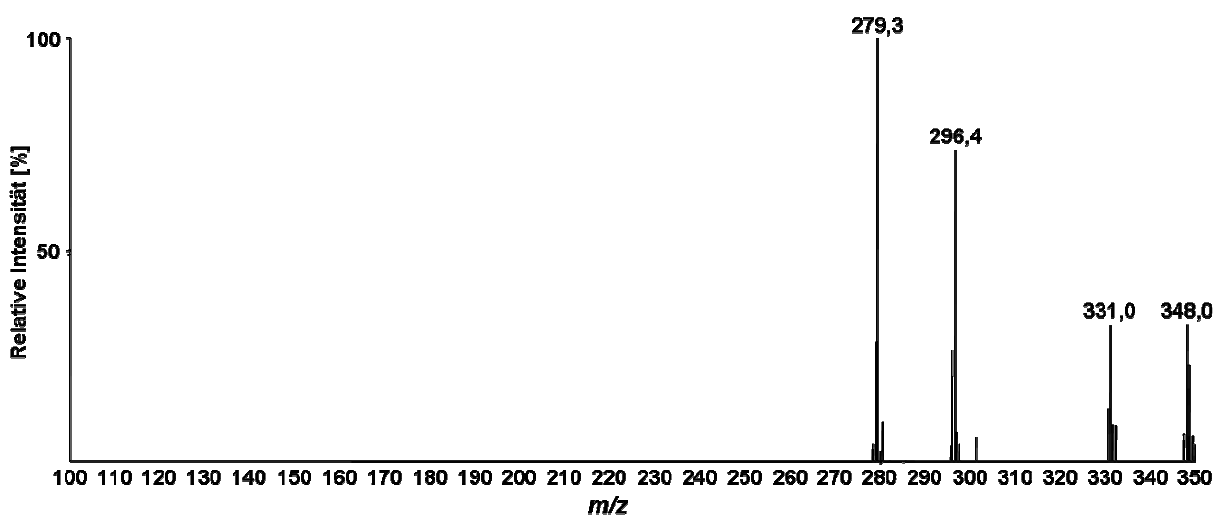


Abbildung 17: ESI(+)-LC-MS-Spektrum von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).

Mittels COSY-NMR-Experiment wurden zwischen C(5)-C(6), C(6)-C(7), C(7)-C(8), C(7)-C(11) und C(11)-C(13) skalare Protonenkopplungen detektiert. Das 1H - und HMQC-NMR-Experiment zeigte das Vorliegen von zwei Methylgruppen, welche den Kohlenstoffatomen C(13) und C(14) zugeordnet werden konnten. Da laut HMQC-

Experiment am C(11) ein Proton gebunden ist, welches mit den Protonen der C(13)-Methylgruppe koppelt (**Abbildung 18**), handelt es sich bei dem isolierten Bitterstoff eindeutig um das 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**).

Die ^{13}C -NMR-Signale bei 178 ppm (C(12)) und 195 ppm (C(2)) im HMBC-Spektrum ließen auf das Vorhandensein von Carbonylgruppen bzw. Carbonylkohlenstoffatomen schließen (Ordinatenachse, **Abbildung 19**). Erstere sind charakteristisch für Carbonyle in Lactonsystemen, Letztere für alleinständige Carbonylsysteme ohne Ester- oder Lactoncharakter. Durch $J_{2,3}$ -Kopplungen konnten die benachbarten Protonen der Kohlenstoffatome C(3), C(7), C(11), C(13) sowie C(15 α/β) zugeordnet werden, sodass auf das Vorliegen einer Sesquiterpenlactongrundstruktur geschlossen werden konnte. Die stark ausgeprägte J_2 -Kopplung des C(2)-Atoms mit dem C(3)-Proton verstärkte diese Annahme.

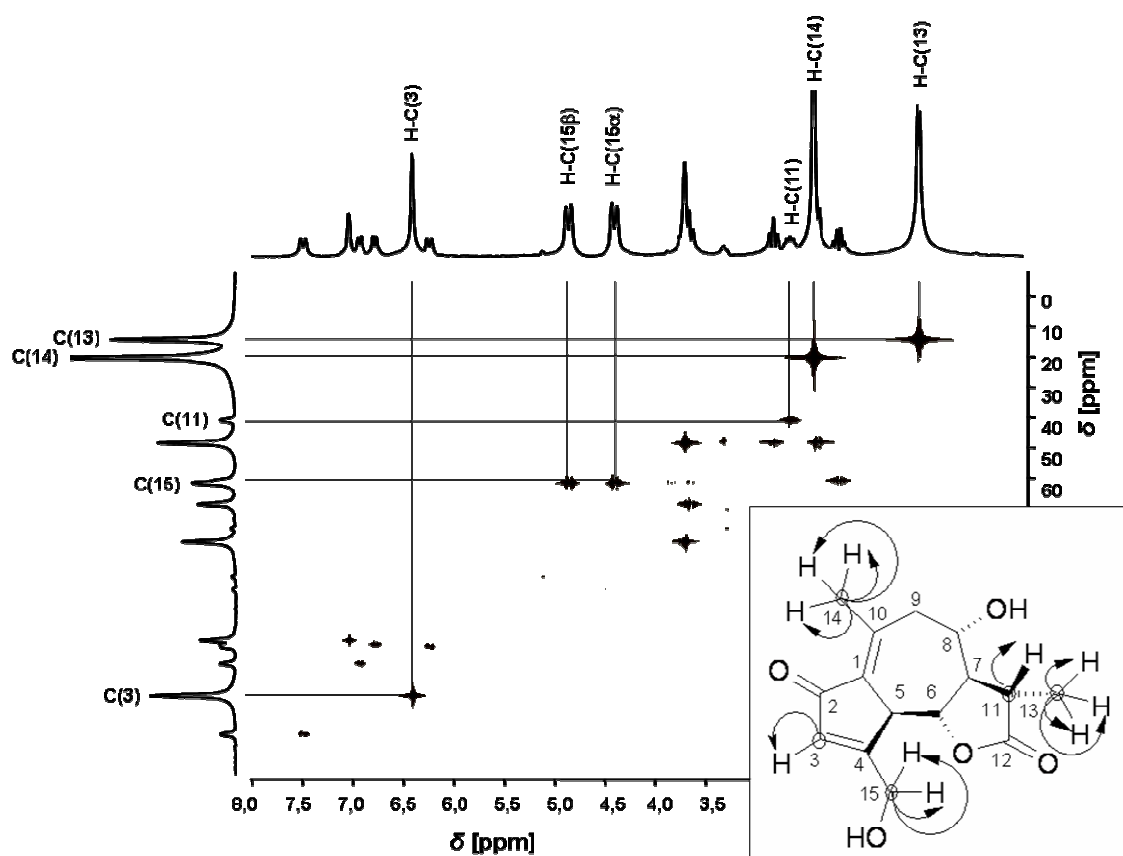


Abbildung 18: HMQC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- d_4) von 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**).

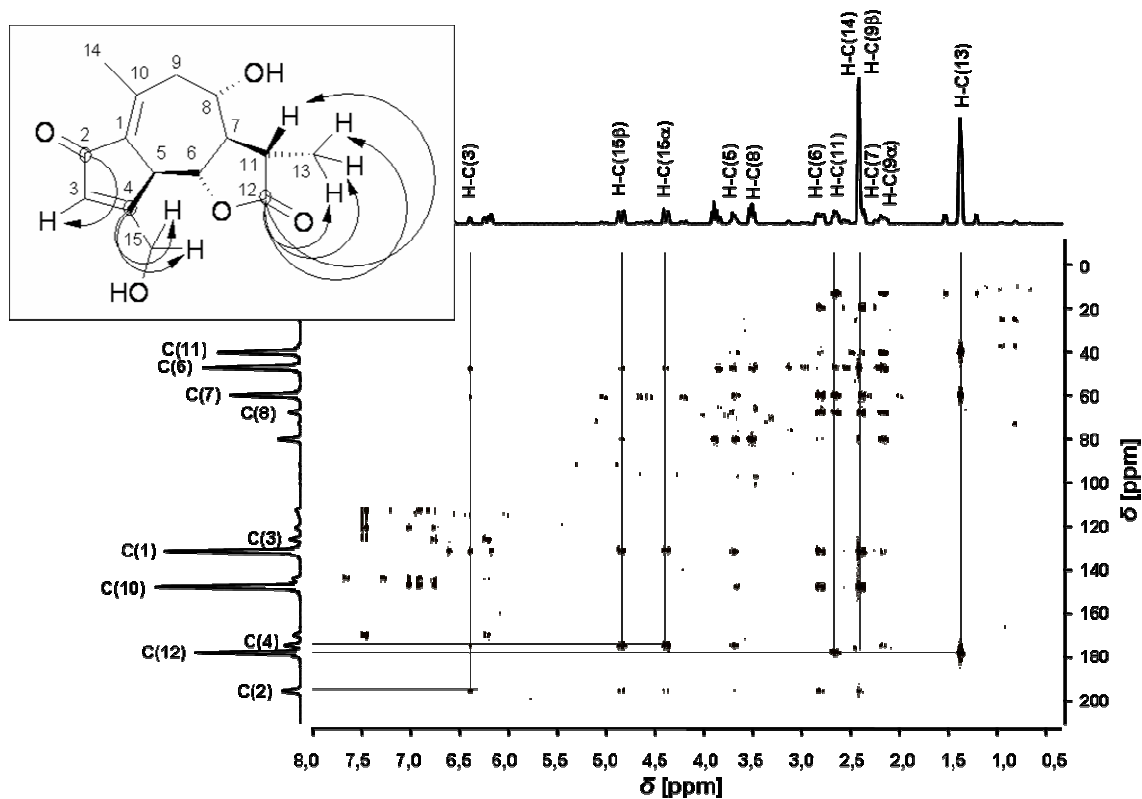


Abbildung 19: HMBC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- d_4) von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).

Die absolute Konfiguration des Stereozentrums am C(11) konnte mittels ^1H -NMR-Experiment (400 MHz, Methanol- d_4) und via Literaturvergleich (Van Beek et al. 1990; Deng et al. 2001) bestimmt werden. So betrug die Kopplungskonstante der Protonen am C(7) im ^1H -Spektrum 13,6 Hz und am C(11) 11,9 Hz. Deng et al. (2001) bestimmten H,H-Kopplungskonstanten von $J_{7,11} = 7,7$ Hz für 11 α ,13-Dihydro-8-desoxylactucin („11-Epijacquelin“) und $J_{7,11} = 12,5$ Hz für 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin („Jacquelin“) (4). Van Beek et al. (1990) beschrieben Kopplungskonstanten von 12,0 Hz als charakteristisch für die 11*S*-Konfiguration; Kopplungskonstanten von ungefähr 7 Hz gelten als markant für die 11*R*-Konfiguration. Somit handelt es sich aufgrund der Resultate der durchgeführten spektrometrischen und spektroskopischen Experimente sowie durch Literaturdatenvergleich bei der vorliegenden, isolierten Verbindung eindeutig um 11*S*,13-Dihydrolactucin (1).

Identifizierung von Lactucin (**2**) in Fraktion B6:

Die erhaltene Fraktion B6 charakterisierte man als stark bitter und beinhaltete lediglich die Verbindung **2** (**Abbildung 20**). Die Substanz **2** besaß laut DAD-Spektrum in einer Wasser/Acetonitril-Mischung von 85/15 (V/V) bei einer Wellenlänge von 258 nm ein lokales Absorptionsmaximum.

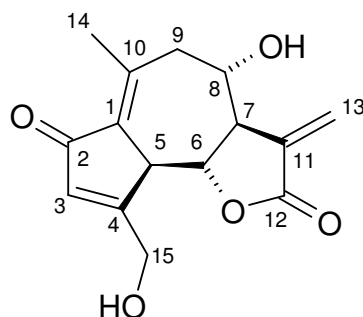


Abbildung 20: Molekülstruktur von Lactucin (2).

Die LC-MS/MS-Analyse im ESI-Positiv-Modus ergab ein Pseudomolekülkation $[M+H]^+$ mit m/z 277. Durch die Detektionen des Ammoniumadduktionskations $[M+NH_4]^+$ mit m/z 294 sowie des Natriumadduktionskations $[M+Na]^+$ mit m/z 299 wurde auf eine Gesamtmolekülmasse von 276 g/mol geschlossen (**Abbildung 21**).

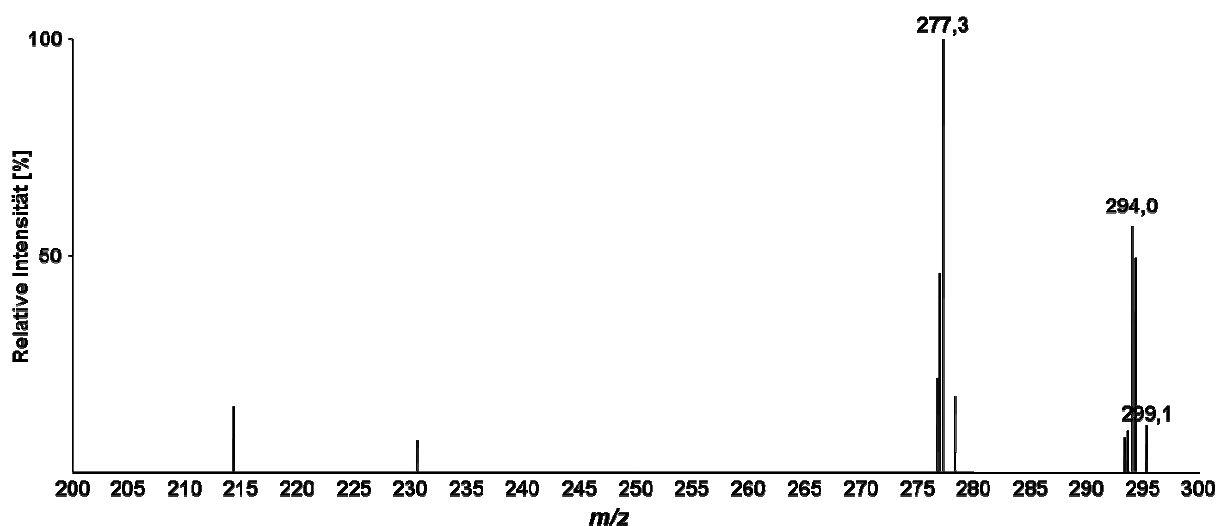


Abbildung 21: ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Lactucin (2).

Die Detektion im ESI-Negativ-Modus ergab ein Pseudomolekülanion $[M-H]^-$ mit m/z 275; Signale von m/z 257, m/z 311 und m/z 321 wurden als Wasserabspaltung

([M-H-H₂O]⁻), als Chlorid- ([M+Cl]⁻) und Formiatadduktanionen ([M+Formiat]⁻) gedeutet, sodass eine Gesamtmolekülmasse von 276 g/mol bestätigt werden konnte.

Die NMR-Spektrensätze von Fraktion B6 waren mit Ausnahme der Position 13 im Sesquiterpenlacton-Molekülgrundgerüst mit denen von 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**) identisch. Das ¹H-NMR-Spektrum von **2** (**Abbildung 22**) zeigt im Gegensatz zu dem von **1** zwei zusätzliche, tieffeldverschobene Protonen bei 6,15 und 6,25 ppm, welche folglich als geminal gebundene Protonen an einem olefinischen Kohlenstoffatom C(13) gedeutet werden konnten. Dass es sich bei dem Kohlenstoffatom C(13) nicht um eine Methyl-, sondern um eine Methylengruppe handelt, zeigt der Vergleich der HMQC-Spektren von **1** (**Abbildung 18**) und **2** (**Abbildung 23**): So enthält das Molekül von **1** an Position 13 eindeutig eine hochfeldverschobene Methylgruppe, wohingegen in **2** (Lactucin) an dieser Stelle eine Methylengruppe mit tieffeldverschobenen Protonen und einer C-C-Doppelbindung enthalten ist.

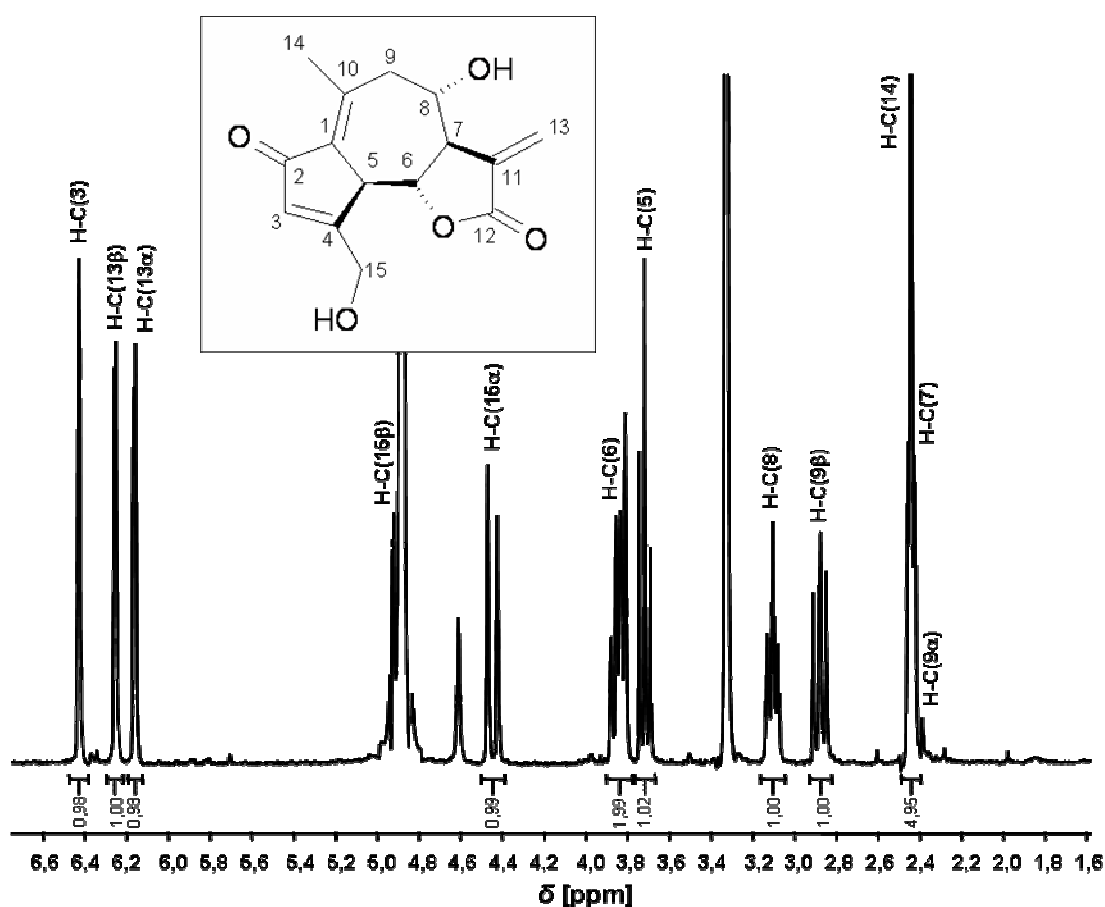


Abbildung 22: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol-d₄) von Lactucin (**2**).

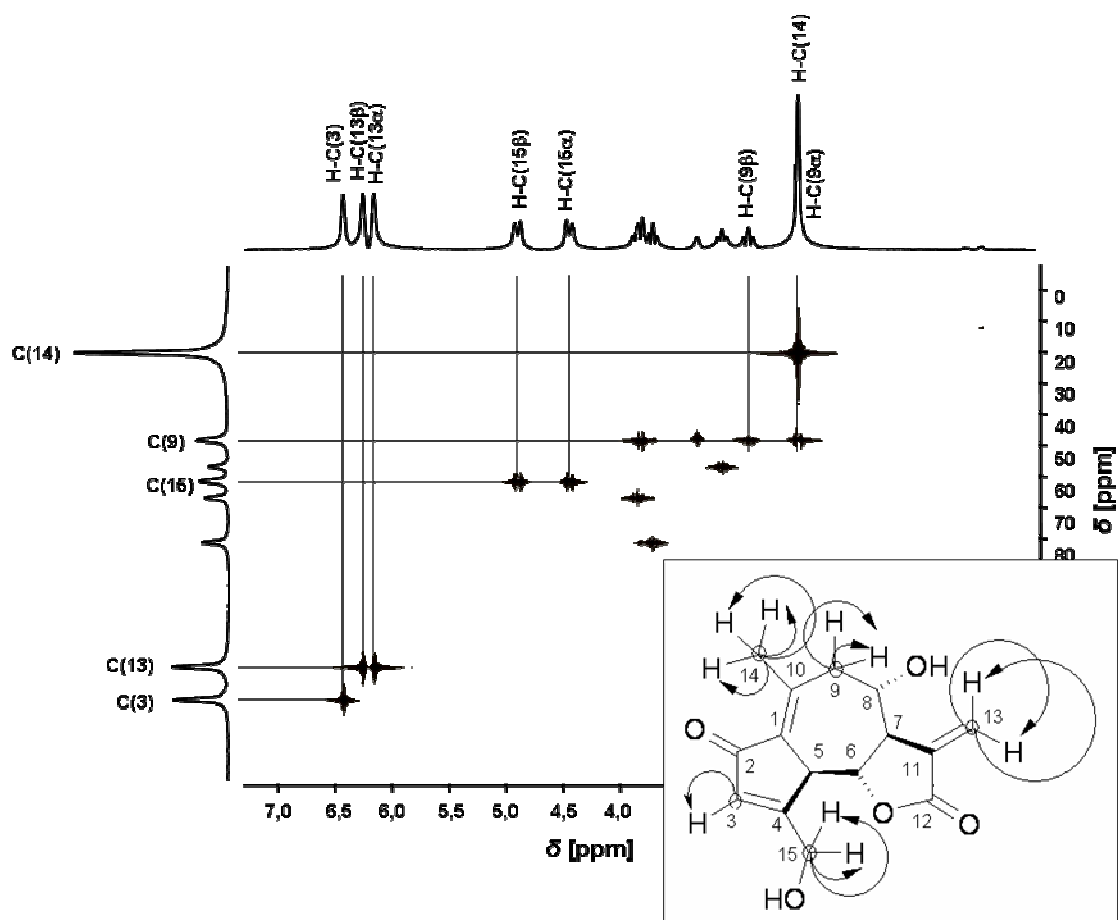


Abbildung 23: HMBC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- d_4) von Lactucin (2).

Die ermittelten NMR-Daten korrelieren mit denen von Deng et al. (2001). Die absolute Konfiguration von Lactucin gemäß **Abbildung 20** wurde mittels Röntgenkristallstrukturanalyse durch Ruban et al. (1978) bestimmt. Bei dem aus Fraktion B6 isolierten Bitterstoff handelte es sich folglich um Lactucin (2).

Identifizierung von 8-Desoxylactucin (3) in Fraktion B8:

Die erhaltene Fraktion B8 wurde als bitter charakterisiert und beinhaltete lediglich die Verbindung **3** (**Abbildung 24**). Die Substanz **3** zeigte laut DAD-Spektrum in einer Wasser/Acetonitril-Mischung von 75/25 (V/V) bei einer Wellenlänge von 258 nm ein lokales Absorptionsmaximum.

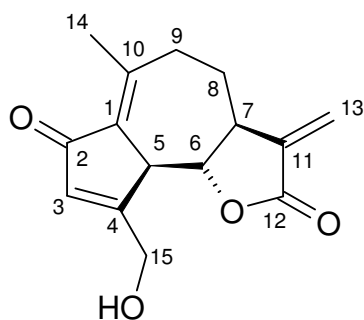


Abbildung 24: Molekülstruktur von 8-Desoxylactucin (3).

Die LC-MS/MS-Analyse im ESI-Positiv-Modus ergab ein Pseudomolekülkation $[M+H]^+$ mit m/z 261. Durch die Detektion einer Wasserabspaltung ($[M+H-H_2O]^+$) mit m/z 243, des Natriumadduktions $[M+Na]^+$ mit m/z 283 sowie des Kaliumadduktions $[M+K]^+$ mit m/z 299 konnte eine Gesamtmolekülmasse von 260 g/mol festgestellt werden. Die Detektion im ESI-Negativ-Modus ergab ein Pseudomolekülanion $[M-H]^-$ mit m/z 259. Signale von m/z 295 und m/z 305 wurden als Chlorid- ($[M+Cl]^-$) und Formiatadduktanionen ($[M+Formiat]^-$) gedeutet, sodass eine Gesamtmolekülmasse von 260 g/mol ermittelt werden konnte.

Die NMR-Spektrensätze von **3** waren mit Ausnahme der Positionen 7, 8 und 9 im Sesquiterpenlacton-Molekülgrundgerüst mit denen von Lactucin (**2**) identisch. Mittels COSY-NMR-Experiment wurden zwischen den Protonen, welche an C(8) gebunden sind, geminal-skalare Kopplungen detektiert. Im Gegensatz zu Lactucin (**2**) trägt das Molekül **3** somit an Position 8 keine Hydroxylgruppe und ein Proton, sondern lediglich zwei kohlenstoffgebundene Protonen. Bei der Position 8 im Sesquiterpenlacton-Molekülgerüst handelt es sich ausschließlich um eine Methylengruppe. Die ermittelten NMR-Daten bestätigen die von Deng et al. (2001) und Savona et al. (1982) publizierten Werte. Gemäß der Beschreibung von Savona et al. (1982) sind im Cycloheptenring von 8-Desoxylactucin die Protonen H-C(8 α) und H-C(9 β) als axialständig und die Protonen H-C(9 α) sowie H-C(8 β) in äquatorialer Position angeordnet.

Der in Fraktion B8 vorliegende Bitterstoff wurde daher eindeutig als 8-Desoxylactucin (**3**) identifiziert.

Identifizierung von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (**4**) in Fraktion B9:

In der bitteren Fraktion B9 war ausschließlich Verbindung **4** enthalten (**Abbildung 25**). Die Substanz **4** besaß laut DAD-Spektrum in einer Wasser/Acetonitril-Mischung von 75/25 (V/V) bei einer Wellenlänge von 258 nm ein lokales Absorptionsmaximum.

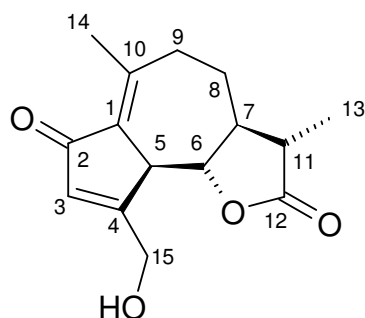


Abbildung 25: Molekülstruktur von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).

Die LC-MS/MS-Analyse im ESI-Positiv-Modus ergab ein Pseudomolekülkation $[M+H]^+$ mit m/z 263. Durch die Detektionen des Natriumadduktionskations $[M+Na]^+$ mit m/z 285 sowie des Kaliumadduktionskations $[M+K]^+$ mit m/z 301 wurde auf eine Gesamtmolekülmasse von 262 g/mol geschlossen (**Abbildung 26**). Die Detektion im ESI-Negativ-Modus ergab ein Pseudomolekülanion $[M-H]^-$ mit m/z 261; Signale von m/z 297 und m/z 307 wurden als Chlorid- ($[M+Cl]^-$) und Formiatadduktanionen ($[M+Formiat]^-$) interpretiert, sodass eine Gesamtmolekülmasse von 262 g/mol bestimmt werden konnte.

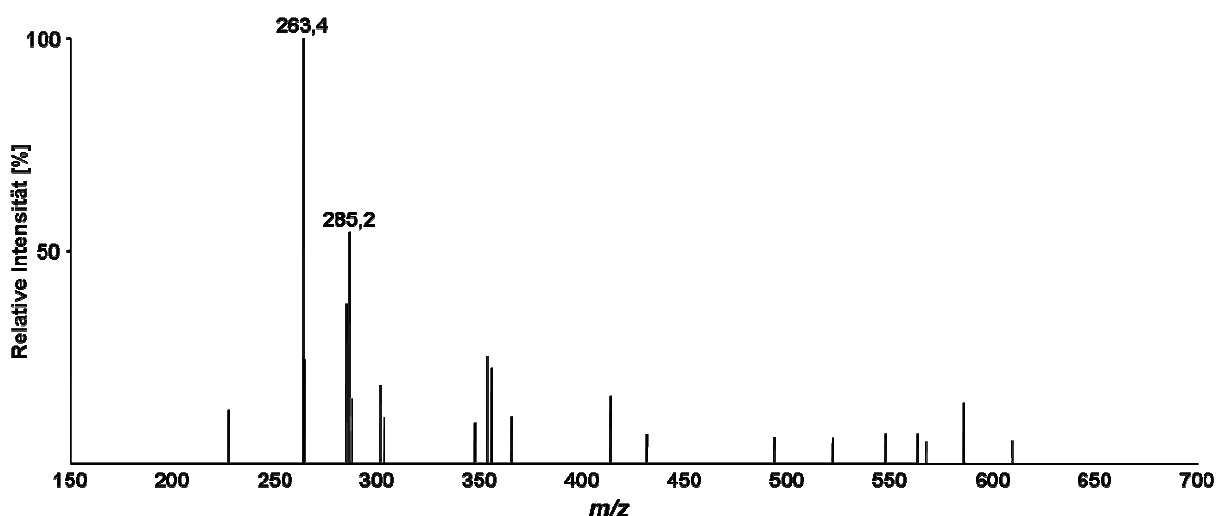


Abbildung 26: ESI(+)-LC-MS-Spektrum von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).

Die NMR-Spektrensätze von **4** waren mit Ausnahme der Positionen 7, 11 und 13 im Sesquiterpenlacton-Molekülgrundgerüst mit denen von 8-Desoxylactucin (**3**) identisch. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (**Abbildung 27**) von **4** zeigt im Gegensatz zu dem von **3** zwei intensive, hochfeldverschobene Protonensignale bei 2,67 und 1,23 ppm. Ersteres entspricht einem Proton, Letzteres einer Methylgruppe, welche beide an C(11) gebunden sind. Das HMQC-NMR-Experiment (**Abbildung 28**) detektierte neben der Methylgruppe an Position 13 eindeutig die koppelnden Protonen am C(8), welche den Beweis für das Vorliegen eines 8-Desoxy-11,13-Dihydro-Sesquiterpenlactonsystems lieferten. Mit Ausnahme der fehlenden Hydroxylgruppe an Position 8 war das Molekül **4** mit dem der Verbindung **1** bezüglich der Konformation strukturell identisch.

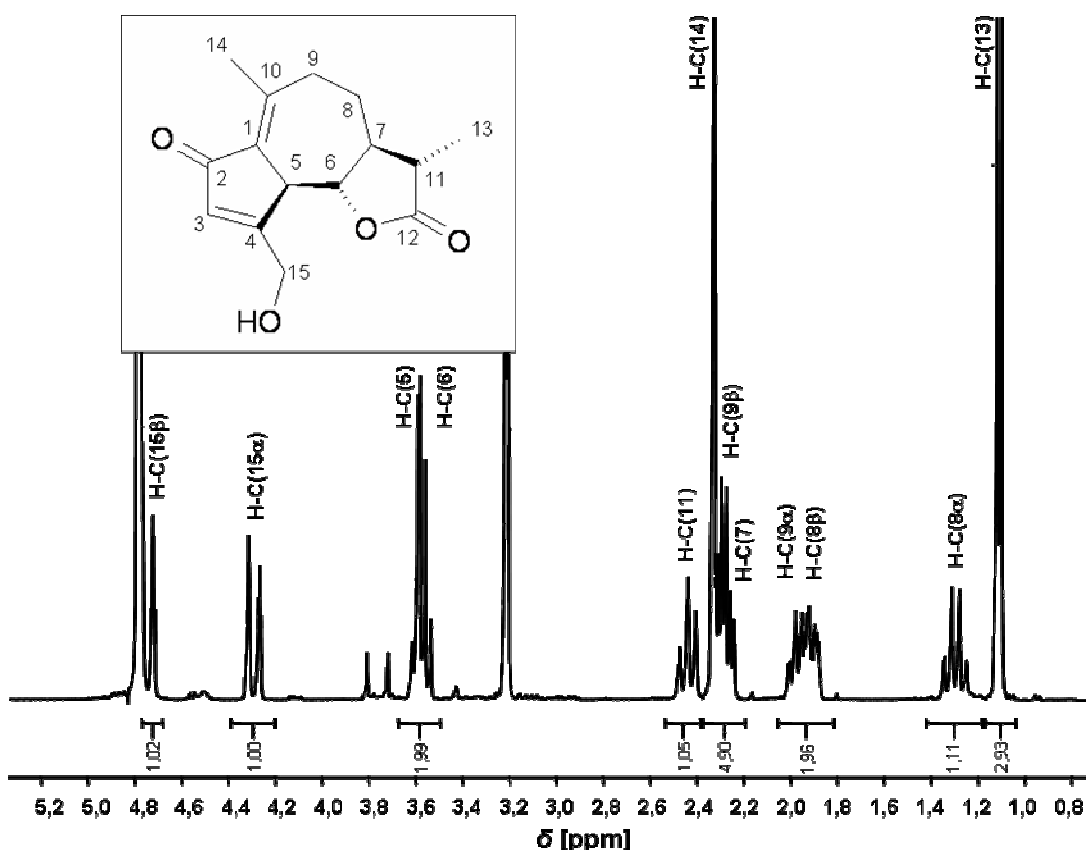


Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, Methanol- d_4) von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (**4**).

Die ermittelten NMR-Daten der aus Fraktion B9 isolierten Verbindung (**4**) korrelieren mit denen von Deng et al. (2001). Die absolute Konfiguration des Stereozentrums am

C(11) konnte mittels ^1H -NMR-Experiment (400 MHz, Methanol- d_4) und via Literaturvergleich mit Deng et al. (2001) bestätigt werden. So betragen die Kopplungskonstanten der Protonen am C(7) im ^1H -Spektrum $J_7 = 13,6$ Hz und am C(11) $J_{11} = 11,9$ Hz. Deng et al. (2001) bestimmten Kopplungskonstanten von $J_{7,11} = 7,7$ Hz für „11 α ,13-Dihydro-8-desoxylactucin“ („11-Epijacquinelin“) und $J_{7,11} = 12,5$ Hz für „11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin“ („Jacquinelin“). Van Beek et al. (1990) beschrieben die Kopplungskonstante von 12,0 Hz als charakteristisch für die 11*S*-Konfiguration; die Kopplungskonstanten von 7 Hz gelten als markant für die 11*R*-Konfiguration. Somit handelt es sich bei der vorliegenden, isolierten Verbindung (4) eindeutig um das 11*S*,13-Isomer und damit um das 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin-Stereoisomer.

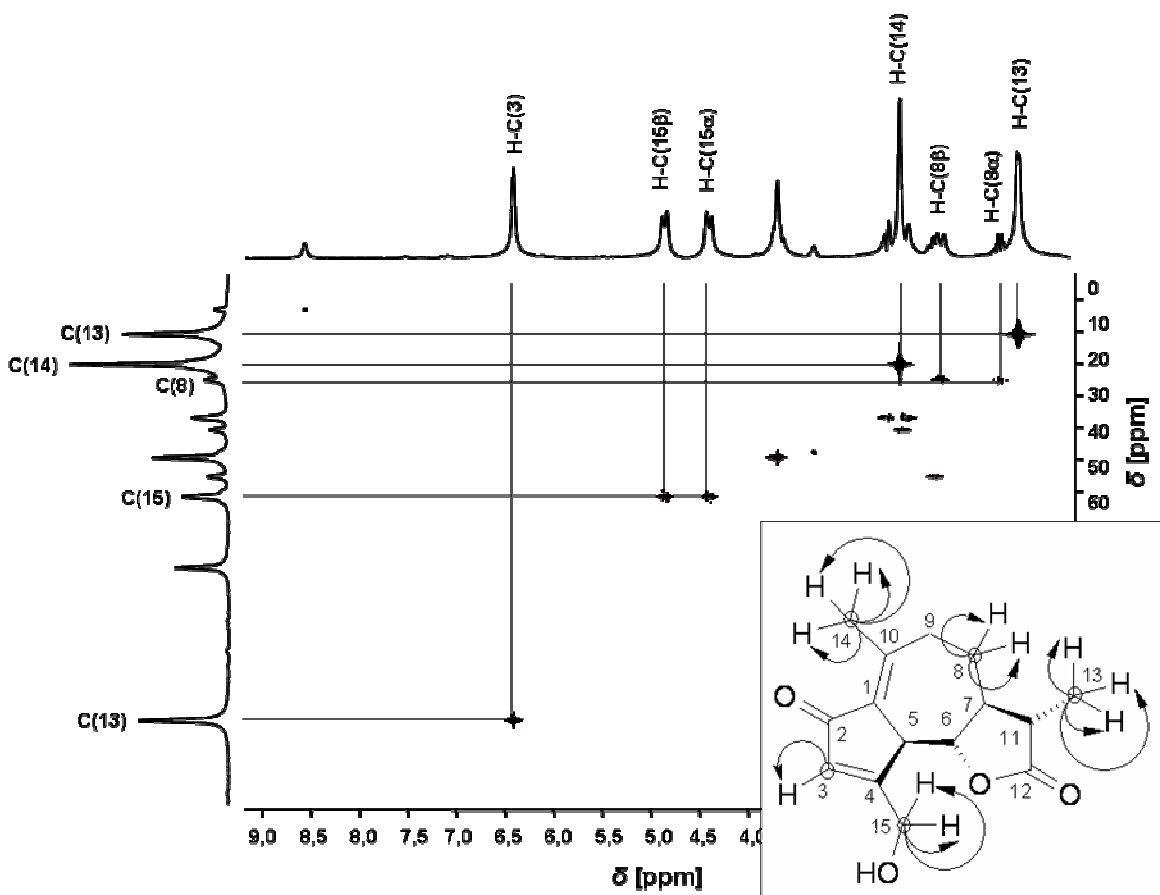


Abbildung 28: HMQC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- d_4) von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydro-1,4-dihydro-2H-pyridin-2-one (4).

Identifizierung von Lactucopicrin (**5**) in Fraktion B13:

Die erhaltene Fraktion B13 wurde als stark bitter charakterisiert und enthielt lediglich die Verbindung **5** (**Abbildung 29**), welche in einer 60/40-(V/V)-Wasser-Acetonitril-Mischung bei einer Wellenlänge von 258 nm ein lokales Absorptionsmaximum aufwies.

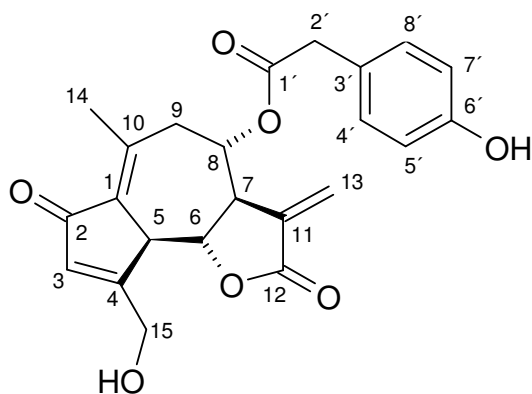


Abbildung 29: Molekülstruktur von Lactucopicrin (5).

Die LC-MS/MS-Analyse im ESI-Positiv-Modus ergab ein Pseudomolekülkation $[M+H]^+$ mit m/z 411. Durch die Detektionen des Ammoniumadduktionskations $[M+NH_4]^+$ mit m/z 428 sowie des Natriumadduktionskations $[M+Na]^+$ mit m/z 433 und des Kaliumadduktionskations $[M+K]^+$ mit m/z 449 wurde eine Gesamtmolekülmasse von 410 g/mol bestimmt (**Abbildung 30**). Die Detektion im ESI-Negativ-Modus zeigte ein Pseudomolekülanion $[M-H]^-$ mit m/z 409. Signale von m/z 391, m/z 445 und m/z 455 wurden als Wasserabspaltung ($[M-H_2O-H]^-$), Chlorid- ($[M+Cl]^-$) und Formiatadduktionsanionen ($[M+Formiat]^-$) interpretiert, sodass eine Gesamtmolekülmasse von 410 g/mol bestätigt werden konnte.

Die NMR-Spektrensätze von **5** enthielten zahlreiche identische Signale mit denen des Lactucins (**2**), was auf das Vorliegen eines Lactucin-Derivates hindeutete. Die im 1H -NMR-Spektrum bei 6,75 ppm und 7,14 ppm detektierten Protonen H-C(5'/7') und H-C(4'/8') zeigten im COSY-Spektrum ausgeprägte skalare Kopplungen, welche aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen als Doppelbindungen identifiziert wurden. Aufgrund der Kopplungskonstanten von 7,8 Hz und 8,3 Hz zwischen den entsprechenden Protonensignalen im 1H -NMR-Spektrum wurden die Konfigurationen dieser Doppelbindungen als *cis*-ständig bestimmt, sodass auf das Vorliegen eines Benzolringes geschlossen werden konnte.

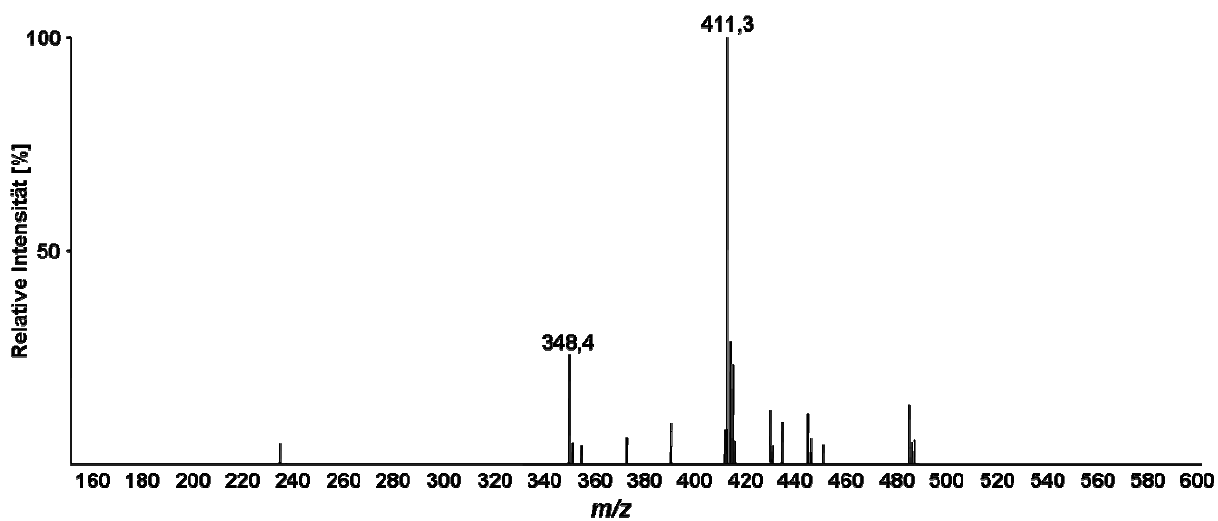


Abbildung 30: ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Lactucopicrin (5).

Ein Ester-Carbonyl-Signal (C-1') bei 170 ppm auf der ^{13}C -Skala (Ordinatenachse, **Abbildung 31**) zeigt in Korrelation mit den Protonensignalen von 3,82 ppm (H-C(8)) und 4,62 ppm (H-C(2')) auf der ^1H -Skala (Abszissenachse, **Abbildung 31**) im HMBC-NMR-Spektrum die Kopplung bzw. die Esterbindung zwischen einer Acetoxygruppe und dem Kohlenstoffatom C(8) des Sesquiterpenlactons. Somit ist die *p*-Hydroxyphenylelessigsäure eindeutig an der sekundären Hydroxylgruppe am C(8)-Atom durch Esterbindung positioniert, sodass die „Lactukopikrin“-Strukturformel von Michl et al. (1960), welche die *p*-Hydroxyphenylelessigsäuregruppierung an der primären Hydroxylgruppe am C(15)-Atom zuordneten, nicht bestätigt werden kann.

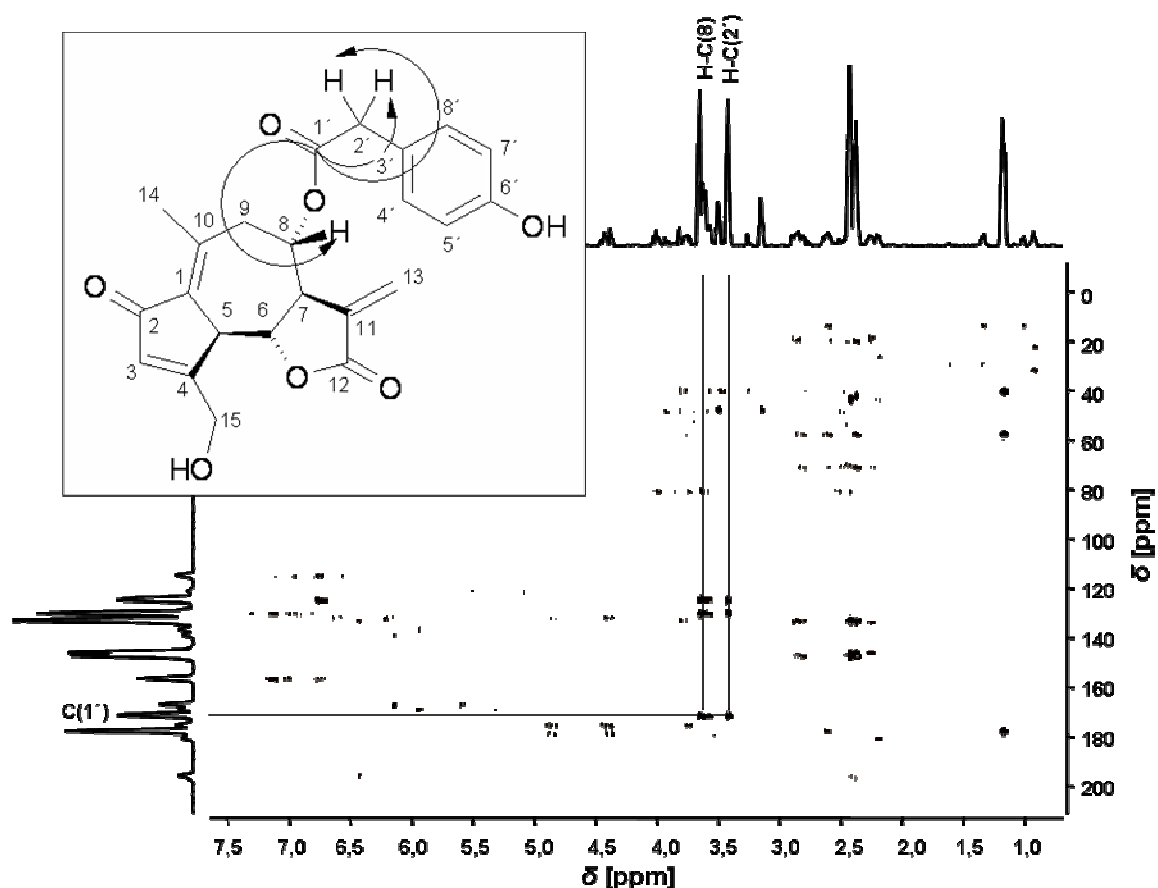


Abbildung 31: HMBC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- d_4) von Lactucopicrin (5).

Die Stereochemie von Lactucopicrin konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ -, COSY-NMR- sowie HMBC-NMR-Experimenten (400 MHz, Methanol- d_4) und via Literaturvergleich (Ren et al. 2003) bestimmt werden. Aufgrund der Resultate der durchgeführten Experimente handelt es sich bei der vorliegenden isolierten Verbindung eindeutig um Lactucopicrin (5) (**Abbildung 29**).

3.1.1.3 Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) der Fraktion C und Identifizierung von Bitterstoffen

Um die Bitterstoffe von den süß schmeckenden Zuckern abzutrennen, wurde die Trockenmasse der Wasserfraktion C vollständig in Wasser gelöst und zunächst mittels Flash-Chromatographie an einer XAD-2®-Stationärphase unter Anwendung eines Wasser-Methanol-Gradienten fraktioniert. Die Wasserfraktion wurde dadurch in elf XAD-2®-Fraktionen C1-C11 durch Elution mit Methanol/Wasser-Anteilen (0/100-

100/0) aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der relativen Intensitäten der Bitterkeit im Vergleich durch ein Sensorikpanel.

Die sensorische Analyse der elf XAD-2®-Fraktionen zeigte, dass diese Subfraktionen allesamt bitter waren (**Tabelle 3**). So wurden die Fraktionen C5, C6 und C9 mit Werten größer 3 als am stärksten bitter bewertet. Eine Überprüfung der einzelnen XAD-2®-Fraktionen via analytischer RP-HPLC-DAD-Spektroskopie ergab, dass die Fraktionen C5 und C6 qualitativ identisch zusammengesetzt waren und sich nur in den Gehalten der einzelnen Inhaltsstoffe unterschieden. Folglich resultierte die Bitterkeit dieser beiden Fraktionen aus den gleichen Verbindungen, sodass beide Fraktionen zur Fraktion C5/6 vereinigt werden konnten. Die kräftige Bitterkeit der Fraktion C9 ließ sich durch das Vorhandensein von Verbindungen erklären, die bereits in der Ethylacetatfraktion B identifiziert wurden. Somit lag der Fokus bei der Lokalisierung unbekannter Chicorée-Bitterstoffe auf der XAD-2®-Fraktion C5/6.

Tabelle 3: Geschmacksqualitäten und relative Intensitäten der Bitterkeit isolierter XAD-2®-Eluat-Fraktionen (Methanol/Wasser 0/100-100/0; V/V) der Chicorée-Wasserfraktion

Flash-Chromatographie XAD-2®- Eluat-Fraktionen	Geschmacksqualität	Relative Intensität der Bitterkeit ^a
C1	bitter, süß	1,7
C2	bitter, süß	0,2
C3	adstringierend, bitter	0,4
C4	adstringierend, bitter	1,6
C5	adstringierend, bitter	3,1
C6	adstringierend, bitter	3,8
C7	bitter	2,7
C8	bitter	3,0
C9	bitter	4,3
C10	bitter	2,9
C11	bitter	1,5

^a Bestimmungen in 1%igem ethanolischen *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5) mittels Half-Mouth-Test.

Die aus der Chicorée-Wasserfraktion C gewonnene XAD-2®-Fraktion C5/6 wurde vollständig in Wasser aufgenommen und mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase unter Anwendung eines Wasser/Acetonitril-Gradienten in die zwölf Fraktionen C5/6-1 bis C5/6-12 aufgetrennt (**Abbildung 32**) und durch Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse (Frank et al. 2001) in ihren relativen Geschmacksaktivitäten gewichtet. Hierzu wurden die einzelnen gefriergetrockneten HPLC-Fraktionen in gleichen Volumina Sensorikwasser gelöst und anschließend stufenweise um den Faktor 2 verdünnt. Im Anschluss wurden die zu verkostenden Proben den Sensorikern in der Reihe steigender Konzentrationen angeboten. Jede einzelne Verdünnungsstufe wurde mehrfach von dem Sensorikpanel im Vergleich zu einem Blindwert aus *Evian*®-Sensorikwasser in einem sogenannten Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004) verkostet. Die Verdünnungsfaktoren jeder einzelnen Fraktion, bei der gerade noch eindeutig ein Bittergeschmack gegenüber der Blindprobe erkannt wurde, wurden gemittelt und als Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVFs) angegeben. Simultan wurde die Geschmacksqualität der jeweiligen Fraktion evaluiert.

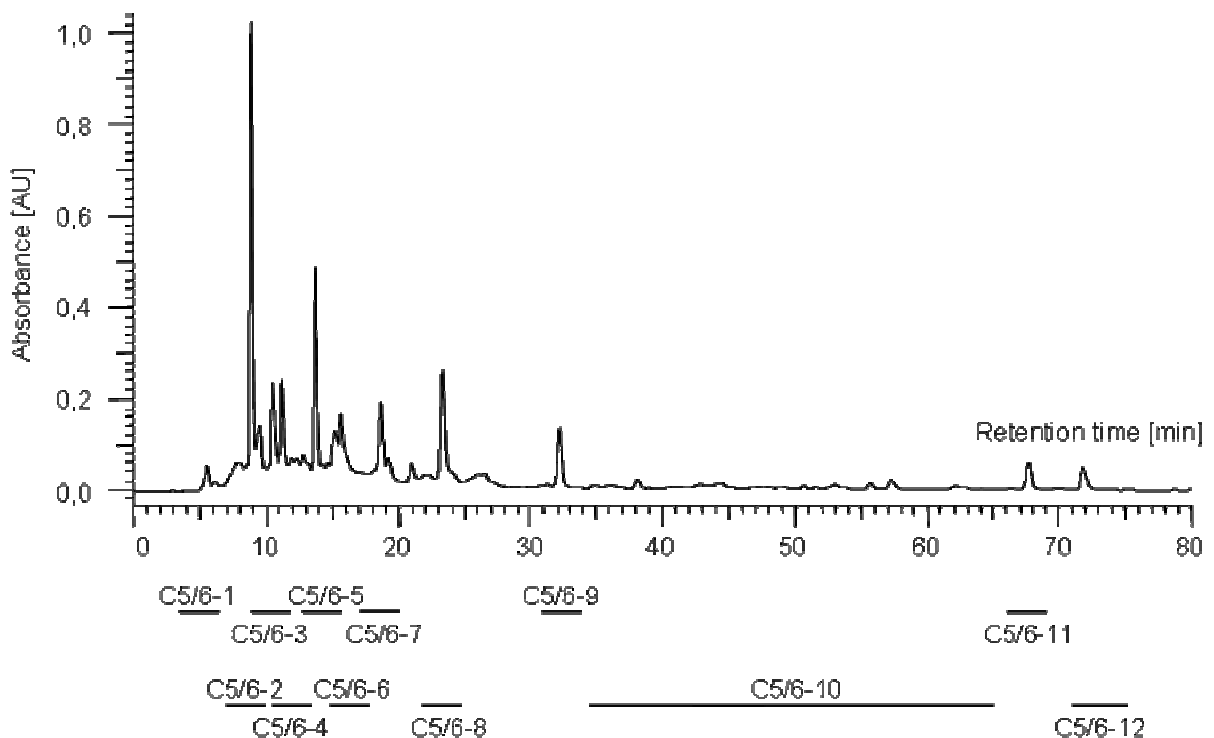


Abbildung 32: Präparatives RP-HPLC-UV/VIS-Chromatogramm ($\lambda = 258 \text{ nm}$) der XAD-2®-Fraktion C5/6.

Die Ergebnisse der Geschmacksverdünnungsanalyse zeigten, dass insgesamt sechs der zwölf Fraktionen durch Bitterkeit gekennzeichnet waren (**Tabelle 4**). Die Qualitäten der Bitterkeit dieser sechs Fraktionen wurden durch die Panelisten als identisch charakterisiert, jedoch bezüglich der Bitterkeit der Fraktion B als qualitativ verschieden eingestuft. Mit einem GVF für Bitterkeit von jeweils 16 zeigten die Fraktionen C5/6-5 und C5/6-9 die größten Effekte, gefolgt von den Fraktionen C5/6-7, C5/6-8 und C5/6-11 mit GVFs von jeweils 8 sowie der Fraktion C5/6-12 mit einem GVF von 4. Die Fraktionen C5/6-1, C5/6-3, C5/6-4, C5/6-6 und C5/6-10 waren geschmacklos. Mit einer stark aufrauenden Adstringenz präsentierte sich die Fraktion C5/6-2, welche einen GVF von 16 erreichte.

Tabelle 4: Geschmacksqualitäten und Geschmacksverdünnungsfaktoren der HPLC-Fraktionen C5/6-1 bis C5/6-12

HPLC-Fraktion ^a	Geschmacksqualität ^b	GVF ^b	Identifizierte Verbindung ^c
C5/6-1	geschmacklos	< 1	
C5/6-2	aufrauende Adstringenz	16	7
C5/6-3	geschmacklos	< 1	
C5/6-4	geschmacklos	< 1	
C5/6-5	bitter	16	6
C5/6-6	geschmacklos	< 1	
C5/6-7	bitter	8	
C5/6-8	bitter	8	
C5/6-9	bitter	16	
C5/6-10	geschmacklos	< 1	
C5/6-11	bitter	8	
C5/6-12	bitter	4	

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 32**. ^b Bestimmungen mittels Half-Mouth-Test. ^c Angaben gemäß **Abbildung 33 und 37**.

Die Verbindungen mit den höchsten GVF's wurden im Folgenden mit HPLC-DAD-Spektroskopie sowie HPLC-MS/MS- und NMR-Experimenten in deren chemischer Struktur identifiziert.

Die Fraktionen C5/6-2 und C5/6-5 (**Abbildung 32**) beinhalteten jeweils nur eine Substanz, welche jeweils mittels instrumentell-analytischen Techniken als Cichoriosid B (**6**) und Cichoriensäure (**7**) identifiziert werden konnten. Die Molekülstrukturen beider Verbindungen wurden im Folgenden durch massenspektrometrische und kernresonanzspektroskopische Untersuchungen identifiziert.

Identifizierung von Cichoriensäure (**7**) in Fraktion C5/6-2:

Die erhaltene Fraktion C5/6-2 wurde als stark aufrauend-adstringierend charakterisiert und enthielt alleinig die Verbindung **7** (**Abbildung 33**). Die Substanz **7** besaß im DAD-Spektrum bei Wellenlängen von 244, 300 sowie 330 nm lokale Absorptionsmaxima.

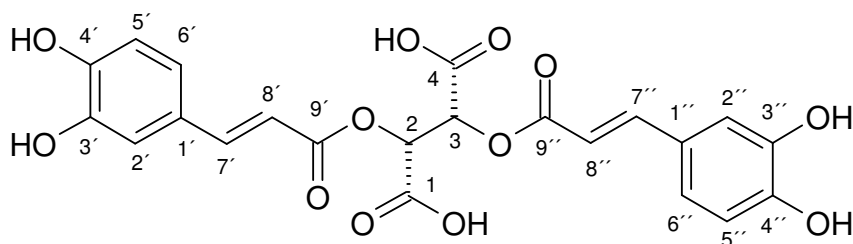


Abbildung 33: Molekülstruktur von Cichoriensäure (7).

Die LC-MS/MS-Analyse im ESI-Negativ-Modus ergab ein Pseudomolekülanion $[M-H]^-$ mit m/z 473 (**Abbildung 34**). Im ESI-Positiv-Modus war die Detektion des Pseudomolekülkations $[M+H]^+$ nicht möglich, jedoch konnte durch die Detektion des Natriumadduktions $[M+Na]^+$ mit m/z 497 (**Abbildung 35**) eine Gesamtmolekülmasse von 474 g/mol bestimmt werden.

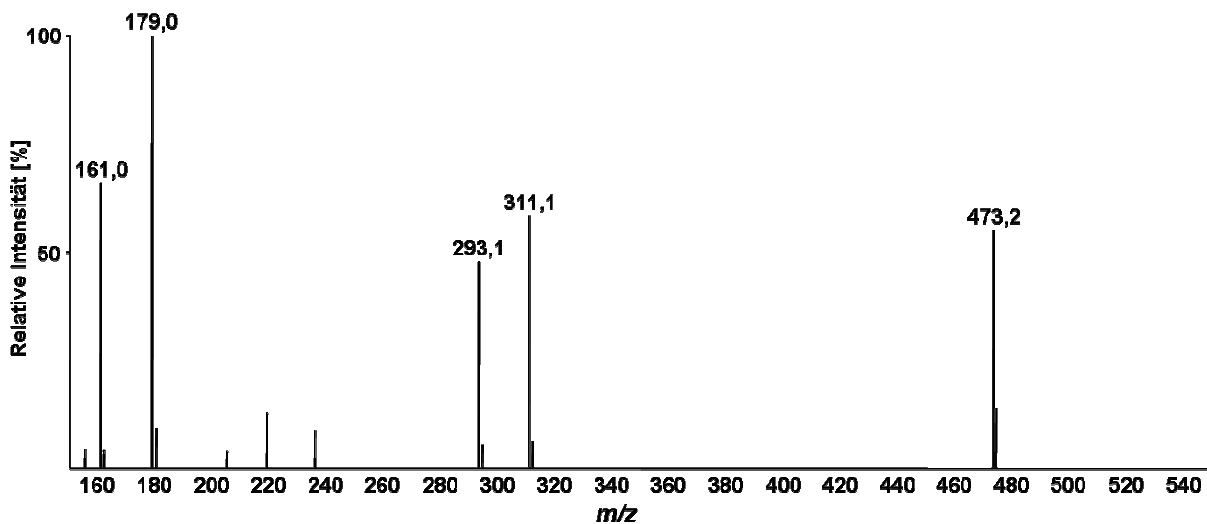


Abbildung 34: ESI(-)-LC-MS-Spektrum von Cichoriensäure (7).

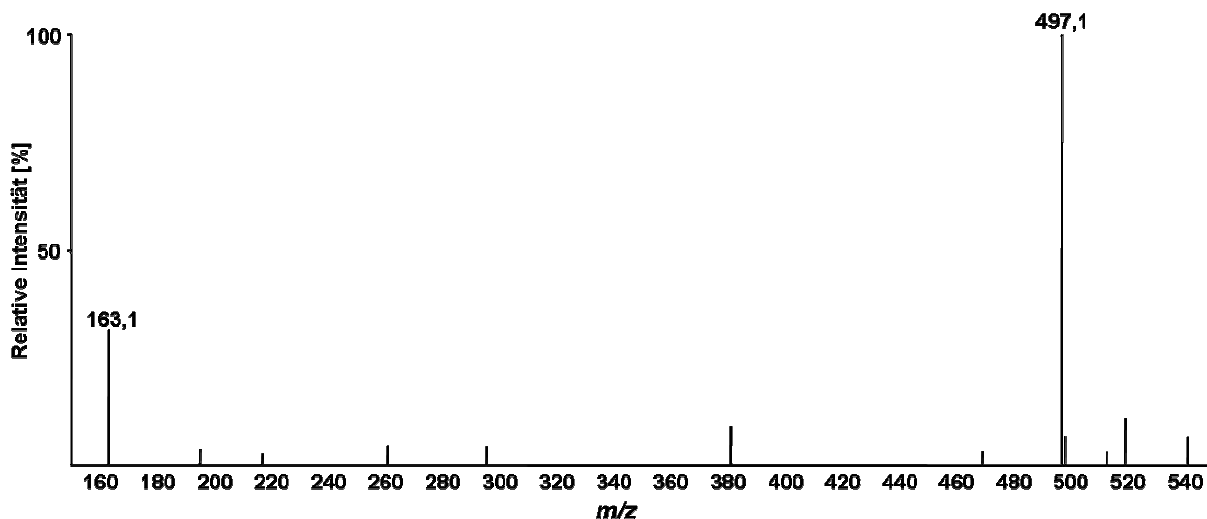


Abbildung 35: ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Cichoriensäure (7).

Mittels COSY-NMR-Experiment (**Abbildung 36**) wurden zwischen C(7')-C(8') und C(7'')-C(8'') skalare Protonenkopplungen detektiert und diese aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen von 6,39 ppm (H-C(8'/8'')) und 7,67 ppm (C(7'/7'')) als Doppelbindungen identifiziert. Aufgrund der Kopplungskonstanten von 15,9 Hz zwischen den entsprechenden Protonensignalen im ^1H -NMR-Spektrum konnten die Konfigurationen dieser Doppelbindungen als *trans*-ständig bestimmt werden.

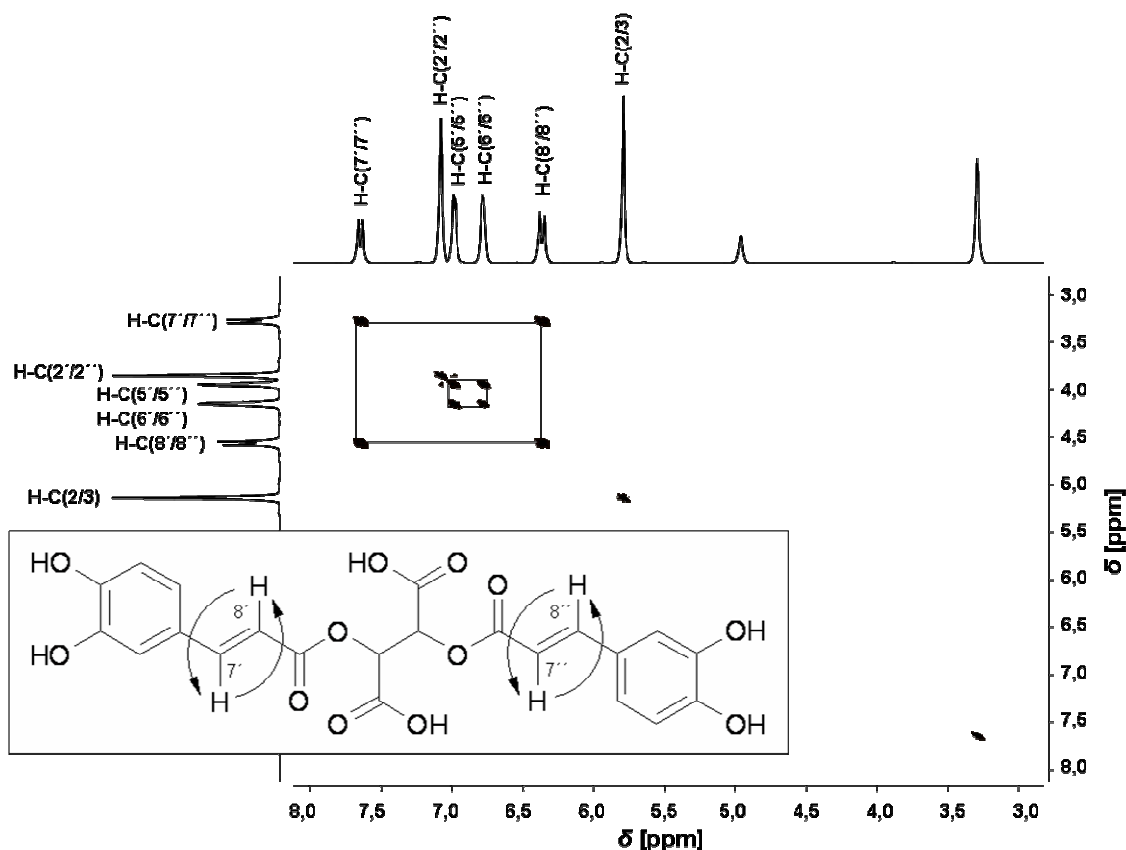


Abbildung 36: COSY-NMR-Spektrum (500 MHz, Methanol- d_4) von Cichoriensäure (7).

Durch Anwendung von massenspektrometrischen sowie DAD-, 1D- und 2D-NMR-spektroskopischen Experimenten im jeweiligen Vergleich mit der kommerziell verfügbaren Referenzsubstanz wurde die Verbindung **7** als der zweifache Kaffeesäureester der Weinsäure, die *(2R,3R)*-2,3-Bis[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]butan-1,4-disäure identifiziert. Diese Verbindung ist unter dem Trivialnamen „Cichoriensäure“ oder „Chicoréesäure“ bekannt.

Cichoriensäure gehört zur Verbindungsklasse der Phenylpropanoide und wurde erstmalig 1958 nach Heißwasserextraktion von Zichorienblättern isoliert und identifiziert (Scarpati et al. 1958). Die ermittelten Absorptionsmaxima der isolierten Verbindung **7** entsprechen denen der Cichoriensäure, wie sie Scarpati et al. (1958) und Chkhikvishvili et al. (2001) publiziert haben. Die ^1H -NMR-Daten von **7** bestätigen die Ergebnisse von Sobolev et al. (2005). Die Geschmacksaktivität der Cichoriensäure war bislang nicht literaturbekannt.

Identifizierung von Cichoriosid B in Fraktion C5/6-5:

Die Untersuchung der Fraktion C5/6-5 mittels RP-HPLC-DAD ließ das Vorliegen eines Sesquiterpenlactonderivats vermuten: Das DAD-Spektrum mit einem Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm zeigte, dass die mit einer Retentionszeit von 5,2 min eluierende Verbindung **6** (**Abbildung 37**) analog der Guaiansesquiterpenlactone **1**, **2**, **3**, **4** und **5** ein Absorptionsmaximum bei 258 nm besitzt.

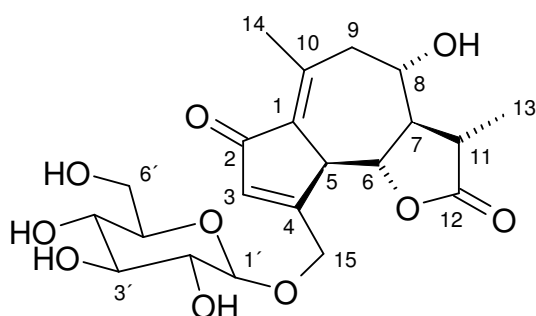


Abbildung 37: Molekülstruktur von Cichoriosid B (6).

Aus den massenspektrometrischen Untersuchungen ging die Molekülmasse von 440 g/mol hervor. Sichtbar im positiven ESI-Modus waren das Pseudomolekülkation $[M+H]^+$ mit m/z 441, das Ammoniumaddukt kation $[M+NH_4]^+$ mit m/z 458, das Natriumaddukt kation $[M+Na]^+$ mit m/z 463 sowie das Kaliumaddukt kation $[M+K]^+$ mit m/z 479 (**Abbildung 38**). Im negativen ESI-Modus waren die Signale des Pseudomolekülanions $[M-H]^-$ mit m/z 439, das Chloraddukt anion $[M+Cl]^-$ mit m/z 475 und das Formiataddukt anion $[M+HCOO]^-$ mit m/z 485 als Hauptfragment detektierbar (**Abbildung 39**).

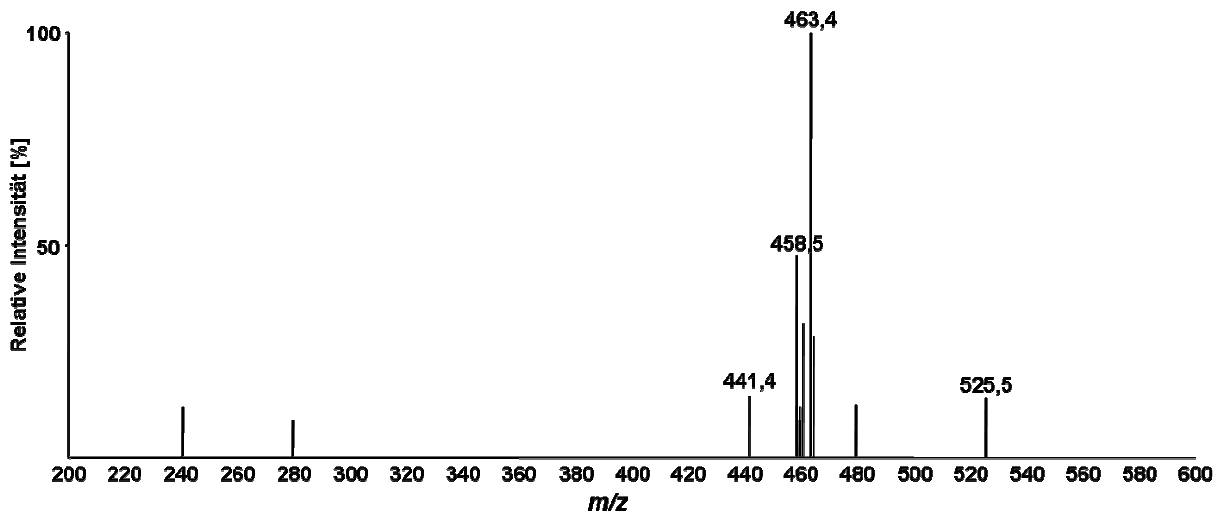


Abbildung 38: ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Cichoriosid B (6).

Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) im positiven ESI-Modus zeigte bei Fragmentierung des Pseudomolekülkations $[M+H]^+$ (m/z 441) die Abspaltung von Glucose $[M-Glc+H]^+$ (m/z 279) sowie die Eliminierung von Wassermolekülen $[M-Glc-H_2O+H]^+$ (m/z 261) und $[M-Glc-2H_2O+H]^+$ (m/z 243) (**Abbildung 40**). Das Molekülfragment m/z 279, welches die Eigenschaften zu weiteren Wasserabspaltungen besaß und ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 258 nm zeigte, legte die Vermutung nahe, dass die Verbindung **6** neben Glucose das Sesquiterpenlacton Dihydrolactucin (**1**) als Aglykon im Molekülkonstrukt enthielt.

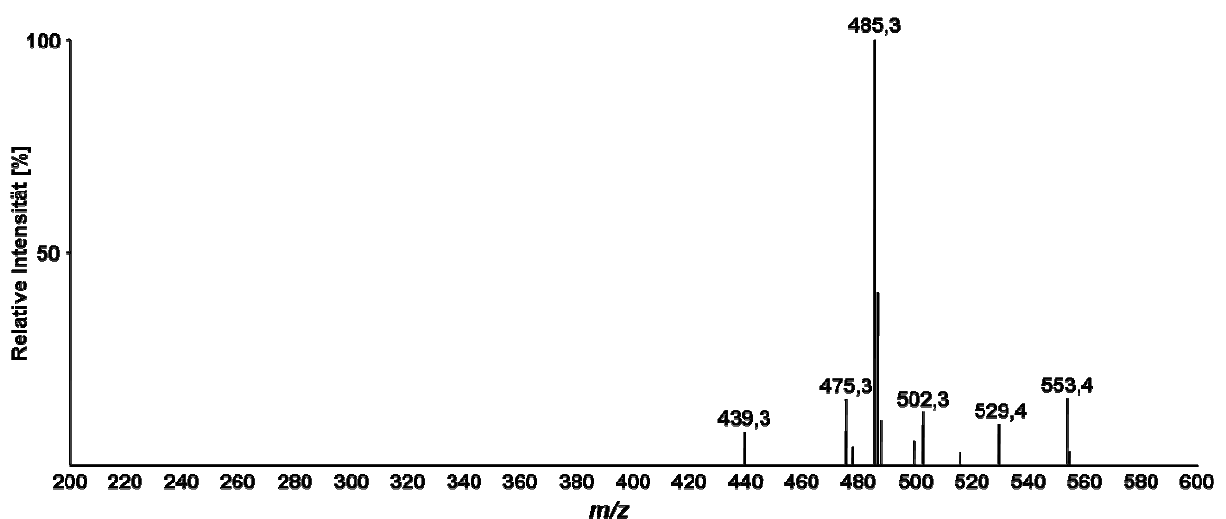


Abbildung 39: ESI(-)-LC-MS-Spektrum von Cichoriosid B (6).

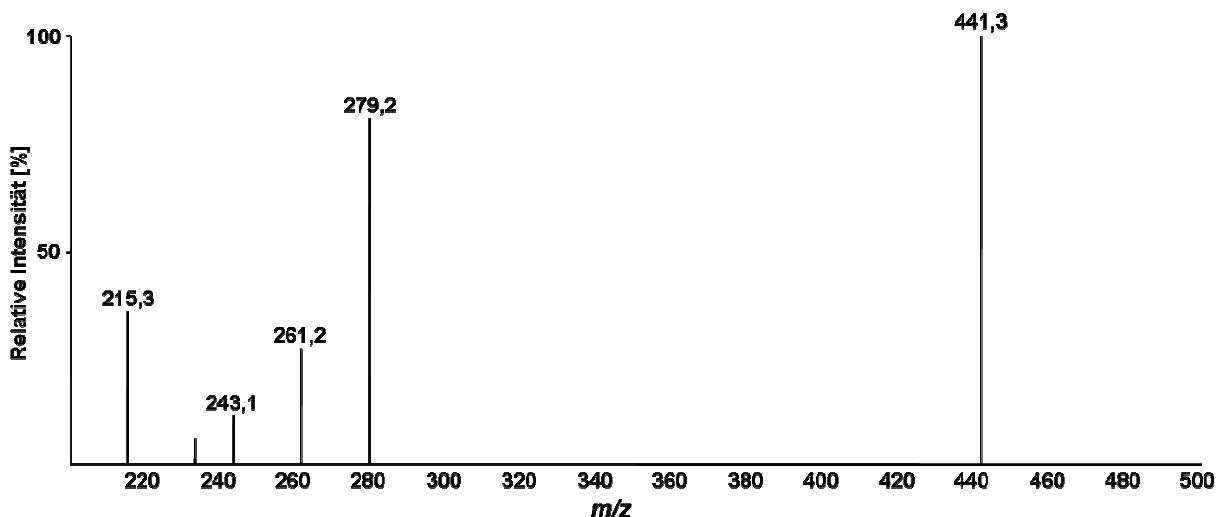


Abbildung 40: ESI(+)-LC-MS/MS-Spektrum (m/z 441) von Cichoriosid B (**6**).

Ein Vergleich der ermittelten Molekülmasse von 440 g/mol (**6**) mit literaturbekannten Sesquiterpenlactonglycosiden wies auf die Struktur des Cichoriosid B (**6**) hin (Seto et al. 1988). Es handelte sich dabei um das Dihydrolactucin (**1**) mit einer β -Glucose an Position 15 (vgl. **Abbildung 16**). Zur detaillierten Strukturaufklärung wurden ^1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektren in fünffach deuteriertem Pyridin aufgenommen, was einen direkten Vergleich mit Literaturdaten (Seto et al. 1988; Kisiel et al. 1996) ermöglichte.

Die Methylgruppe an Position 14 konnte im ^1H -NMR-Spektrum (**Abbildung 41**) aufgrund ihrer geringen chemischen Verschiebung (2,45 ppm) dem Integral von 3 und der Singulett-Multiplizität zugeordnet werden. Die zweite Methylgruppe an Position 13 zeigte ebenfalls eine typische geringe chemische Verschiebung von 1,65 ppm und ein Integral für drei Protonen. Im Unterschied zu Position 14 koppelten die Protonen noch mit dem Proton an Position 11, sodass ein Dublett sichtbar war. Mit einem breiten Singulett-Signal hatte das Proton an Position 3 die Intensität 1. Mit einer chemischen Verschiebung von 6,94 ppm hatte dieses Proton nur eine geringe Abschirmung, was für olefinische Verbindungen charakteristisch ist. Das *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*-Experiment (DEPT) wies bei der ^{13}C -Verschiebung 68,4 ppm eine Methylengruppe nach. Kopplungen zur direkten Nachbarschaft konnten nicht festgestellt werden. Es handelte sich somit um das Kohlenstoffatom an Position 15.

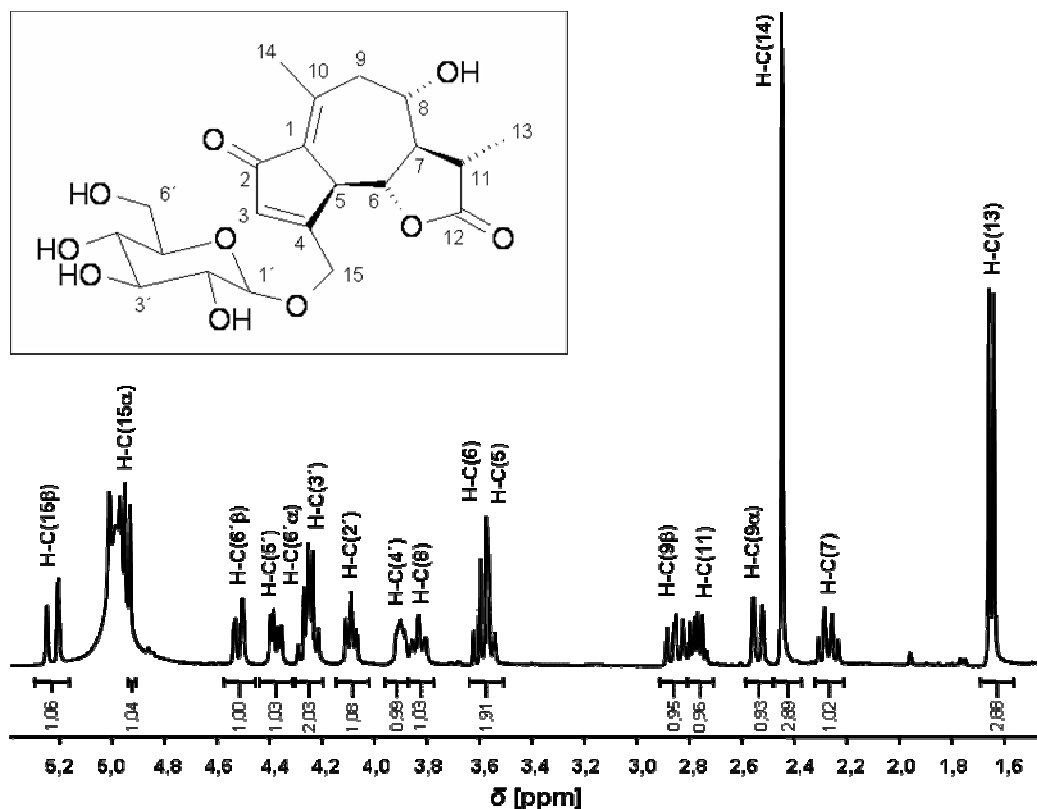


Abbildung 41: ^1H -NMR-Spektrum (Auszug) von Cichoriosid B (6).

Der Zucker konnte aufgrund seiner typischen Verschiebungen zwischen 3,9 und 4,9 ppm und den Kopplungen im ^1H - ^1H -Verschiebungskorrelations-Experiment (CO-SY) sowie seiner Kopplungskonstanten identifiziert werden. Die Kopplungskonstante des anomeren Protons lag bei 7,7 Hz, was auf eine Axial-Axial-Stellung der Protonen hinwies und die β -Konformation der Glucose bestätigte. Im *Heteronuklearen inversen Long-Range-Verschiebungskorrelations-Experiment* (HMBC) war eine Kopplung des Kohlenstoffatoms an Position 1' mit den Protonen an Position 15 α und 15 β erkennbar, wodurch die glycosidische Verknüpfung des Sesquiterpenlactonmoleküls an Position 15 nachgewiesen wurde (**Abbildung 42**).

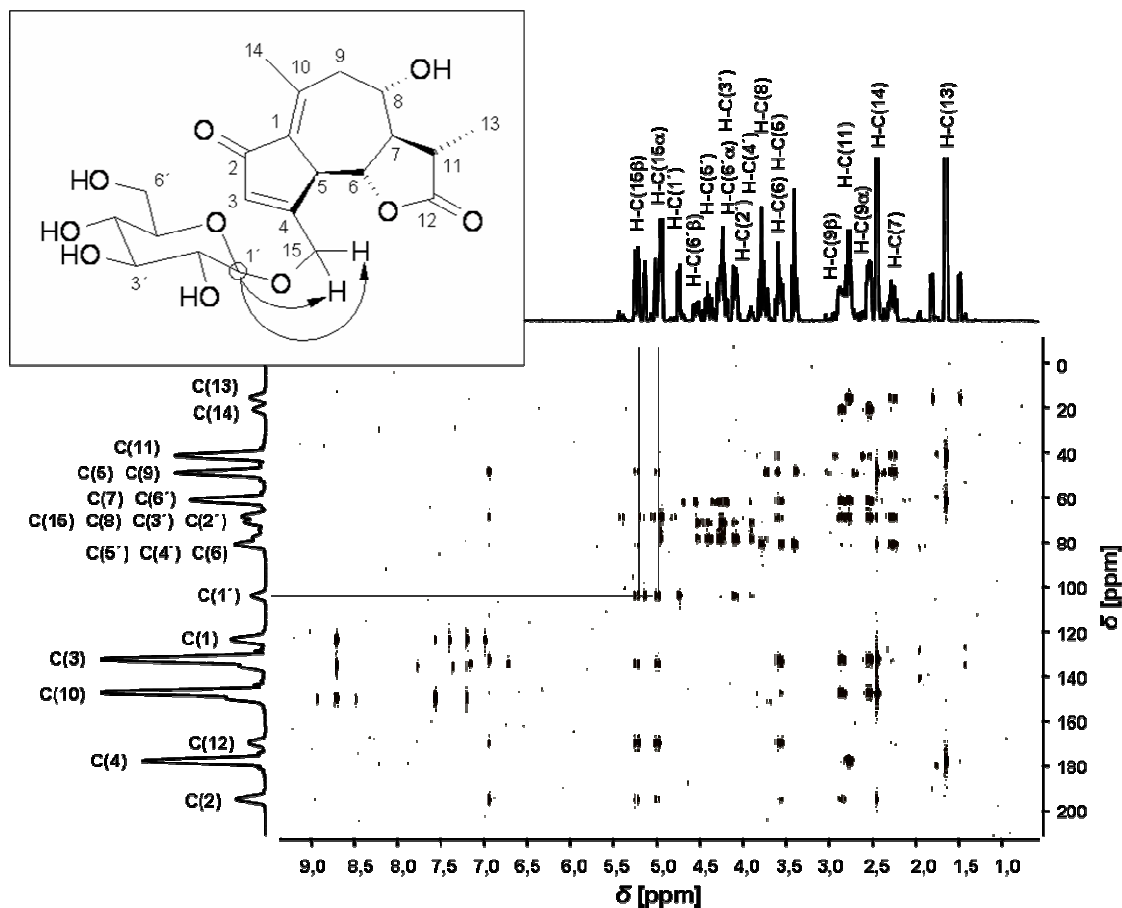


Abbildung 42: HMBC-Spektrum von Cichoriosid B (6).

Die weiteren Kohlenstoffatome konnten aufgrund der bereits zugeordneten Positionen, ihren Kopplungen zur direkten Nachbarschaft (COSY) und ihrer Long-Range-Kopplungen (HMBC) zugewiesen werden. Die ^{13}C -Verschiebungen waren mit den Werten von Seto et al. (1988) nahezu identisch. Die ^1H -Verschiebungen entsprachen den von Kisiel et al. (1996) angegebenen Werten.

Dass es sich bei der glycosidischen Bindung um die β -Konformation der Glucose handelte, wurde durch ein enzymatisches Experiment bestätigt: Bei diesem Versuch wurden die Substrat- und Stereospezifität der β -Glucosidase ausgenutzt, welche ausschließlich β -glycosidisch verknüpfte Glucose durch Hydrolyse abzuspalten vermag. Als Untersuchungsmaterial diente die aus Chicorée isolierte Fraktion C. Nach deren Enzymbehandlung war das Cichoriosid B (6) kaum noch nachweisbar, wohingegen die Konzentration des Dihydrolactucins (1) anstieg (**Abbildung 43**). Somit konnte das Vorliegen der β -Konformation der Glucose innerhalb des Cichoriosid-B-Moleküls zweifelsfrei bestätigt werden.

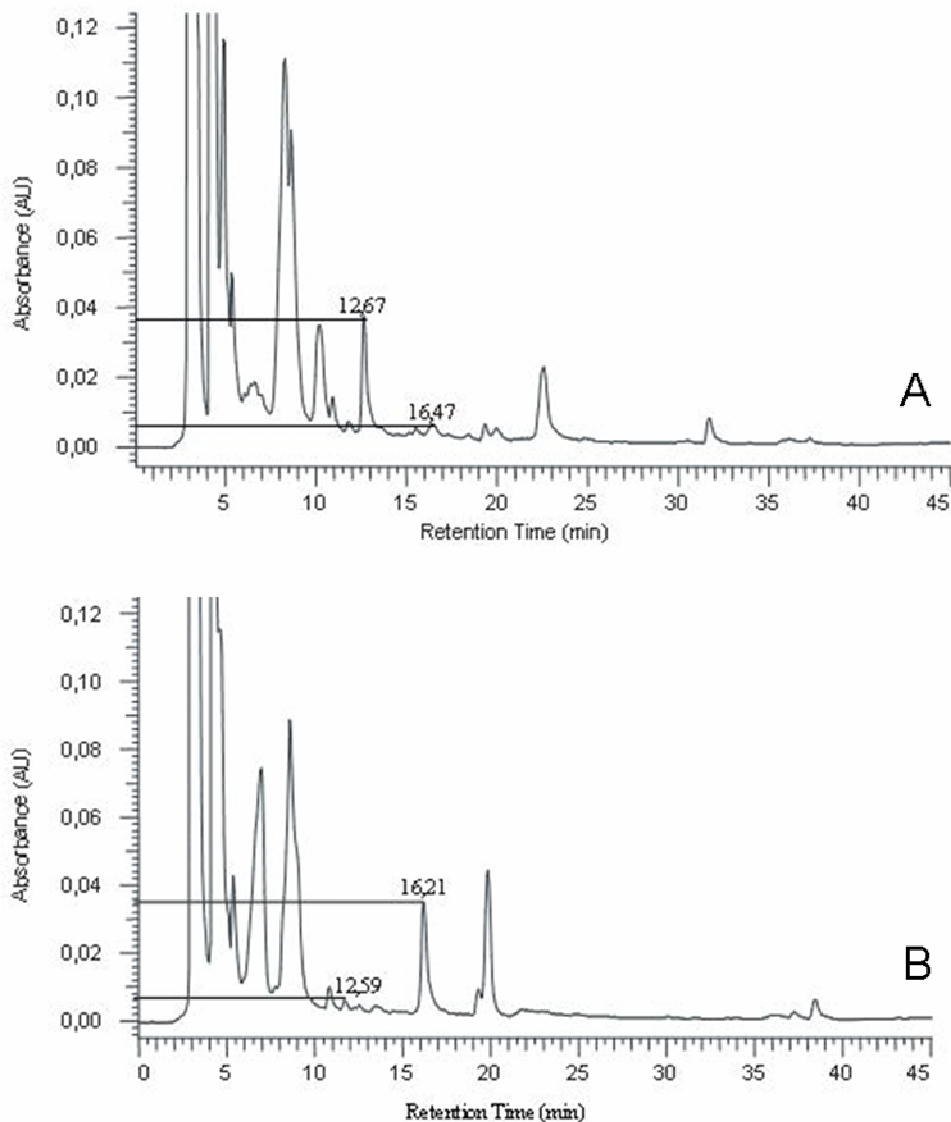


Abbildung 43: Analytische RP-HPLC-DAD-Chromatogramme ($\lambda = 258 \text{ nm}$) der wässrigen Chicorée-Fraktion C vor (A) bzw. nach (B) Behandlung mit β -Glucosidase: Cichoriosid B (6) (RT 12,6-12,8 min), Dihydro-lactucin (1) (RT 16,2-16,5 min).

Aufgrund der aufgeführten Spektreninterpretation, der Vergleiche mit Literaturdaten (Seto et al. 1988; Kisiel et al. 1996) sowie durch die enzymatische Konformationsbestätigung konnte die Struktur des Cichoriosid B (6) aus Chicorée-Salatblättern bestätigt werden. Somit wurde das Sesquiterpenlactonglycosid Cichoriosid B (6) erstmalig in Chicorée-Salatblättern identifiziert. Sämtliche bis dato bekannten Literaturreferenzen bezogen sich ausschließlich auf die Identifizierung in *Cichorium*-Wurzelmaterialien.

3.1.2 Psychophysikalische Evaluation gereinigter Chicorée-Bitterstoffe

3.1.2.1 Geschmacksschwellenwertkonzentrationen

Die Geschmacksschwellenwerte für die bitteren Sesquiterpenlactone **1-6** wurden mittels Half-Mouth-Test bestimmt. Die Qualitäten der Bitterkeiten aller fünf Lactone (**1-5**) sowie die Bitterqualität des Glycosids (**6**) bewerteten die Panelisten als identisch. Die Schwellenwerte der Lactone Dihydrolactucin (**1**) (10,0 µmol/l), Lactucin (**2**) (7,0 µmol/l), 8-Desoxylactucin (**3**) (20,2 µmol/l) und 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) (9,8 µmol/l) lagen in einem Konzentrationsbereich von 7,0 bis 20,2 µmol/l und waren somit nahezu gleich. Von den Lactonen **1, 2, 3** und **4** zeigte Lactucopicrin (**5**) den mit Abstand geringsten Bitterschwellenwert von 2,5 µmol/l. Die Betrachtung der Schwellenwerte der Lactone **2** und **5** (**Tabelle 5**) erlaubte die Schlussfolgerung, dass der deutlich verringerte Bitterschwellenwert von **5** sowie dessen Bitterintensität von der an der Hydroxylgruppe des C-8-Atoms estergebundenen *p*-Hydroxyphenyllessigsäuregruppe hervorgerufen werden.

Tabelle 5: Schwellenwerte identifizierter Chicorée-Bitterstoffe

Numerische Bezeichnung der Verbindung ^a	Name der identifizierten Verbindung	Schwellenwertkonzentration ^b	
		[µmol/l]	[ppm] ^c
1	11 β ,13-Dihydrolactucin	10,0	2,8
2	Lactucin	7,0	1,9
3	8-Desoxylactucin	20,2	5,3
4	11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin	9,8	2,3
5	Lactucopicrin	2,5	1,0
6	Cichoriosid B	53,4	23,5

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 16, 20, 24, 25, 29 und 37**. ^b Schwellenwerte für Bitterkeit in *Evi-an*®-Sensorikwasser (pH 6,5); Bestimmungen mittels Half-Mouth-Test. ^c Konzentrationsangaben entsprechen [mg/kg] und [mg/l].

Das Cichoriosid B (**6**) (53,4 µmol/l) zeigte bei Betrachtung aller untersuchten Derivate den mit Abstand höchsten Schwellenwert (**Tabelle 5**). Der Vergleich des Bitter-

schwollenwertes von **6** zu dem des freien Aglykons **1** (10,0 $\mu\text{mol/l}$) verdeutlichte, dass die O-Glycosylierung zu einer Erniedrigung der Bitterschwelle des Lactons um Faktor 5 führt.

Als „mundaustrocknend“ und „aufrauend adstringierend“ wurde die orale Wahrnehmung der wässrigen Lösung von Cichoriensäure (**7**) durch das Sensorikpanel beschrieben. Um die bei der Wahrnehmung von adstringierenden Verbindungen auftretenden „*Memory-Effekte*“ zu vermeiden, erfolgte die Bestimmung des Erkennungsschwellenwertes durch das sogenannte Half-Mouth-Testverfahren (Stark 2006). Dabei wurde für die Cichoriensäure ein Erkennungsschwellenwert von 23,1 $\mu\text{mol/l}$ beziehungsweise 11,0 mg/l Sensorikwasser (pH 6,5) ermittelt (**Tabelle 6**). Die Panelisten charakterisierten die Art der Adstringenz als vergleichbar zu den aus Kakao (*Theobroma cacao*) isolierten *N*-Phenylpropenoyl-*L*-aminosäuren wie z. B. (-)-*N*-[3',4'-Dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-3-hydroxy-*L*-tyrosin bzw. der aus Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) isolierten Rosmarinsäure, für die Schwellenwerte für Adstringenz von 26,0 $\mu\text{mol/l}$ (Stark et al. 2005) bzw. 11,5 $\mu\text{mol/l}$ (Degenhardt, unveröffentlicht) bestimmt wurden.

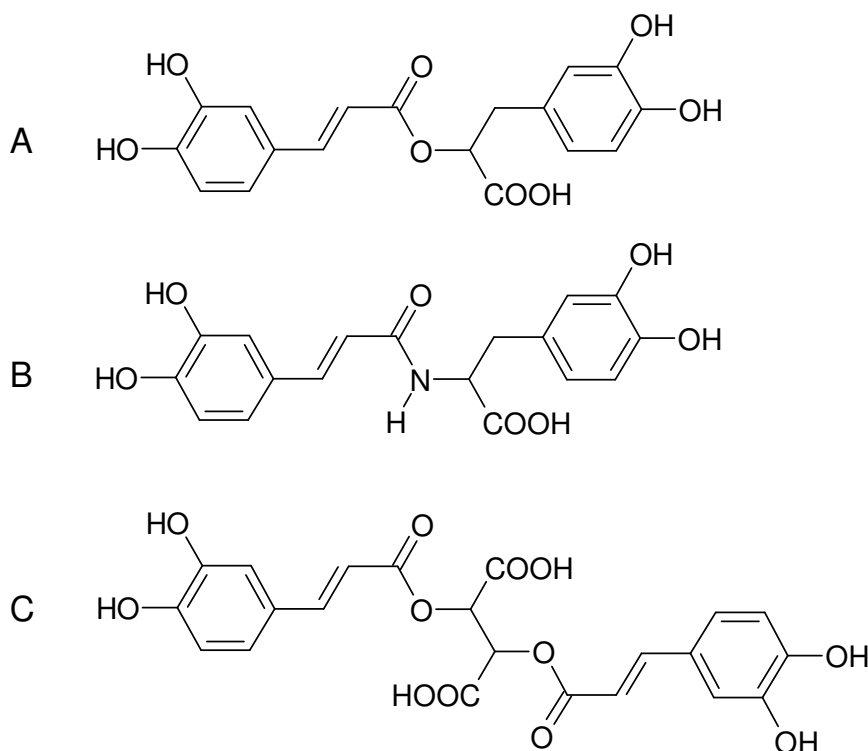


Abbildung 44: Molekülstrukturen von Rosmarinsäure (A), (-)-*N*-[3',4'-Dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-3-hydroxy-*L*-tyrosin (B) und Cichoriensäure (C).

Tabelle 6: Schwellenwerte adstringierender Verbindungen in Chicorée

Name der adstringierenden Verbindung ^a	Schwellenwertkonzentration ^b	
	[$\mu\text{mol/l}$]	[ppm] ^e
Rosmarinsäure	11,5 ^c	4,1
(-)-N-[3',4'-Dihydroxy-(<i>E</i>)-cinnamoyl]-3-hydroxy- <i>L</i> -tyrosin	26,0 ^d	9,3
Cichoriensäure (7)	23,1 ^c	11,0

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 44**. ^b Half-Mouth-Test: Schwellenwerte für Adstringenz in *Evi-an*®-Sensorikwasser; ^c pH 6,5; ^d pH 6,0; ^e Konzentrationsangaben entsprechen [mg/kg] und [mg/l].

3.1.2.2 Dosis-Wirkungs-Funktionen

Um die relativen Bitterintensitäten der Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** zu bewerten, wurden Dosis-Wirkungs-Funktionen dieser Verbindungen aufgenommen. Die mittels Half-Mouth-Testverfahren analog Scharbert et al. (2004) und Stark et al. (2006) evaluierten relativen Intensitäten der Bitterkeit wurden in der Ordinatenachse eines zweidimensionalen Koordinatensystems gegen die Konzentrationen auf der Abszissenachse logarithmisch aufgetragen. Bei dem angewandten sensorischen Testverfahren wurden die Bittergeschmacksintensitäten einer Testlösung gegen eine Referenzlösung verkostet; als Referenz zur Bestimmung der Bitterintensitäten diente eine Coffein-Konzentrationsreihe. Auf diese Weise wurden die einzelnen Test- und Referenzlösungen – beginnend mit den niedrigsten Bitterstoffkonzentrationen in steigender Konzentrationsrichtung – auf jeweils verschiedene Zungenhälften aufgetragen; die auftretenden Bitterintensitäten wurden bestimmt. Die Angabe der relativen Bitterintensitäten auf der Y-Achse erfolgte auf einer Fünfpunktskala von 0 (kein Bittergeschmack) bis zu dem Wert 5 (maximale Bitterintensität). Somit wurde für jede der identifizierten Substanzen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** eine individuelle Dosis-Wirkungs-Funktion ermittelt (**Abbildung 45**). Wie dabei ersichtlich ist, zeigen die Graphen der Dosis-Wirkungs-Funktionen der Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** ähnliche Verläufe und auch die Qualität der Bitterkeit dieser fünf Verbindungen war jeweils identisch. Oberhalb der Schwellenwertkonzentration zeigte Lactucopicrin (**5**) in sämtlichen Verdünnungsstufen stets die höchsten Intensitäten relativer Bitterkeit. Die maximale Intensität von 4,2 wurde bei der DoT-Faktor-128-Konzentration erreicht. Die geringsten Intensitäten

relativer Bitterkeiten oberhalb der Schwellenwertkonzentrationen wurden für die Verbindung 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) ermittelt, welche bei einer DoT-Konzentration von 64 eine relative Bitterhöchstintensität von 2,7 erreichte; sensorische Tests bei höheren DoT-Konzentrationen waren aufgrund der limitierten Substanzmenge nicht möglich. Für 8-Desoxylactucin (**3**) wurde bei einer DoT-Konzentration von Faktor 32 ein relativer Bitterkeitshöchstwert von 2,7 bestimmt.

Die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Funktionen zeigte, dass sich das Sesquiterpenlacton Lactucopicrin (**5**) im sensorischen Vergleich zu den adäquaten DoT-Konzentrationen von **1**, **2**, **3** und **4** sowie zu denen der Coffeinreferenzen mit den höchsten Intensitäten relativer Bitterkeit auszeichnete. Zudem besitzt Lactucopicrin (**5**) von allen untersuchten Verbindungen (**1**, **2**, **3**, **4**) den niedrigsten Schwellenwert für Bitterkeit (2,5 $\mu\text{mol/l}$). Die Betrachtung der Molekülstrukturen der Verbindungen **1**, **2**, **3**, **4** und **5** lässt die Schlussfolgerung zu, dass die höhere Bitterkeit des Lactucopicrins (**5**) durch die in dessen Molekül vorhandene *p*-Hydroxyphenyllessigsäure-Gruppierung hervorgerufen wird. Die Betrachtung der Schwellenwerte für Bitterkeit sowie der Dosis-Wirkungs-Funktionen bezüglich der relativen Bitterintensitäten und der Molekülstrukturen von **1**, **2**, **3**, **4** und **5** (**Abbildung 45**) führt zu der Erkenntnis, dass die Verbindungen, welche am C-8-Atom einen Substituenten tragen (**1**, **2** und **5**), die geringeren Bitterschwellen und die höheren Bitterintensitäten aufweisen als ihre nicht substituierten Strukturanaloga (**3** und **4**).

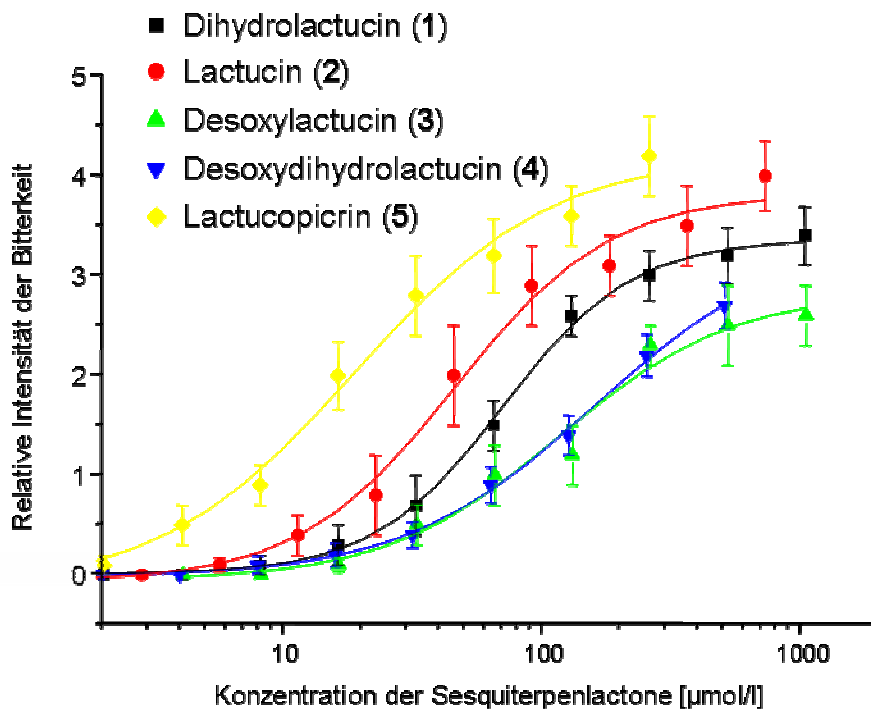


Abbildung 45: Humane Dosis-Wirkungskurven von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) in Sensorikwasser (pH 6,5).

Um den Dosis-Wirkungsverlauf von Dihydrolactucin (1) im Vergleich zu seinem O- β -D-Glycosid Cichoriosid B (6) zu untersuchen, wurden von beiden Substanzen ebenfalls Dosis-Wirkungsfunktionen erstellt. Bei den Konzentrationen oberhalb des Geschmacksschwellenwerts zeigt Cichoriosid B stets die höheren Intensitäten von Bitterkeit (**Abbildung 46**). Das Aglykon 1 besitzt einen Erkennungsschwellenwert für Bitterkeit von 2,8 ppm und sein glycosidisches Pendant 6 einen Wert von 23,5 ppm in Wasser. Bei Auftragung der relativen Bitterintensitäten gegen die DoT-Faktoren zeigt sich jedoch oberhalb der Schwellenwertkonzentrationen entgegen der Erwartung eine deutlich höhere Intensität der glycosidischen Verbindung Cichoriosid B im Vergleich zu seinem Aglykon Dihydrolactucin (**Abbildung 46**). Dieses Phänomen ist vermutlich der Aktivierung verschiedener Bitterrezeptoren auf der menschlichen Zunge geschuldet.

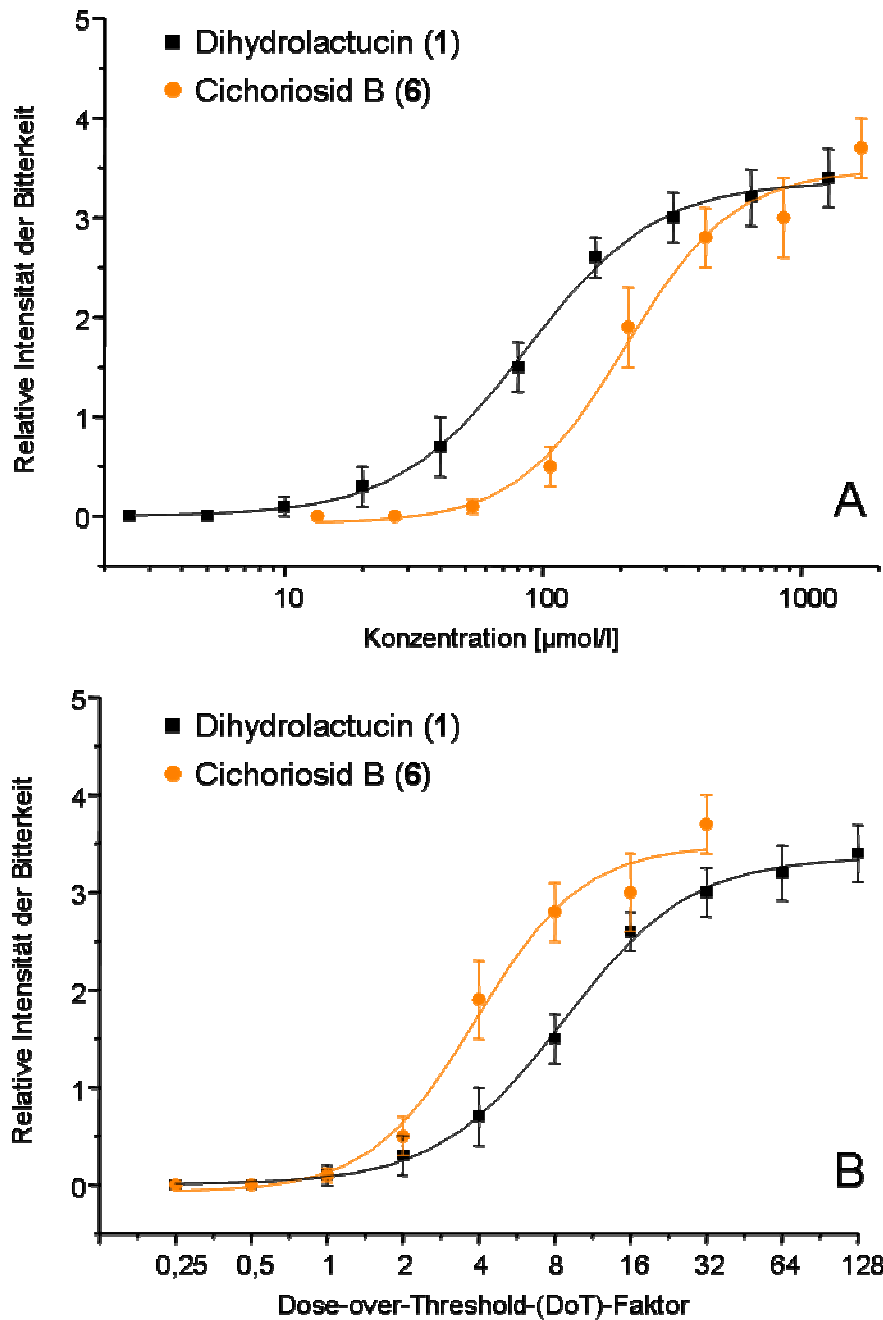


Abbildung 46: Humane Dosis-Wirkungsfunktionen von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1) und Cichoriosid B (6) in Sensorikwasser (pH 6,5): Bitterintensität vs. Konzentration (A) und Bitterintensität vs. DoT-Faktor-Konzentration (B).

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass Sesquiterpenlactone scheinbar niedrigere Schwellenwerte als ihre glycosidischen Strukturanaloga aufweisen, wobei Letztere bei Konzentrationen oberhalb ihrer Schwellenwertkonzentrationen höhere Intensitäten der Bitterkeit gegenüber adäquaten Aglykon-DoT-Konzentrationen besitzen.

3.1.3 Quantitative Analyse bitterer Sesquiterpenlactone im Chicorée

Aus der Literatur ist bekannt, dass bittere Sesquiterpenlactone gegenüber UV-Strahlung instabil sind und durch deren Einwirken vollständig abgebaut werden (Frey et al. 2002). Deshalb wurden während der Probenvorbereitungen zur quantitativen Analyse sämtliche Einwaage-, Extraktions- und Verdünnungsprozesse stets unter Lichtausschluss durchgeführt.

Die quantitative Analyse der identifizierten Sesquiterpenlactone 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), Lactucin (**2**), 8-Desoxylactucin (**3**), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) und Lactucopicrin (**5**) erfolgte mittels externer Kalibration. Als Untersuchungsmaterial diente gefriergetrocknetes Blattmaterial von insgesamt zwölf frischen Chicorée-Salatköpfen. Drei Proben dieses Untersuchungsmaterials wurden extrahiert, die Extrakte durch RP-HPLC-DAD in ihre Einzelsubstanzen aufgetrennt und durch Integration der jeweiligen Flächeninhalte der Analytenpeaks bestimmt. – Konzentrationsreihen mit präparativ isolierten Lactucin (**2**) und Lactucopicrin (**5**), welche als externe Standardverbindungen (**ES**) fungierten, wurden hergestellt, mittels RP-HPLC-DAD analysiert und deren Peakflächeninhalte durch Integration bestimmt, woraus zwei Kalibriergeraden mit Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,9993 für **2** und 0,9992 für **5** resultierten (**Abbildung 47**). – Die Bestimmung der Konzentrationen der Analyten erfolgte durch Berechnung über die erhaltenen Kalibriergeraden. Die Konzentrationsberechnungen von **1**, **2**, **3** und **4** erfolgte über die Lactucin-Kalibriergerade; der Gehalt von **5** wurde über die Lactucopicrin-Kalibriergerade berechnet. Unter Einbeziehung des durchschnittlichen Wassergehaltes von 94,3 % wurden die Konzentrationen der bitteren Sesquiterpenlactone in frischen Chicorée-Salatköpfen ermittelt.

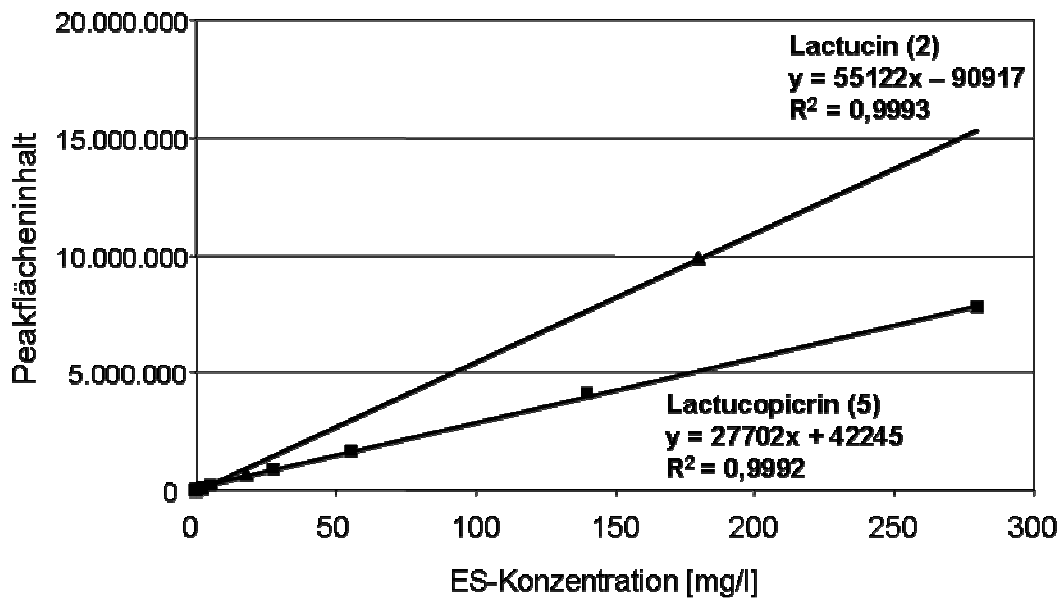


Abbildung 47: Kalibriergeraden von Lactucin (2) und Lactucopicrin (5). – Berechnet durch lineare Regression der Koordinatenpunkte im Peakflächen-Konzentrations-Diagramm.

Die jeweiligen arithmetischen Mittel der erhaltenen quantitativen Daten (\pm Standardabweichungen vom Mittelwert) zeigten, dass Lactucopicrin (5) mit 17,32 (\pm 0,13) mg/kg den höchsten Gehalt in Chicorée-Salatköpfen aufwies, gefolgt von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1) mit 16,35 (\pm 1,73) mg/kg und Lactucin (2) mit 6,42 (\pm 0,78) mg/kg (**Tabelle 7**). Zur Ermittlung des Beitrags der einzelnen Verbindungen zum Bittergeschmack von Chicorée wurde für jeden einzelnen Bitterstoff der Dose-over-Threshold-Faktor (DoT), auch als Geschmacksaktivitätswert (GAW) bezeichnet, bestimmt. Der DoT oder GAW ist definiert als der Quotient aus Konzentration der Einzelverbindung im Lebensmittel und dessen Geschmacksschwellenwert (Erkennungsschwellenwert). Mit einem DoT von 16,9 trägt 5 den mit Abstand höchsten Anteil an der Gesamtbitterkeit von Chicorée-Salat bei; 1 steht mit einem DoT-Faktor von 5,9 an zweiter, 2 mit 3,3 an dritter Stelle der Bitterstoffe, die in geschmacksaktiven Konzentrationen vorliegen. Mit DoT-Faktoren von 0,6 und 0,3 liegen die Bitterstoffe 3 und 4 im Chicorée-Salat knapp unterhalb der Schwellenwertkonzentrationen vor.

Tabelle 7: Konzentrationen, Bitterschwellenwerte und Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren von Sesquiterpenlactonbitterstoffen in Chicorée-Salatköpfen (Frischgewicht)

Identifizierte Chicorée-Bitterstoffe	Konzentration ^a im Chicorée-Salat [μmol/kg]	Bitterschwellenwertkonzentration ^b [μmol/kg]	DoT-Faktor ^c
11β,13-Dihydrolactucin (1)	58,75 ± 6,22	10,0	5,9 ± 0,6
Lactucin (2)	23,23 ± 2,82	7,0	3,3 ± 0,4
8-Desoxylactucin (3)	12,37 ± 2,96	20,2	0,6 ± 0,2
11β,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4)	2,67 ± 1,07	9,8	0,3 ± 0,1
Lactucopicrin (5)	42,24 ± 0,32	2,5	16,9 ± 0,1
Cichoriosid B (6)	8,07 ± 0,52	53,4	0,2 ± 0,01

^a Ergebnisse wurden aus jeweils drei unabhängigen Einzelbestimmungen ermittelt und sind als arithmetische Mittelwerte ± Standardabweichungen vom Mittelwert angegeben; ^b Schwellenwerte für Bitterkeit in *Evian*®-Sensorikwassser (pH 6,5); ^c Berechnet für die Bitterkeit durch die Quotienten aus der Konzentration im Chicorée-Salat und der Bitterschwellenwertkonzentration.

Um einen Einblick in die räumliche Verteilung der Bitterstoffe im Chicorée-Salatkopf zu erhalten, wurden drei Chicorée-Salatkopfreionen bezüglich der identifizierten Sesquiterpenlactone 11β,13-Dihydrolactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11β,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) quantitativ analysiert. Es handelte sich dabei um die gelben Blattspitzen (A), die äußeren weißen Blattbestandteile (B) sowie die inneren Strunkregionen (C). Die quantitative Analyse beruhte dabei auf dem Prinzip der externen Kalibration und erfolgte aus dem gefriergetrockneten Material der Proben A, B und C, welche jeweils zuvor aus insgesamt zehn frischen Chicorée-Salatköpfen gewonnen worden waren.

Drei Proben dieses Untersuchungsmaterials wurden extrahiert, die Extrakte durch RP-HPLC-DAD in ihre Einzelsubstanzen aufgetrennt und durch Integration der jeweiligen Flächeninhalte der Analytenpeaks bestimmt. Die Konzentrationsberechnungen von 1, 2, 3 und 4 erfolgte über die Lactucin-Kalibriergerade; der Gehalt von 5 wurde über die Lactucopicrin-Kalibriergerade berechnet (vgl. **Abbildung 47**).

Unter Einbeziehung des durchschnittlichen Wassergehaltes von 94,3 % (Trocken-
substanzgehalt (5,7 %) wurden die Konzentrationen der bitteren Sesquiterpenlactone
in frischen Chicorée-Salatköpfen ermittelt. Die jeweiligen arithmetischen Mittel der
erhaltenen quantitativen Daten (\pm Standardabweichungen vom Mittelwert) zeigten,
dass alle untersuchten Sesquiterpenlactonbitterstoffe **1**, **2**, **3**, **4** und **5** in den gelben
Blattspitzen in den höchsten Konzentrationen vorlagen (**Tabelle 8**). Der innere
Strunk wies die zweithöchsten Konzentrationen für die quantifizierten Analyten auf.
Im Vergleich zu den gelben Blattspitzen enthielten die äußeren weißen Blattstücke
nur jeweils ein Viertel der Konzentrationen an **1**, **2**, **3**, **4** und **5**.

Tabelle 8: Konzentrationen identifizierter Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe in gelben Blattspitzen, weißen Blattstücken und im inneren Strunk von Chicorée-Salatköpfen (Frischgewicht)

Identifizierte Chicorée- Bitterstoffe	Konzentration [$\mu\text{mol/kg}$] in		
	gelben Blattspitzen	weißen Blattstücken	dem inneren Strunk
11 β ,13-Dihydrolactucin (1)	81,49 \pm 11,32	22,06 \pm 1,01	47,18 \pm 2,59
Lactucin (2)	68,73 \pm 7,46	14,80 \pm 0,69	36,59 \pm 3,40
8-Desoxylactucin (3)	33,69 \pm 3,88	9,18 \pm 1,04	22,97 \pm 3,15
11 β ,13-Dihydro- 8-desoxylactucin (4)	15,78 \pm 2,63	5,83 \pm 1,26	14,18 \pm 1,56
Lactucopicrin (5)	43,30 \pm 3,53	11,94 \pm 0,83	26,27 \pm 2,10

Die Ergebnisse wurden aus jeweils drei unabhängigen Einzelbestimmungen ermittelt und sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichungen vom Mittelwert angegeben.

Unter der Annahme, dass der Blattspitzenanteil gegenüber dem Strunkanteil vernachlässigbar gering ausfällt (kleiner 1 %), ist der absolute Bitterstoffgehalt aus den Blattspitzen gegenüber dem aus dem gesamten Chicorée-Salatkopf ebenfalls vernachlässigbar klein.

Die Sesquiterpenlactonbitterstoffe 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), Lactucin (**2**), 8-Desoxylactucin (**3**), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) und Lactucopicrin (**5**) sind somit innerhalb eines Chicorée-Salatkopfes nicht homogen verteilt. Die hohen Gehalte an **1**, **2**, **3**, **4** und **5** in den Blattspitzen könnten durch eine höhere Stoffwechselak-

tivität hervorgerufen worden sein, welche durch Lichteinwirkung induziert wurde sowie durch darauf folgende Photosynthese- und weitere biochemische Folgeprozesse, die in der Bildung der bitteren Sesquiterpenlactone mündeten. Dieses Phänomen ist insofern plausibel, da die Sesquiterpenlactone durch ihre Bitterkeit als Fraßschutz die empfindlichen Wachstumsorgane – hier die Blattspitzen – schützen, in denen zahlreiche Zellteilungs- und Zellstreckungsprozesse erfolgen (vgl. Munk 2001). So sollen erhöhte Konzentrationen an bitteren Sesquiterpenlactonen (**1-5**) die Blattspitzen bzw. die Wachstumszonen vom Chicorée gegen Kaninchen und Schädlinge schützen. Gestützt wird diese Erklärung durch Bennet et al. (2001), wobei den Sesquiterpenlactonen der Pflanzen neben einer aktiven Antifraßschutzfunktion die Herausbildung von bakteriellen und viralen Resistenzen zugeschrieben werden.

3.1.4 Quantitative Analyse bitterer Guaiansesquiterpenlactone in Korbblütlern

Um zu untersuchen, ob die identifizierten Sesquiterpenlactone 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), Lactucin (**2**), 8-Desoxylactucin (**3**), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) und Lactucopicrin (**5**) auch in anderen Vertretern der Pflanzenfamilie der Korbblütler (*Asteraceae*) nachweisbar sind, wurde eine RP-ESI-HPLC-MS/MS-Multimethode entwickelt. Nach Kalibration der Massenübergänge der Analyten **1-5** erfolgten mittels dieser Multimethode Rasteruntersuchungen zum Nachweis dieser Substanzen im Chicorée-Salat (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegl.), in Chicorée-Wurzeln (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*), Radicchio Rosso (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*), Zuckerhut (auch unter der Bezeichnung „Fleischkraut“ bekannt; *Cichorium intybus* L. var. *foliosum*), in grünem Löwenzahn (*Taraxacum officinale* F. H. Wigg.), in gebleichtem Löwenzahn (*Taraxacum officinale* F. H. Wigg.) sowie in spanischer und sardinischer Artischocke (*Cynara scolymus* L.). Die quantitative Analyse der Bitterstoffe **1-5** erfolgte mittels dem Sesquiterpenlacton-Konstitutionsisomer Santonin (**Abbildung 48**) als interne Standardverbindung (**IS**) (**Abbildung 49**).

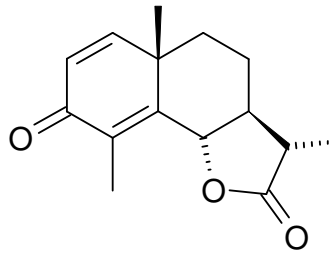


Abbildung 48: Struktur von (-)- α -Santonin.

Drei Proben des TM-Untersuchungsmaterials eines jeweiligen Korbblütlers wurden extrahiert, die Extrakte durch RP-HPLC in ihre Einzelsubstanzen aufgetrennt, mittels MS/MS detektiert und durch Integration der jeweiligen Flächeninhalte von **IS**- und Analytensignalen bestimmt. Die Konzentrationsberechnungen von **1**, **2**, **3**, **4** und **5** im Frischgewicht des Untersuchungsmaterials erfolgten über die **IS**-Analyten-Peakflächenverhältnisse unter Einbeziehung eines jeweiligen Response-Faktors sowie des zuvor gravimetrisch bestimmten Wassergehaltes.

Aus den erhaltenen quantitativen Ergebnissen wurde ersichtlich, dass Chicorée-Salat und -Wurzel ähnliche Konzentrationen an bitteren Sesquiterpenlactonen in ihrem Frischgewicht enthielten (Salat // Wurzel): 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), (12,81 // 26,41 $\mu\text{mol/kg}$), Lactucin (**2**) (10,42 // 12,85 $\mu\text{mol/kg}$), 8-Desoxylactucin (**3**) (10,72 // 9,72 $\mu\text{mol/kg}$), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) (2,67 // 5,76 $\mu\text{mol/kg}$) und Lactucopicrin (**5**) (58,33 // 21,39 $\mu\text{mol/kg}$) (**Tabelle 9**). Die größten Unterschiede zwischen Salat und Wurzel lagen in den Konzentrationen von **1**, **4** und **5**, wobei **5** ca. dreifach höher im Salat als in der Wurzel konzentriert war. Dagegen lagen die Gehalte von **3** und **4** in der Wurzel in zweifach höherer Menge gegenüber dem Salat vor. Die berechneten DoT-Faktoren von **3** und **4** waren kleiner als 1, sodass diese Substanzen in den vorliegenden Konzentrationen keine Rolle als Schlüsselbitterstoffe einnehmen sollten. Im Chicorée-Salat und in den -Wurzeln sind lediglich die Verbindungen **1**, **2** und **5** als Schlüsselbitterstoffe wahrnehmbar.

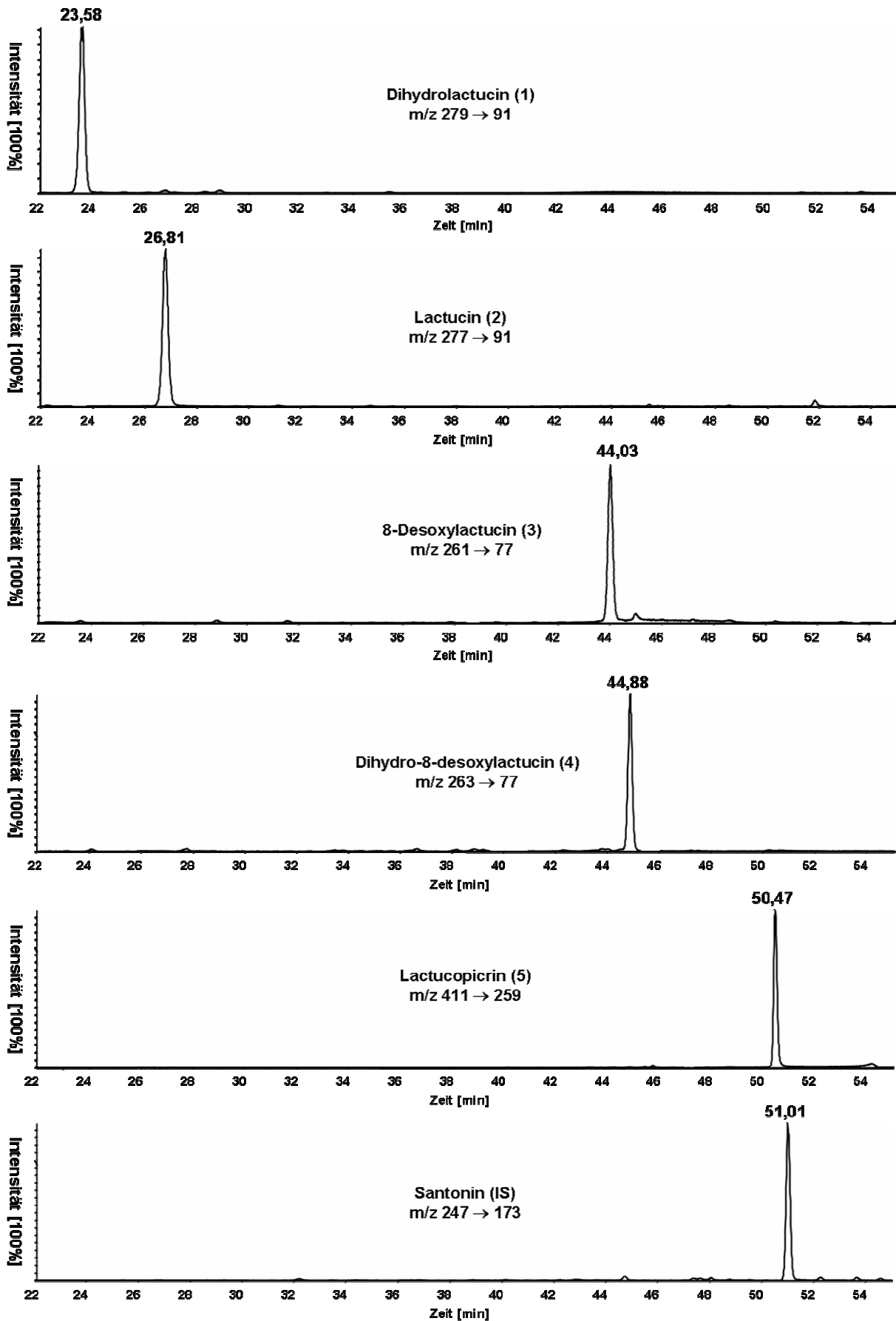


Abbildung 49: Rasteruntersuchungen und Quantifizierung von Chicorée-Bitterstoffen 1-5 in Korbblütlern mittels HPLC-MS/MS-Analyse.

Tabelle 9: Konzentrationen (bezogen auf Frischgewichte) und berechnete Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren von 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) in Chicorée-Salat, -Wurzeln, Radicchio Rosso, Zuckerhut, grünem Löwenzahn, gebleichtem Löwenzahn, spanischer und sardinischer Artischocke

Probe	Konzentration ^a [μ mol/kg] (DoT-Faktor ^b) von				
	1	2	3	4	5
Chicorée-Salatkopf	12,81 \pm 0,57 (1,3 \pm <0,1)	10,42 \pm 0,54 (1,5 \pm <0,1)	10,72 \pm 0,50 (0,5 \pm <0,1)	2,67 \pm 0,11 (0,3 \pm <0,1)	58,33 \pm 11,94 (23,3 \pm 4,8)
Chicorée-Wurzel	26,41 \pm 0,65 (2,6 \pm <0,1)	12,85 \pm 0,14 (1,8 \pm <0,1)	9,72 \pm 0,35 (0,5 \pm <0,1)	5,76 \pm 0,15 (0,6 \pm <0,1)	21,39 \pm 3,95 (8,6 \pm 1,6)
Radicchio Rosso	16,85 \pm 0,54 (1,7 \pm <0,1)	15,89 \pm 0,76 (2,3 \pm 0,1)	9,11 \pm 0,46 (0,5 \pm <0,1)	3,01 \pm 0,08 (0,3 \pm <0,1)	189,19 \pm 6,29 (75,7 \pm 2,5)
Zuckerhut	15,45 \pm 1,11 (1,5 \pm 0,1)	1,01 \pm 0,07 (0,1 \pm <0,1)	35,11 \pm 0,81 (1,7 \pm <0,1)	16,39 \pm 1,37 (1,7 \pm 0,1)	104,48 \pm 14,20 (41,8 \pm 5,7)
Löwenzahn (grün)	13,80 \pm 0,68 (1,4 \pm <0,1)	11,29 \pm 0,25 (1,6 \pm 0,1)	6,19 \pm 0,19 (0,3 \pm <0,1)	0,57 \pm 0,08 (<0,1)	96,41 \pm 9,79 (38,6 \pm 3,9)
Löwenzahn (gebleicht)	6,32 \pm 0,31 (0,6 \pm <0,1)	n.d. (n.b.)	0,65 \pm 0,15 (< 0,1)	16,43 \pm 1,15 (1,7 \pm 0,1)	0,07 \pm 0,02 (< 0,1)
Artischocke (Spanien)	0,36 \pm 0,07 (< 0,1)	n.d. (n.b.)	0,41 \pm 0,04 (< 0,1)	n.d. (n.b.)	0,10 \pm 0,02 (< 0,1)
Artischocke (Sardinien)	0,68 \pm 0,07 (< 0,1)	n.d. (n.b.)	0,38 \pm 0,04 (< 0,1)	n.d. (n.b.)	0,10 \pm 0,02 (< 0,1)

^a Die Ergebnisse wurden aus jeweils drei unabhängigen Einzelbestimmungen ermittelt und sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichungen vom Mittelwert angegeben; ^b Berechnet für die Bitterkeit durch die Quotienten aus der Konzentration im Korbblütler und der Bitterschwellenwertkonzentration. n.d.: nicht detektierbar; n.b.: nicht bestimmbar.

Radicchio Rosso, Zuckerhut und grüner Löwenzahn zeichneten sich durch einen intensiven chicoréeartigen Bittergeschmack aus. Dieser kann unter anderem auf sehr hohe Gehalte an Lactucopicrin **5** zurückzuführen sein, woraus auch sehr hohe DoT-Faktoren resultierten. Dieser Bitterstoff wies in Radicchio Rosso, Zuckerhut sowie im grünen Löwenzahn DoT-Werte von 77,7, 42,9 und 39,6 auf. Die Gehalte an **1**, **2**, **3**

und **4** waren vergleichsweise ähnlich der Gehalte im Chicorée, wobei wiederum nur **1** und **2** DoT-Faktoren größer 1,0 erreichten (**Tabelle 9**).

Der Vergleich der Sesquiterpenlacton-Gehalte zwischen grünem und gebleichtem Löwenzahn zeigte, dass in gebleichtem Löwenzahn kein Lactucin (**2**) nachweisbar war. Der größte Unterschied lag in den stark verschiedenen Lactucopicrin-(**5**)-Konzentrationen: 96,41 $\mu\text{mol/kg}$ Frischgewicht in grünem Löwenzahn, 0,07 $\mu\text{mol/kg}$ Frischgewicht in gebleichtem Löwenzahn; Ursache für diese Diskrepanz ist möglicherweise der „Bleichprozess“, wobei die Pflanzen unter Lichtausschluss gezüchtet werden. Möglicherweise erfolgte im Falle des Löwenzahns dabei keinerlei Bildung von Lactucopicrin (**5**), da dessen Biosynthese lichtabhängig zu sein scheint und dessen Vorkommen in grünem Löwenzahn erklären würde.

Die Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), 8-Desoxylactucin (**3**) und Lactucopicrin (**5**) wurden sowohl in der spanischen Artischocke als auch in der sardinischen Artischocke nachgewiesen. Jedoch beliefen sich die Gehalte der detektierten Bitterstoffe auf 0,04 bis 0,09 mg/kg Frischgewicht, welches DoT-Faktoren von kleiner 0,1 ergab (**Tabelle 9**). Somit tragen die identifizierten Sesquiterpenlactone **1**, **3** und **5** keinen Anteil am Bittergeschmack von Artischocken bei.

3.1.5 Diskussion

Durch sequenzielle Lösungsmittelfraktionierung wurden die geschmacksaktiven Verbindungen in einzelnen Fraktionen lokalisiert. Dabei konnten sechs Bitterstoffe sowie eine adstringierende Verbindung identifiziert werden. Bei den Bitterstoffen handelt es sich um die Sesquiterpenlactone 11 β ,13-Dihydrolactucin (**1**), Lactucin (**2**), 8-Desoxylactucin (**3**), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) und Lactucopicrin (**5**) sowie um das Sesquiterpenlactonglycosid Cichoriosid B (**6**). Cichoriensäure (**7**) wurde als adstringierende Verbindung in der Chicorée-Wasserfraktion isoliert.

Die Betrachtung der ermittelten Bitterschwellenwerte der Lactone **2** (7,0 $\mu\text{mol/l}$) und **5** (2,5 $\mu\text{mol/l}$) zeigt, dass der deutlich niedrigere Bitterschwellenwert von **5** sowie dessen Bitterintensität von der an der Hydroxylgruppe des C-8-Atoms estergebundenen *p*-Hydroxyphenyllessigsäuregruppe hervorgerufen wird. Bei den Verbindungen **1-5** handelt es sich um hydrophobe Sesquiterpenlactone, deren Bitterintensitäten bzw. deren Bitterschwellenwerte möglicherweise komplett von dem am C-8-Atom des

Guaian-Molekülgrundgerüsts gebundenen Rest abhängig sind. Die fehlende Substitution am C-Atom 8 von **3** und **4** verursacht somit die relativ hohen Schwellenwerte von 20,2 µmol/l und 9,8 µmol/l, was sich mit den Erkenntnissen von Leclercq (1992) deckt.

Der Vergleich der Schwellenwerte des Sesquiterpenlactons **1** (10 µmol/l) mit seinem glycosidischen Pendant **6** (53,4 µmol/l) zeigt ebenfalls einen sehr deutlichen Unterschied. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Bitterschwellenwertkonzentrationen der Sesquiterpenlactone niedriger sind als die ihrer Glucopyranosid-Analoga. Interessanterweise ist – nach Untersuchung des Dosis-Wirkungsverhaltens – die Bitterintensität von **6** gegenüber seinem Aglykon **1** deutlich erhöht. Möglicherweise ist dieses Phänomen durch die Aktivierung verschiedener Bitterrezeptoren auf der menschlichen Zunge verursacht.

Letztendlich kann nach Betrachtung der molekularen Struktur der Substanzen **1**, **2**, **5** und **6** ein Zusammenhang zwischen der Polarität bzw. dem hydrophoben Molekülcharakter und den Bitterintensitäts- sowie Schwellenwertunterschieden hergestellt werden: Mit abnehmender Polarität der identifizierten Substanzen (**6** > **1** > **2** > **5**), erfolgt eine Abnahme der Bitterschwellenwerte (**6** > **1** > **2** > **5**).

Die Quantifizierung der Substanzen **1-6** im Chicorée-Salatkopf erfolgte durch HPLC-Analyse mittels externer Standardkalibration. Die quantitativen Ergebnisse zeigen, dass im Chicorée-Salatkopf das Lacton Dihydrolactucin (**1**) in den höchsten Konzentrationen vorkommt, Lactucopicrin (**5**) jedoch den höchsten DoT-Faktor aufweist und somit den höchsten Anteil an der Bitterkeit vom Chicorée trägt. Die Betrachtung der lokalen Verteilung der Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe ergab, dass in den gelben Blattspitzen des Chicorée-Salatkopfes die höchsten Konzentrationen von **1-5** vorliegen. Diese hohen Gehalte resultieren mit hoher Wahrscheinlichkeit daher, dass es sich bei den Blattspitzen um Wachstumsgewebe handelt und dieses daher eine höhere Stoffwechselaktivität aufweist und eines besonderen Schutzes gegenüber Fraßfeinden bedarf. Über den Fraßschutz hinaus ist bekannt, dass Chicorée-Extrakte antibakterielle Aktivität gegenüber Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien besitzen (El-Lakany et al. 2004; Nandagopal et al. 2007). Bezüglich der Sesquiterpenlactone **1** und **3** sind fungizide Wirkungen (Mares et al. 2005), über **2** und **5** sind antimalarische Eigenschaften (Bischoff et al. 2004) beschrieben. Somit besitzen die

Inhaltsstoffe von *Cichorium intybus L.* ein umfangreiches Wirkungsspektrum zur Abwehr von biotischen Feinden und Pathogenen.

Mittels einer eigens entwickelten RP-ESI-HPLC-MS/MS-Multimethode wurde ein Screening bezüglich der Chicorée-Bitterstoffe **1-5** in weiteren Korbblütler-Vertretern durchgeführt. Diesbezüglich standen neben Chicorée-Wurzeln auch Radicchio Rosso, Zuckerhut (auch unter der Bezeichnung „Fleischkraut“ bekannt), grüner Löwenzahn, gebleichter Löwenzahn sowie spanische und sardinische Artischocken zur Verfügung. Dihydrolactucin (**1**), 8-Desoxylactucin (**3**) und Lactucopicrin (**5**) konnten dabei in allen Untersuchungsmaterialien nachgewiesen werden. Mit Ausnahme des gebleichten Löwenzahns und der Artischocken erreichte das Lactucopicrin (**5**) DoT-Werte von 8 (Chicorée-Wurzel) bis 76 (Radicchio Rosso) und trägt somit entscheidend zu dem Bittergeschmack dieser Gemüsepflanzen bei.

3.2 Bitterstoffe in der Avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass)

3.2.1 Einfluss der thermischen Verarbeitung auf das Geschmacksprofil von Avocadofruchtfleisch

Die Pürees von frisch zubereitetem Avocadofruchtfleisch (Pulpe) wurden vor und nach der thermischen Behandlung (120 °C, 30 min) einer Geschmacksprofilanalyse unterzogen. Dazu wurden die Intensitäten der Geschmacksqualitäten „Adstringenz“, „Bitterkeit“, „Umami“, „Säuerlichkeit“, „Süße“, „Salzigkeit“, „Cremigkeit“ und „Mundfülle“ („Kokumi“) auf einer linearen Skala von 0 (für nicht wahrnehmbar) bis 5 (sehr stark wahrnehmbar) durch eine Gruppe von Humansensorikern (Panel) evaluiert. Wie in der **Abbildung 50** verdeutlicht, wurde der Geschmack nativer (unerhitzter) Avocadopulpe primär als cremig (3,5), sekundär als vollmundig (1,2), gefolgt von adstringierend (0,8) und bitter (0,8) charakterisiert. Umami- (0,7), Sauer- (0,4), Salz- (0,3) sowie Süßgeschmack (0,2) waren weitere humansensorisch detektierbare Geschmacksqualitäten. Somit waren Adstringenz, Bitterkeit, Cremigkeit und Mundfülle die am stärksten dominierenden Geschmacksparameter von frischem nativem Avocadopüree.

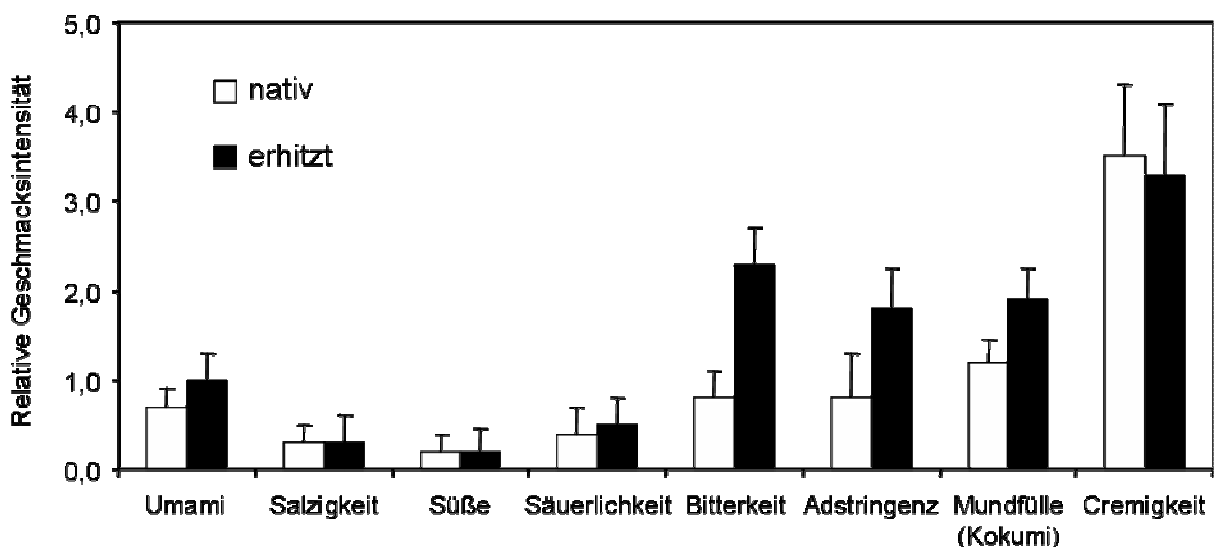


Abbildung 50: Profilsensorik nativer und erhitzter (120 °C, 30 min) Avocadopulpe.

Simultan erfolgte die Evaluation des Geschmacksprofils von erhitztem Avocadopüree. Der direkte Vergleich der Profile zeigte, dass die folgenden Geschmacksqualitäten nach Erhitzung in ihren relativen Intensitäten („native Avocado“ / „erhitzte Avocado“) erhöht waren: Adstringenz (0,8/1,8), Bitterkeit (0,8/2,3), Mundfülle (1,2/1,9), Säuerlichkeit (0,4/0,5) und Umami (0,7/1,0). Die Geschmacksintensitäten der Cremigkeit (3,5/3,3), der Salzigkeit (0,3/0,3) und der Süße (0,2/0,2) blieben nahezu unverändert bzw. konstant. Somit wurden durch die thermische Behandlung nativer Avocadopulpe deutliche Erhöhungen der Geschmacksintensitäten von Bitterkeit, Adstringenz, Mundfülle (Kokumi) sowie Umami um Faktoren von 2,9; 2,3; 1,6 bzw. 1,4 hervorgerufen (**Abbildung 50**). Die Qualität der Bitterkeit beschrieb das Sensorikpanel mit den Attributen „*artifizuell*“, „*unangenehm dominant*“, „*lang anhaltend*“ und „*kratzig im Rachen*“. Zudem kamen die beteiligten Panelisten zu der Übereinkunft, dass die Mundfülle-/ Kokumi-Impression in der erhitzten Avocadoprobe wesentlich länger anhaltend war als in deren unerhitztem Pendant. Auf der Basis der aus der Profilsensorik gewonnenen Daten wird vermutet, dass die thermische Behandlung von Avocadopulpe die Bildung von Bitterstoffen sowie die Erzeugung von Mundfülle verstärkenden Verbindungen bewirkt.

Um aus erhitzter Avocadopulpe die geschmacksaktiven Substanzen in ausreichender Menge isolieren zu können, wurden Erhitzungsexperimente mit dem Ziel durchgeführt, deren Bildung zu maximieren. Diesbezüglich wurde Püree frischer *Hass*-Avocadopulpe bei Temperaturen von 80, 100 sowie 120 °C über die Zeitspannen von 0, 30, 60 und 120 min erhitzt und nach Abkühlung einer Evaluation der jeweiligen relativen Bitterintensität unterzogen. Entsprechend den Resultaten der Geschmacksprofilanalyse wurden die nicht erhitzten, nativen Proben mit einer Bitterintensität von 0,8 als Referenz verwendet. In der sensorischen Analyse nahm mit zunehmender Temperatur und Erhitzungsdauer die Intensität der Bitterkeit zu (**Abbildung 51**). Die höchste Bitterintensität von 4,0 zeigte die Probe, welche für 120 min bei 120 °C erhitzt wurde. Der geringste Unterschied in Relation zur Referenz trat mit einem Intensitätswert von 1,1 bei der Probe mit einer vorherigen Erhitzung von 80 °C über einen Zeitraum von 30 min auf.

Somit diente das bei 120 °C über einen Zeitraum von 120 min erhitzte Avocadopüree für die folgenden Fraktionierungsexperimente als Ausgangsmaterial, mit dem Ziel der Identifizierung der geschmacksaktiven Substanzen.

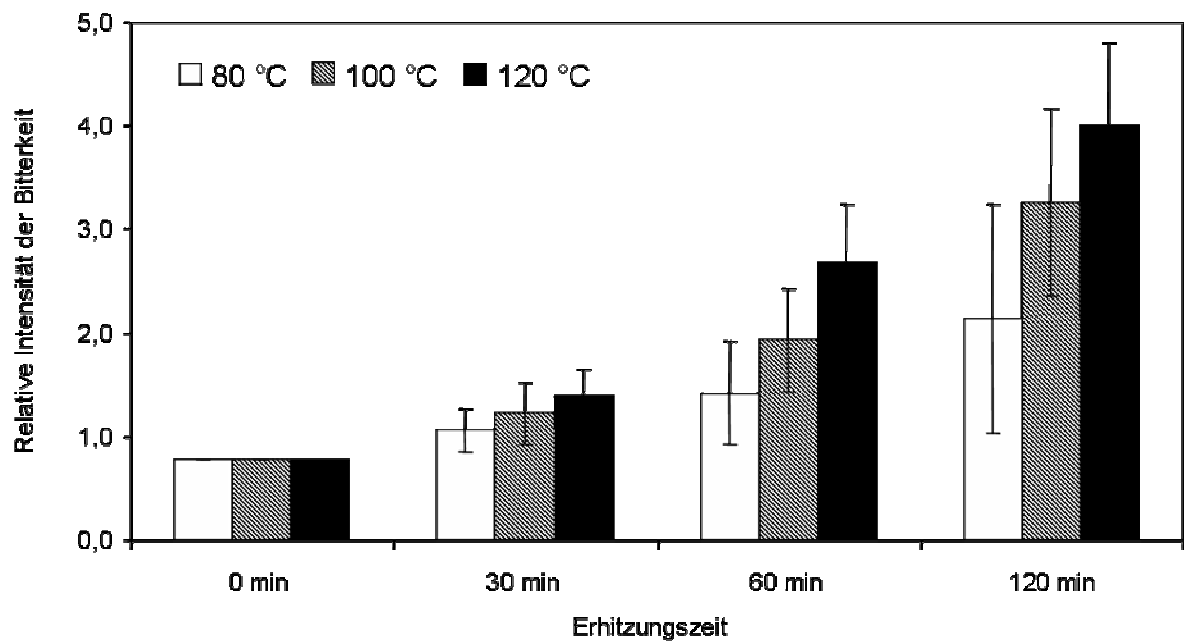


Abbildung 51: Relative Intensitäten der Bitterkeit von Avocadopulpe nach Erhitzung bei 80, 100 und 120 °C über einen Zeitraum von 0, 30, 60 und 120 min.

3.2.2 Aktivitätsorientierte Fraktionierung von erhitzter Avocadopulpe

3.2.2.1 Sequenzielle Extraktion und sensorische Bewertung der Extrakte

Um die während der Erhitzung von Avocadofruchtfleisch freigesetzten oder neu gebildeten Bitterstoffe zu erhalten, wurde die Trockenmasse von zuvor erhitzter Pulpe einer aktivitätsorientierten Fraktionierung, welche eine sequenzielle Extraktion mit organischen Lösungsmitteln abnehmender Polarität darstellt, unterzogen. Das Untersuchungsmaterial wurde zuerst mit Pentan extrahiert, im Anschluss wurde die Pentanphase im Scheidetrichter mit Ethanol/Wasser-Mischungen gewaschen. Aus dem Extraktionsprozess resultierten drei Fraktionen: der „unlösliche Rückstand“ (Fraktion A), die „Ethanol/Wasser-Fraktion“ (B*) und die „Pentanfraktion“ (C) (**Abbildung 52**). – In gleicher Weise erfolgte die Extraktion von nativer (nicht erhitzter) Avocadopulpe. Im Anschluss erfolgte die Abtrennung der Lösungsmittel durch Vakuumdestillation und Gefriertrocknung.

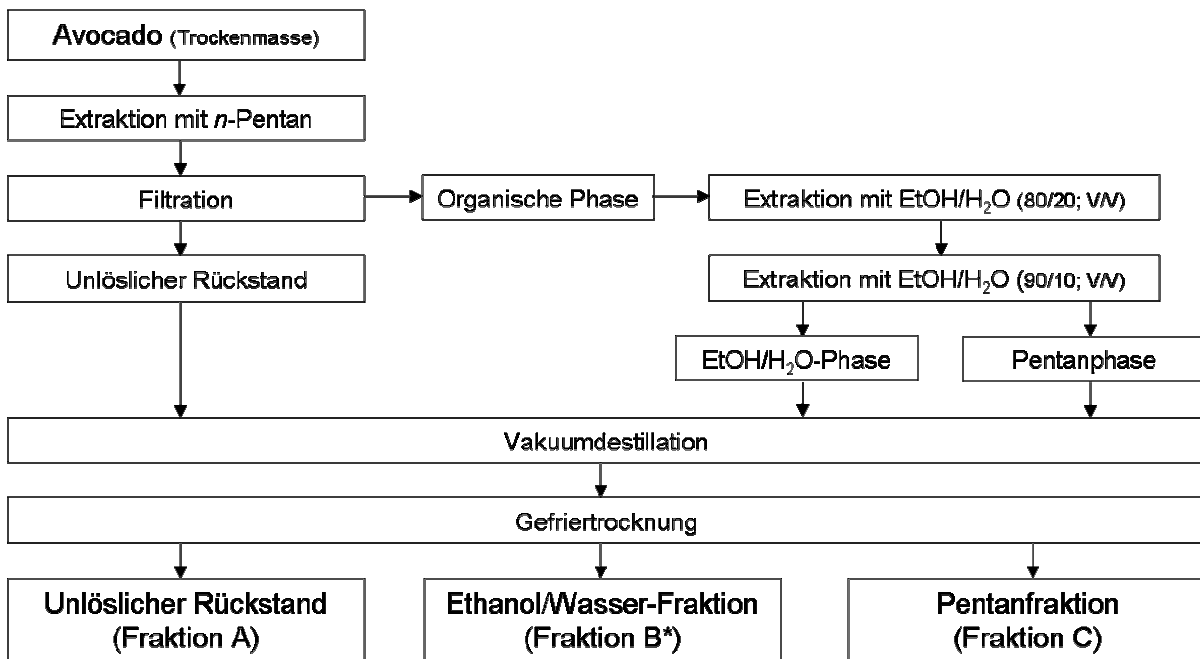


Abbildung 52: Extraktionsschema für Avocadopulpe und erhitzte Avocadopulpe.

Aliquote der Fraktionen A, B* und C von der jeweils nativen und erhitzten Avocadopulpe wurden in ihren natürlichen Konzentrationsverhältnissen in Sensorikwasser sowie in einer Modellbrühe mit definierter Zusammensetzung aufgenommen. Sowohl in puncto Bitterkeit als auch in Kokumi-Intensität zeigte die Fraktion B* der erhitzten Pulpe die größten Veränderungen bzw. Effekte gegenüber deren unerhitzten Pendanten. So nahm die Bitterkeit durch die Erhitzung von durchschnittlich 0,3 ($\pm 0,1$) auf 3,8 ($\pm 0,5$) zu; die Kokumi-Intensität (Mundfülle) verzeichnete einen Anstieg von 0,5 ($\pm 0,3$) auf 2,5 ($\pm 0,8$). Die Fraktionen A und C waren nur von marginalen Unterschieden ($\leq 0,2$) gekennzeichnet.

Um die Bitter- und Kokumi-Geschmacksstoffe zu isolieren, wurden im Folgenden eine Abtrennung der in der Fraktion B* noch enthaltenen Triglyceride durch Ausfrieren in Acetonitril bei -20 °C und eine anschließende Filtration vorgenommen (**Abbildung 53**).

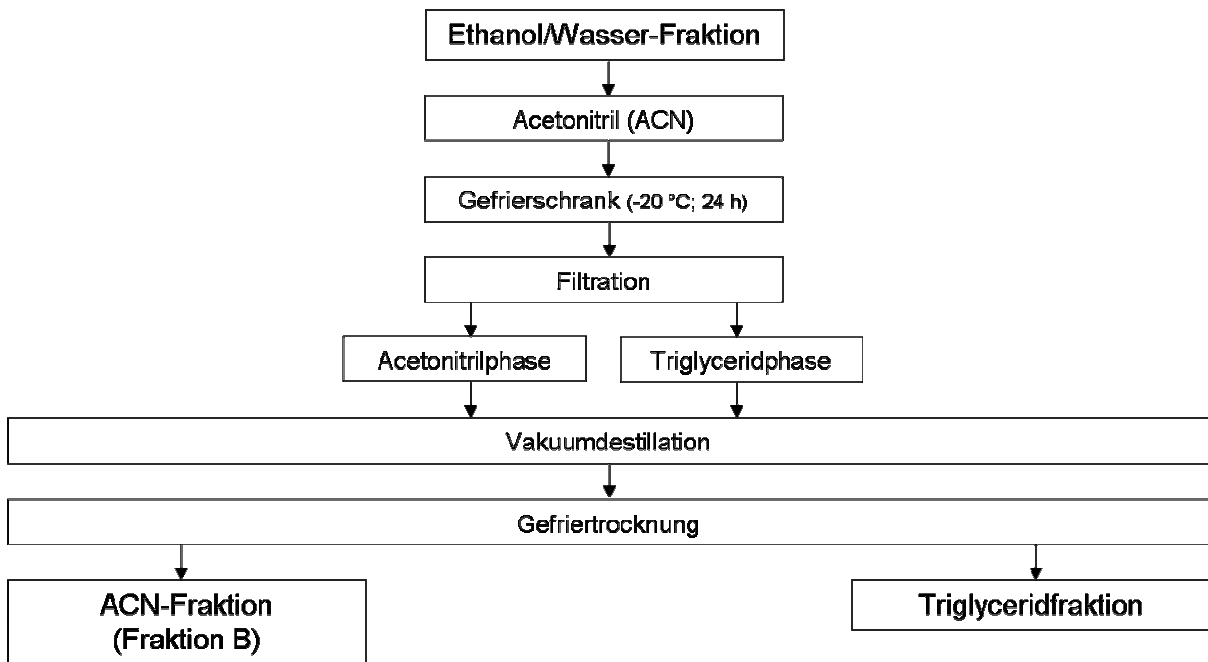


Abbildung 53: Separation der Triglyceride von Avocado-Bitter-/Kokumi-Verbindungen – Herstellung der triglyceridfreien Fraktion B.

Nach Entfernung des Lösungsmittels und Gefriertrocknung wurde die triglyceridfreie Fraktion B für die nachfolgenden Fraktionierungsexperimente zur Isolierung und Identifizierung der geschmacksaktiven Verbindungen verwendet.

3.2.2.2 Identifizierung von bitteren und Mundfülle/ Kokumi verstärkenden Verbindungen in der triglyceridfreien Fraktion B

Um die geschmacksaktiven von den geschmacklosen Verbindungen abzutrennen, wurde die aus der erhitzten *Hass*-Avocadopulpe gewonnene, triglyceridfreie Fraktion B vollständig in Acetonitril gelöst und mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase unter ELSD-Detektion fraktioniert und in die 22 Subfraktionen B1 bis B22 aufgetrennt (**Abbildung 54**). Nach Beendigung der Gefriertrocknung aller Subfraktionen wurden von diesen Aliquote in Sensorikwasser (pH 6,5) gelöst und durch Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse (Frank et al. 2001) in deren relativen Geschmacksaktivitäten gewichtet. In gleicher Weise wurde eine Geschmacksverdünnungsanalyse mit jeweiligen Aliquoten in einer „Modellbrühe“-Matrix mit definierter Zusammensetzung durchgeführt, um die modulierende Wirkung einzelner Fraktionen auf die Verstärkung der Mundfülle bzw. den Kokumi-Effekt zu untersuchen.

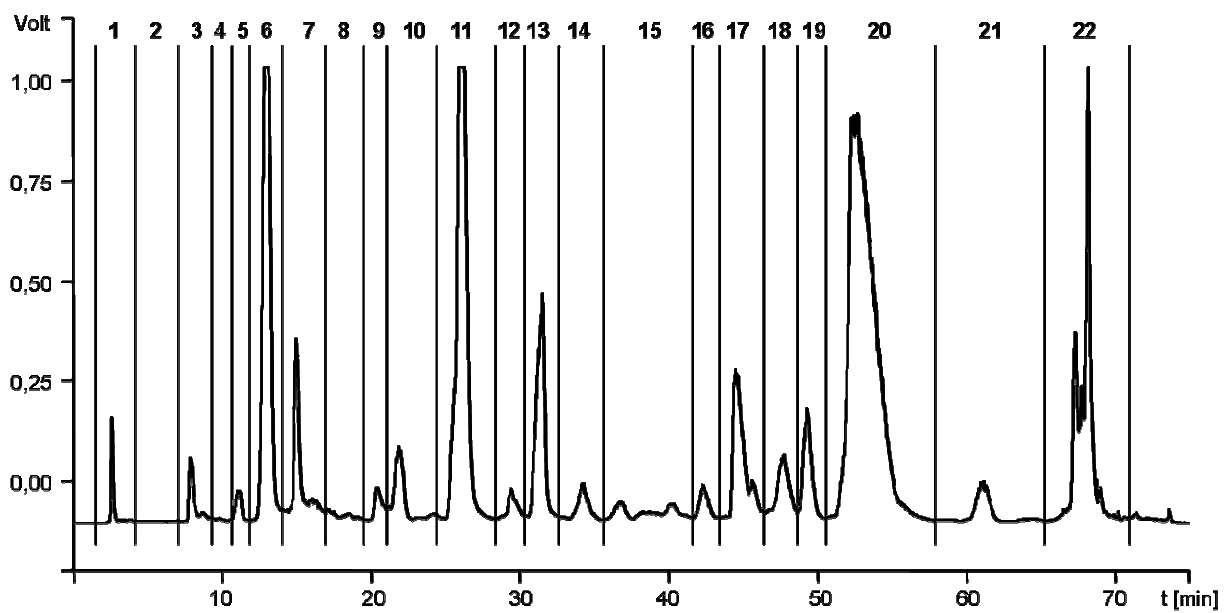


Abbildung 54: Präparatives RP-HPLC-ELSD-Chromatogramm der Fraktion B aus erhitzter Avocadopulpe, 22 Subfraktionen (B1-B22) wurden separiert.

Die Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse führte zu dem Ergebnis, dass alle verkosteten Fraktionen B1-B22 Bitterkeit aufzeigten. Die Fraktion B20 zeigte mit einem Geschmacksverdünnungsfaktor (GVF) von 16 die höchste Potenz in puncto Bitterkeit, gefolgt von den Fraktionen B3-B6, B10-B13, B17 und B19 mit GVFs von 8. Alle weiteren Fraktionen erreichten GVFs von 2 oder niedriger (**Tabelle 10**). Bei der Bestimmung der GVFs für die Kokumi-Wahrnehmung erreichte die Fraktion B20 mit 256 wiederum den höchsten Wert. Die Fraktion B11 wurde mit einem GVF von 64, die Fraktionen B6, B13, B17 und B19 wurden mit einem GVF von 32 bewertet. Bis zu einem GVF von 16 und 8 waren die Fraktionen B1, B5, B18 bzw. B7, B10, B12, B14 und B16 kokumi-aktiv.

Tabelle 10: Geschmacksqualitäten und Geschmacksverdünnungsfaktoren isolierter Fraktionen der Fraktion B erhitzter Avocadopulpe

HPLC-Fraktion ^a	Geschmacksqualität ^b	GVF für		Identifizierte Verbindung ^d
		Bitterkeit ^b	Kokumi-Enhancing ^c	
B1	leicht bitter	1	16	
B2	leicht bitter	1	1	
B3	intensiv bitter	8	1	1
B4	intensiv bitter	8	1	2
B5	intensiv bitter	8	16	3
B6	intensiv bitter	8	32	4
B7	bitter	2	8	
B8	bitter	2	4	
B9	bitter	2	4	
B10	bitter	8	8	5
B11	bitter	8	64	6
B12	bitter	8	8	
B13	bitter	8	32	7
B14	bitter	2	8	
B15	leicht bitter	1	2	
B16	bitter	1	8	
B17	bitter	8	32	8
B18	bitter	2	16	
B19	bitter	8	32	9
B20	intensiv bitter	16	256	10
B21	bitter	2	< 1	11
B22	leicht bitter	1	< 1	12

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 54**. ^b Bestimmungen in *Evian*®-Sensorikwasser mittels Half-Mouth-Test. ^c Bestimmungen in „Modellbrühe“ mittels Half-Mouth-Test. ^d Angaben gemäß **Abbildung 55**.

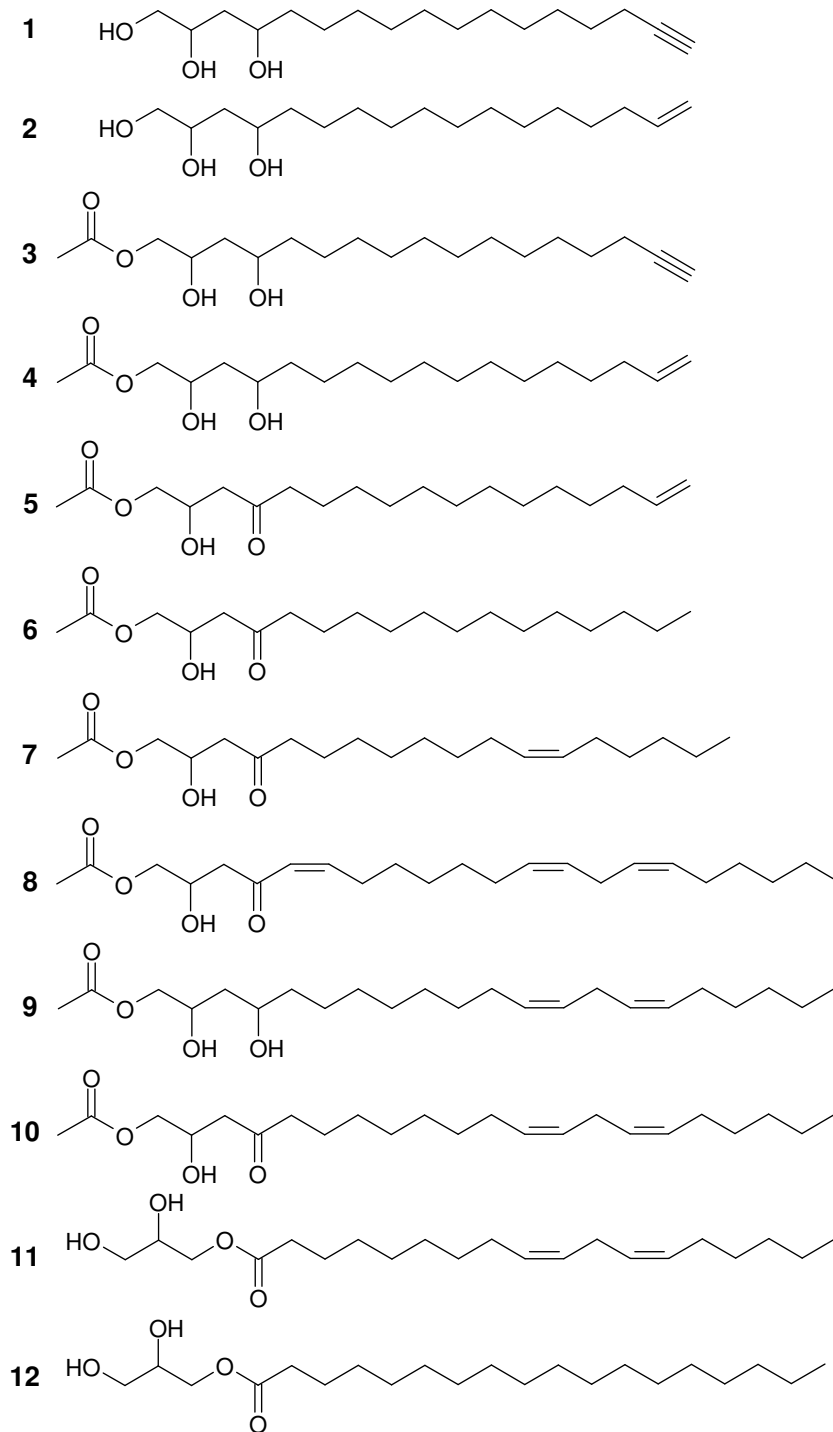


Abbildung 55: Molekülstrukturen der identifizierten Verbindungen in erhitzter Avocadopulpe:
 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1), 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (3), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7), (Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8), (Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9), (Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10), 1-Linoleoylglycerol (11), 1-Stearoylglycerol (12).

Mit dem Ziel der molekularen Identifizierung der bitteren und kokumi-verstärkenden Geschmacksstoffe wurden die aus Fraktion B der erhitzten Avocadopulpe gewonnenen Subfraktionen umfangreichen Untersuchungen durch LC-MS/MS- und 1D/2D-NMR-Experimenten unterzogen.

Bei den isolierten Verbindungen **1** und **2** handelt es sich um langkettige Fettalkohole mit endständigen Mehrfachbindungen. **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** und **10** tragen jeweils eine Acetoxygruppierung am Kohlenstoffatom C-1, eine Hydroxylgruppe an C-2 sowie eine Keto- oder eine weitere Hydroxylgruppe an Position C-4 (**Abbildung 56**); zudem sind partiell Mehrfachbindungen im Molekül enthalten. Die Kohlenstoffatome C-2 und C-4 liegen durchweg in *R*-Konfigurationen vor. Eine Ausnahme stellt Verbindung **8** mit einer *S*-konfigurierten C-4-Position dar, was durch die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 hervorgerufen wird.

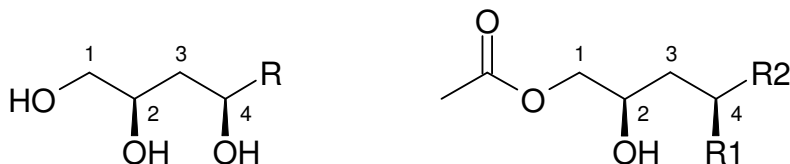


Abbildung 56: Molekülgrundstruktur identifizierter Fettalkohole 1-2 (links) und Molekülgrundstruktur identifizierter 1-Acetoxy-Derivate 3-10 (rechts) aus erhitzter Hass-Avocadopulpe.

Die Fraktion B20 (**Tabelle 10**), welche mit den höchsten GVFs von 16 und 256 für Bitterkeit bzw. Kokumi-Wahrnehmung bewertet wurde, konnte durch massenspektrometrische sowie kernresonanzspektroskopische Experimente als (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**) identifiziert werden (**Abbildung 55**). Diese ungesättigte Verbindung ist unter dem Synonym „Persin“ in zahlreichen Publikationen als in den Blättern des Avocadobaums enthaltenes Fungizid erwähnt (Bull et al. 1994; Carman et al. 1995; Oelrichs et al. 1995). Studien zur optischen Drehung (Polarisation) von synthetisierten *2R*- und *2S*-Isomeren von (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**) führten zu dem Ergebnis, dass das natürlich vorkommende Isomer an der C(2)-Position ausschließlich *R*-konfiguriert auftritt (Schäffeler et al. 1994; MacLeod et al. 1995). Sensorische Eigenschaften des Persins sind in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Bei den Schlüsselverbindungen aus den Fraktionen B3-B6 (**Tabelle 10**) handelte es sich um die Strukturen der Fettalkohole 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (**1**) und

1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (**2**) sowie um die Acetyl-Derivate 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**) und 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**4**) (**Abbildung 55**). 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (**1**), in der englischsprachigen Literatur unter der Bezeichnung „Avocadyne“ bekannt, und 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (**2**), als „Avocadene“ literaturbekannt, wurden in der Vergangenheit als bitter schmeckend (Brown 1972) beschrieben. Diese Verbindungen wurden nach deren Isolierung aus den Schalen von unreifen Avocado-beeren als Fungizide (Adikaram et al. 1992) und stereostrukturell an den Molekülpositionen C(2) und C(4) ausschließlich als in *R*-Konfiguration vorkommend charakterisiert (Sugiyama et al. 1982). Die Identifizierung von 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**) und 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**4**) erfolgte nach deren Isolierung aus Avocadopulpe sowie Avocadosamen verschiedener Sorten durch Kashman et al. (1969, 1970), Adikaram et al. (1992), Domergue et al. (2000), Hashimura et al. (2001) und Kawagishi et al. (2001). Das aus Avocadosamen isolierte 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**4**) liegt laut Ramos et al. (2006) an den C(2)- und C(4)-Positionen *R*-konfiguriert vor. Bezüglich der Geschmacksaktivität gibt es für den bitteren Geschmack von **1-4** sowie für die Kokumi-Verstärkung von **3** und **4** keine Literaturbeschreibungen.

Weitere bittere sowie kokumi-verstärkende Oxolipine wurden aus den Fraktionen B10, B11, B13, B17 sowie B19 (**Tabelle 10**) isoliert und im Anschluss als 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**5**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (**6**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**), (Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (**8**) sowie (Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (**9**) identifiziert (**Abbildung 55**). Die Doppelbindung der Verbindung **7** wurde mittels oxidativer Spaltung durch Ozonolyse und anschließender Detektion und Identifizierung des Hexenals mittels Referenzvergleich lokalisiert. Ein Ozonolyseexperiment mit Verbindung **6** führte zu keiner Veränderung dieser Verbindung, so dass das Vorhandensein einer Doppelbindung ausgeschlossen werden konnte.

Die Verbindung **8** wurde von Kim et al. (2000) als Inhibitor für Superoxid- und NO-Bildung sowie als Suppressor von NO-Synthasen und Cyclooxygenasen in Zellkultursystemen beschrieben. Darüber hinaus wurden der Verbindung **8** fungizide Eigenschaften (Domergue et al. 2000) sowie Inhibitorwirkungen gegen die Acetyl-CoA-Carboxylase zugeschrieben (Hashimura et al. 2001). Von den zuvor genannten Verbindungen sind das C₁₉-Derivat **3** sowie die C₂₁-Derivate **8** und **9** aus Früchten und

Samen der Avocado isoliert und beschrieben worden (Domergue et al. 2000; Kim et al. 2000), wohingegen die Verbindungen **6** und **7** nach besten Wissen bislang nicht als Naturstoffe in der Literatur beschrieben wurden.

Auffallend waren die Fraktionen B21 und B22, welche einen bitteren, jedoch keinerlei Kokumi-Geschmack aufwiesen (**Tabelle 10**). Nach Anwendung von LC-MS/MS-, 1D/2D-NMR-Experimenten sowie dem chromatographischen Vergleich mit Standardsubstanzen wurden in den Fraktionen die Monoglyceride 1-Linoleoylglycerol (**11**) und 1-Stearoylglycerol (**12**) als geschmacksbestimmende Schlüsselverbindungen der Fraktionen B21 und B22 identifiziert (**Abbildung 55**). Dabei hat sich zur Absicherung der Molekülmasse die Massenspektrometrie in besonderer Weise bewährt. So konnten die Molekülmassen, insbesondere die $[M+H]^+$ -Fragmente m/z 355 (**11**) sowie m/z 359 (**12**), ermittelt beziehungsweise eindeutig zugeordnet werden (**Abbildung 57** und **Abbildung 58**); käuflich erworbene Referenzsubstanzen zeigten jeweils ein identisches Fragmentierungsverhalten.

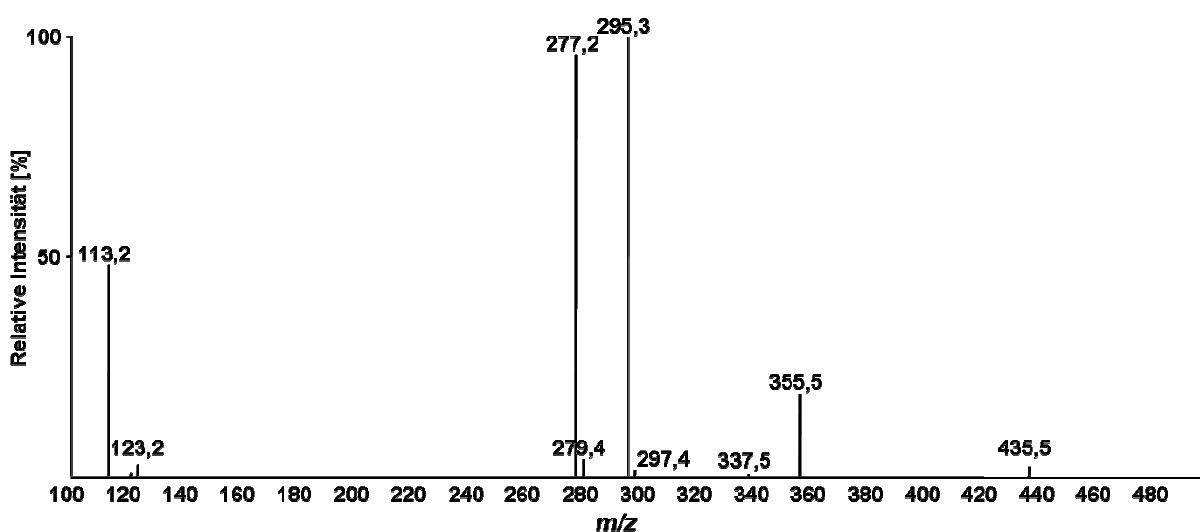


Abbildung 57: APCI(+)-LC-MS-Spektrum von 1-Linoleoylglycerol (11).

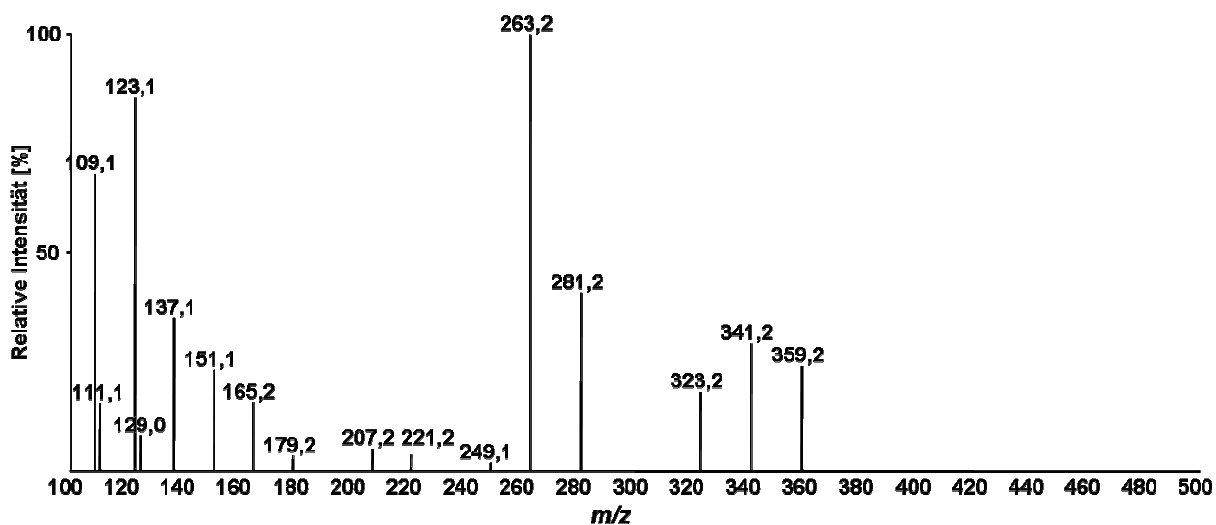


Abbildung 58: APCI(+)-LC-MS-Spektrum von 1-Stearoylglycerol (12).

3.2.3 Sensorische Charakterisierung identifizierter Avocado-Inhaltsstoffe

3.2.3.1 Bestimmung von Bitterschwellenwerten

Die identifizierten Avocadoinhaltsstoffe 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (**1**), 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (**2**), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (**4**), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**5**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (**6**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**), (*Z,Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (**8**), (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (**9**), (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**), 1-Linoleoylglycerol (**11**) sowie 1-Stearoylglycerol (**12**) (**Abbildung 55**) wurden jeweils einer Bitterschwellenwertbestimmung unterzogen. Dazu wurden die Untersuchungssubstanzen jeweils mit Ethanol angelöst, mit Sensorikwasser bei pH 6,5 versetzt und von einem geschulten Sensorikpanel in puncto Bitterkeit mittels „Half-Mouth-Test“ (Scharbert et al. 2004) evaluiert. Die Acetoxy-Verbindung **3** (27,3 µmol/l) zeigte dabei für die Bitterkeit die niedrigste Schwellenwertkonzentration, gefolgt von **4** (33,8 µmol/l) sowie den korrespondierenden deacetylierten Triolen **1** (42,8 µmol/l) und **2** (52,4 µmol/l). Die Schwellenwerte der langkettigen, ungesättigten Acetoxy-Derivate **7** und **8** sind gleich (70,0 µmol/l), die Werte für das Monoglycerid **11** (72,3 µmol/l) sowie die der Acetoxy-

Verbindungen **5** (88,2 µmol/l) und **9** (91,7 µmol/l) wurden geringfügig höher bewertet. Der in der erhitzten Avocadopulpe quantitativ dominierende Bitterstoff Persin (**10**) erreichte eine Bitterschwellenwertkonzentration von 121,1 µmol/l. Die höchsten Bitterschwellenwertkonzentrationen zeigten das Monoglycerid **12** (173,8 µmol/l) sowie das Acetoxy-Alkan **6** (313,4 µmol/l) (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Schwellenwertkonzentrationen für die Bitterkeit der identifizierten Verbindungen

Identifizierte Verbindungen ^a	Schwellenwertkonzentration ^b	
	[µmol/l]	[ppm] ^c
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1)	42,8	12,2
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2)	52,4	22,5
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (3)	27,3	8,9
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4)	33,8	11,1
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5)	88,2	28,8
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6)	313,4	102,9
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7)	70,0	26,9
(Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8)	70,0	26,5
(Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9)	91,7	25,9
(Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10)	121,1	46,1
1-Linoleoylglycerol (11)	72,3	25,6
1-Stearoylglycerol (12)	173,8	62,3

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 55**. ^b Bestimmungen in *Evian*®-Sensorikwasser mittels Half-Mouth-Test. ^c Konzentrationen entsprechen [mg/kg].

Im Vergleich zu den Triolen **1** und **2** sowie zu den 2,4-Dihydroxy-Derivaten **3** und **4** bestehen die weiteren Verbindungen (**5-8**, **10**) aus einer 2-Hydroxy-4-oxo-Struktur, welche allesamt höhere Bitterschwellenwerte aufwiesen. So zeigte **4** einen ca. dreifach niedrigeren Schwellenwert als das korrespondierende 4-Oxo-Derivat (**5**) (**Tabelle 11**).

Die sensorischen Daten der in der Avocadopulpe identifizierten Monoglyceride (MG) 1-Linoleoylglycerol (**11**) und 1-Stearoylglycerol (**12**) wurden mit denen weiterer (ra-

cemischer) MG-Strukturanaloga verglichen. Diesbezüglich erfolgte die Bestimmung der Schwellenwertkonzentrationen für Bitterkeit von 1-Oleoylglycerol (**13**), 2-Oleoylglycerol (**14**), 1-Palmitoylglycerol (**15**) sowie dessen artifiziellem Abkömmling 1-O-Palmitylglycerin (**16**) (**Abbildung 59**).

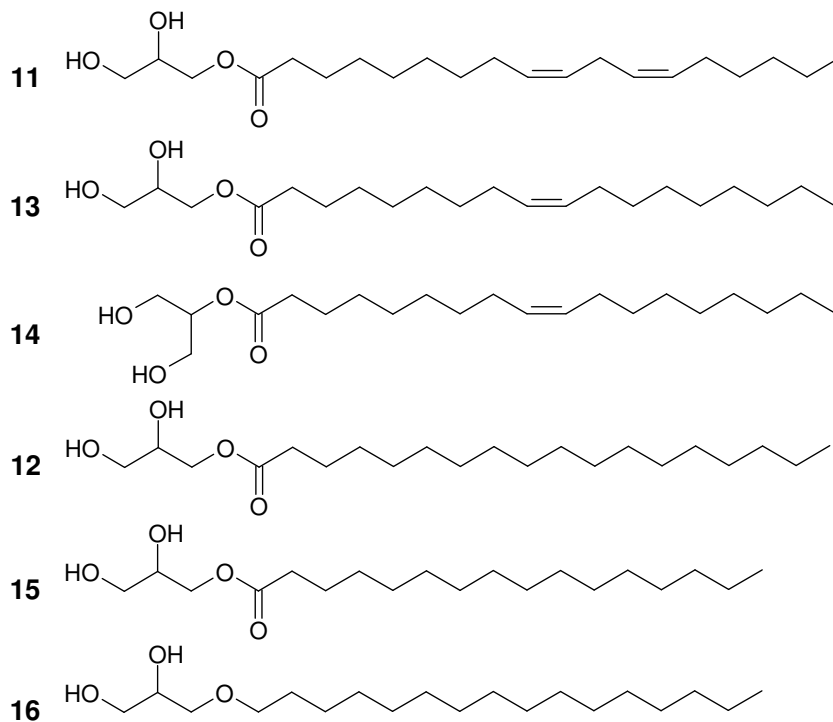


Abbildung 59: Molekülstrukturen der identifizierten Monoglyceride 1-Linoleoylglycerol (**11**), 1-Stearoylglycerol (**12**) sowie der Monoglyceridderivate 1-Oleoylglycerol (**13**), 2-Oleoylglycerol (**14**), 1-Palmitoylglycerol (**15**), 1-O-Palmitylglycerin (**16**).

Mit einem Schwellenwert von 57,1 $\mu\text{mol/l}$ zeigte das 2-MG-Isomer **14** die mit Abstand geringste Bitterschwellenwertkonzentration, gefolgt von **11** (72,3 $\mu\text{mol/l}$) und **13** (138,3 $\mu\text{mol/l}$). Die Schwellenwerte von **12** (173,8 $\mu\text{mol/l}$), **15** (161,3 $\mu\text{mol/l}$) und **16** (166,6 $\mu\text{mol/l}$) waren nahezu gleich (**Tabelle 12**).

Tabelle 12: Schwellenwertkonzentrationen für Bitterkeit der Monoglyceride und Abkömmlinge

Untersuchte Verbindungen ^a	Schwellenwertkonzentrationen ^b für Bitterkeit	
	[$\mu\text{mol/l}$]	[ppm] ^b
1-Linoleoylglycerol (11)	72,3	25,6
1-Oleoylglycerol (13)	138,3	49,3
2-Oleoylglycerol (14)	57,1	20,4
1-Stearoylglycerol (12)	173,8	62,3
1-Palmitoylglycerol (15)	161,3	53,3
1-O-Palmitylglycerin (16)	166,6	52,7

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 59**. ^b Bestimmungen in *Evian*®-Sensorikwasser mittels Half-Mouth-Test. ^c Konzentrationen entsprechen [mg/kg].

3.2.3.2 Bestimmung der Schwellenwerte für Mundfülle-/ Kokumi-Aktivität

Analog der „Modellbrühe“-Geschmacksverdünnungsanalyse der Fraktion B wurden die identifizierten Verbindungen in der gleichen Matrix sensorisch untersucht. Die Untersuchungen in der „Modellbrühe“-Matrix mit definierter Zusammensetzung sollte zu Rückschlüssen betreffs Einflusses einzelner Verbindungen auf die Verstärkung der Mundfülle und damit auf die Steigerung der Geschmacksattraktivität – genannt „Kokumi-Enhancing“ – führen.

Die zu verkostenden Proben wurden den beteiligten Sensorikern wiederum in der Reihe steigender Konzentrationen angeboten. Jede einzelne Verdünnungsstufe wurde mehrfach von einem Sensorikpanel im Vergleich zu einem Blindwert aus purer „Modellbrühe“ via Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004) verkostet. Die Verdünnungsfaktoren, bei denen gerade noch eindeutig ein Verstärkungseffekt gegenüber den Blindproben erkannt wurde, konnten gemittelt und als Schwellenwertkonzentration für Kokumi-Enhancing angegeben werden.

Bei der sensorischen Evaluierung der aus der erhitzten Avocadopulpe isolierten Substanzen bestimmte das Sensorikpanel einen Schwellenwertbereich von 1,8 (**8**) bis 17,2 $\mu\text{mol/l}$ (**6**) beziehungsweise 0,7 (**8, 9**) bis 5,6 ppm (**6**).

(*Z,Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (**8**) und (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (**9**) zeigten die niedrigsten Schwellenwerte und somit das höchste Potential, den Kokumi-Effekt in der Modellbrühe hervorzurufen und zu verstärken. **3** erreichte einen Wert von 4,6 µmol/l und **7** einen Wert von 5,2 µmol/l, gefolgt von **10**, **4** sowie **5** mit 8,4 µmol/l, 8,5 µmol/l und 10,7 µmol/l. Den höchsten Schwellenwert von 17,2 µmol/l für den genannten Verstärkungseffekt beobachtete das Panel für 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (**6**) (**Tabelle 13**).

Hingegen zeigten die Fettalkohole (**1**, **2**) und die Monoglyceride (**11**, **12**) keine Geschmacksverstärkung beziehungsweise keinen Kokumi-Effekt.

Tabelle 13: Schwellenwertkonzentrationen für den Kokumi-Enhancing-Effekt der identifizierten Verbindungen

Identifizierte Verbindungen ^a	Schwellenwertkonzentration ^b	
	[µmol/l]	[ppm] ^c
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1)	n.d.	n.d.
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2)	n.d.	n.d.
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (3)	4,6	1,5
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4)	8,5	2,8
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5)	10,7	3,5
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6)	17,2	5,6
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7)	5,2	1,8
(<i>Z,Z,Z</i>)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8)	1,8	0,7
(<i>Z,Z</i>)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9)	1,9	0,7
(<i>Z,Z</i>)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10)	8,4	3,2
1-Linoleoylglycerol (11)	n.d.	n.d.
1-Stearoylglycerol (12)	n.d.	n.d.

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 55**. ^b Bestimmungen in Modellbrühe mittels Half-Mouth-Test in Modellbrühe. ^c Konzentrationen entsprechen [mg/kg].

Nach der Struktur-Wirkungsbetrachtung ist erkennbar, dass für das Auftreten des Kokumi-Effektes das 1-Acetoxy-System essentiell ist. Eine große Zahl an Kohlen-

stoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen sind für einen geringen Kokumi-Geschmacksschwellenwert prädestiniert. Wohingegen die deacetylierten Triole (**1**, **2**) und die Monoglyceride (**11**, **12**) keinerlei Einfluss auf die Kokumi-Wahrnehmung zeigten.

Wurden in der Literatur bislang ausschließlich polare *S*-Alkyl-*L*-cysteinsulfoxid- und/oder γ -Glutamyl-Derivate als kokumihervorrufende Verbindungen beschrieben (Dunkel et al. 2007; Toelstede et al. 2009; Ueda et al. 1990 und 1994), so zeigt die vorliegende Arbeit erstmalig, dass lipophile C₁₇-C₂₁-Oxylipine mit einer 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy- sowie einer 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-Molekülstruktur die geschmacksmodulierenden Aktivitäten bzw. eine Verstärkung des Kokumi-Geschmacks verursachen.

3.2.4 Konzentrationen und Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren der Verbindungen 1-12 in frischer und erhitzter Avocadopulpe

Um den Einfluss des Erhitzungsprozesses auf die Bildung der geschmacksaktiven Verbindungen **1-12** zu studieren, wurden Aliquote von frisch zubereitetem Avocadopüree bei 120 °C über einen Zeitraum von 120 min erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die erhitzte Probe sowie eine nicht erhitzte Probe mit einer definierten Menge 1-O-Palmitylglycerin (**16**) (**Abbildung 59**), welche als interne Standardverbindung diente, versetzt. Nach Optimierung der chromatographischen Bedingungen sowie sämtlicher APCI-MS/MS-Parameter wurden die Analyten **1-12** und die interne Standardverbindung innerhalb von 45 min voneinander getrennt, wie exemplarisch für das Oxylipin **7**, dem 1-O-Acylglycerol **11** und der internen Standardverbindung (**IS**) in **Abbildung 60** aufgeführt. Die quantitative Analyse ergab für die Verbindungen **1-12** Gehalte zwischen 0,5 (**7**) und 5,6 mg/100 g (**12**) in frischer, nativer Avocadopulpe sowie markante Konzentrationsanstiege aller geschmacksaktiver Verbindungen in der erhitzten Probe, wie beispielsweise von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-*n*-octadeca-12-en (**7**) und 1-Linoleoylglycerol (**11**), deren Gehalte nach dem Erhitzungsprozess um die Faktoren 870 und 90 erhöht waren (**Tabelle 14**).

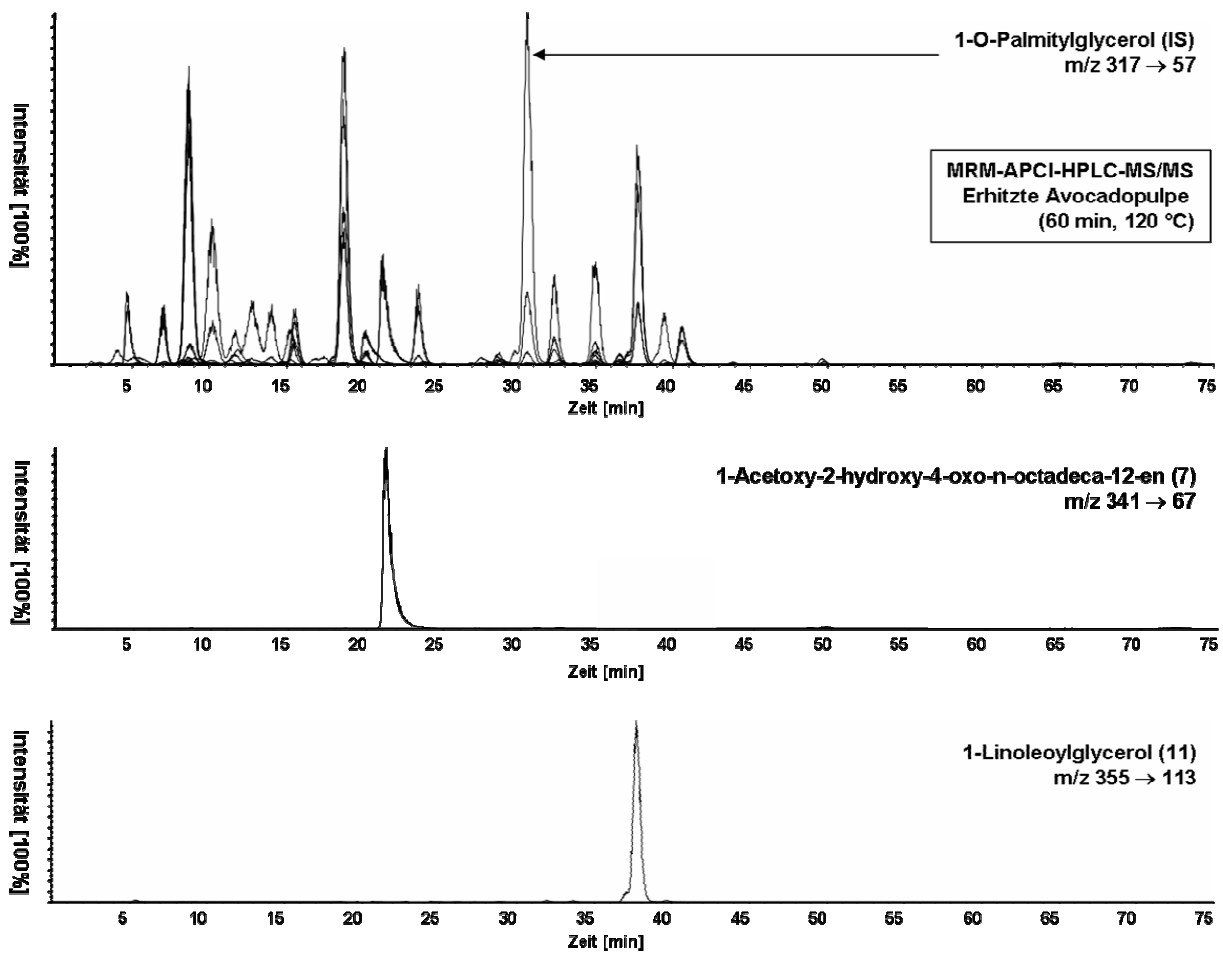


Abbildung 60: Quantifizierung ausgewählter Verbindungen in erhitzter Avocadopulpe mittels HPLC-MS/MS unter Einsatz einer internen Standardverbindung (IS).

Tabelle 14: Konzentrationen identifizierter Avocadoinhaltsstoffe und DoT-Faktoren in nativer und erhitzter Avocadopulpe

Identifizierte Verbindungen ^a	Konzentration ^b [mg/100 g] (DoT-Faktor) ^c in	
	Nativer Pulpe	Erhitzter Pulpe ^d
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1)	0,72 ± 0,14 (0,6)	151,82 ± 1,96 (124,4)
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2)	0,73 ± 0,09 (0,6)	126,51 ± 7,78 (103,7)
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (3)	0,72 ± 0,11 (0,8)	74,82 ± 4,13 (84,1)
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4)	0,77 ± 0,03 (0,7)	136,18 ± 2,51 (122,7)
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5)	1,98 ± 0,43 (0,7)	303,80 ± 1,37 (105,5)
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6)	4,78 ± 0,09 (0,5)	363,57 ± 10,24 (35,3)
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7)	0,45 ± 0,02 (0,2)	435,36 ± 16,87 (161,8)
(Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8)	2,26 ± 0,78 (0,9)	340,33 ± 28,67 (128,4)
(Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9)	1,64 ± 0,53 (0,6)	301,39 ± 20,94 (116,4)
(Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10)	3,64 ± 0,33 (0,8)	117,92 ± 10,46 (25,6)
1-Linoleoylglycerol (11)	3,33 ± 1,14 (1,3)	296,69 ± 39,43 (115,6)
1-Stearoylglycerol (12)	5,55 ± 3,15 (0,4)	191,05 ± 23,18 (14,2)

^a Bezeichnungen gemäß **Abbildung 55**. ^b Ergebnisse ± Standardabweichungen von drei unabhängigen Bestimmungen; ^c DoT – berechnet für den Beitrag der einzelnen Verbindung zur Bitterkeit; ^d Bei 120 °C über einen Zeitraum von 120 min erhitztes, frisch zubereitetes Avocadopüree.

Um den Beitrag der einzelnen Substanzen an der Gesamtbitterkeit zu bewerten, wurden aus den quantitativen Gehalten der Substanzen **1-12** die DoT-Faktoren berechnet. Dabei stellen die DoT-Faktoren das Verhältnis der Konzentration der Einzelsubstanz in der Probe zu dessen jeweiligem Erkennungsschwellenwert dar (Hufnagel und Hofmann 2008). Mit Ausnahme des Monoglycerids 1-Linoleoylglycerol (**11**) waren in frischer Avocadopulpe sämtliche DoT-Faktoren der analysierten Verbindungen unter dem Wert 1,0 bzw. lagen somit unterhalb ihrer Erkennungsschwellenwertkonzentration vor, sodass diese keinen Geschmack bewirkten. Dagegen zeigten die Analyten **1-12** nach der Erhitzung DoT-Faktoren von 14 für 1-Stearoylglycerol (**12**) bis 162 für 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**), was als ein deutlicher Beweis dafür anzusehen ist, dass der bittere Fehlgeschmack von thermisch behandelte Avocadopulpe durch die intensiven Konzentrationsanstiege der Verbindungen **1-12** hervorgerufen wird.

3.2.5 Rekonstruktion der Bitterkeit in frischer Avocadopulpe

Im folgenden Verlauf sollte die Bitterkeit erhitzter Avocadopulpe durch Zugabe der identifizierten Bitterstoffe **1-12** rekonstruiert werden. Dazu wurde frisch hergestelltes Avocadopüree („Native Pulpe“) mit der adäquaten Menge aus erhitzter Avocadopulpe isolierter Fraktion B versetzt („Native Pulpe + **1-12**“). Die beiden Ansätze wurden mit einer Probe des thermisch behandelten Avocadopürees („Erhitzte Pulpe“, 120 °C für 120 min) sensorisch bezüglich der relativen Intensitäten der Bitterkeit und der Mundfülle verglichen und jeweils mittels einer 5-Punkte-Skala evaluiert (**Abbildung 61**). In Anlehnung an die Resultate der Profilsensorik (**Abbildung 50**) wurden für das native und das erhitzte Avocadopüree in puncto Bitterkeit Intensitätswerte von 0,8 und 4,0 sowie Kokumi-Intensitäten von 1,1 und 3,0 bestimmt. Die Evaluation des mit den Substanzen **1-12** dotierten Pürees ergab relative Intensitäten von 3,4 für Bitterkeit und 2,9 für Kokumi-Wahrnehmung (**Abbildung 61**). Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen innerhalb des Sensorikpanels zeigte sich, dass durch Dotierung von frischem Avocadopüree mit den Verbindungen **1-12** nahezu vollständig die Intensität der Bitterkeit und der Mundfülle der erhitzten Probe rekonstruiert werden konnte. Somit sind die Substanzen **1-12** für die höhere Bitterintensität sowie für eine höhere Mundfülle von thermisch behandelte Avocadopulpe verantwortlich.

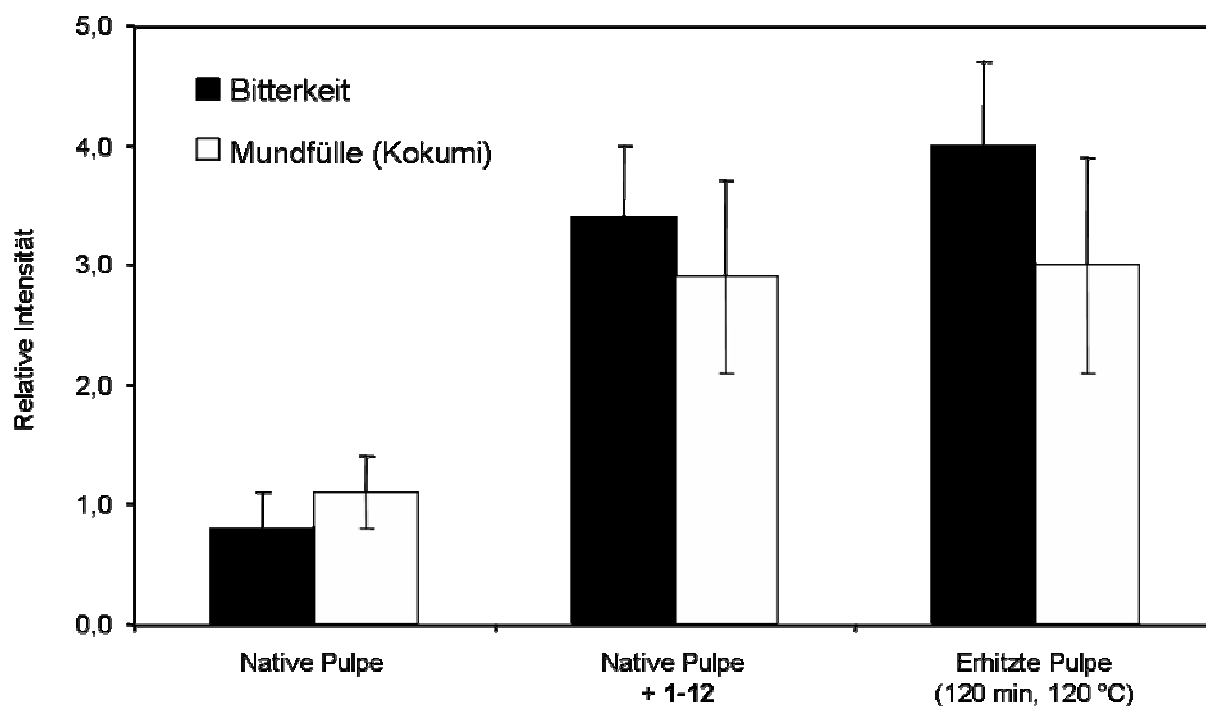


Abbildung 61: Relative Intensität der Bitterkeit und der Mundfülle von nativen, mit den Substanzen 1-12 versetzten nativen sowie erhitzten Avocadopürees.

Mit diesem Ergebnis bzw. Daten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die (C₁₇-C₂₁)-Oxylipine (**1-10**) sowie die Monoglyceride (**11**, **12**) die Schlüsselverbindungen für die Bitterkeit thermisch behandelter Avocado sind. Dabei kommt der Verbindung 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**) die höchste Bedeutung bzw. die höchste Aktivität als Einzelverbindung zu. Die identifizierten Oxylipine **3-10** weisen allesamt ein 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy- oder ein 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-Molekülsystem auf, welche neben der Bitterkeit auch für die Mundfülle verstärkende Wirkung – genannt Kokumi-Aktivität – verantwortlich sind.

3.2.6 Zeitabhängige Entwicklung von Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren ausgewählter Geschmacksstoffe während der Erhitzung von Avocadopulpe

Um die Entwicklung der DoT-Faktoren in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit zu untersuchen, wurden 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**), die Verbindung mit dem niedrigsten Schwellenwert für Bitterkeit (**Tabelle 11**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-

oxo-n-octadeca-12-en (**7**), die Verbindung mit dem höchsten DoT-Faktor nach 120 min Erhitzung bei 120 °C (**Tabelle 14**), sowie das in der Literatur sehr umfangreich beschriebene (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**) nach unterschiedlichen Erhitzungszeiten bei 120 °C mittels HPLC-MS/MS-Analyse in Avocadopulpe quantifiziert. Die Berechnung der DoT-Faktoren führte zu dem Ergebnis, dass die Substanzen **3**, **7** und **10** bereits nach zehn Minuten oberhalb ihrer Schwellenwertkonzentration in der Avocadopulpe vorhanden waren (**Abbildung 62**).

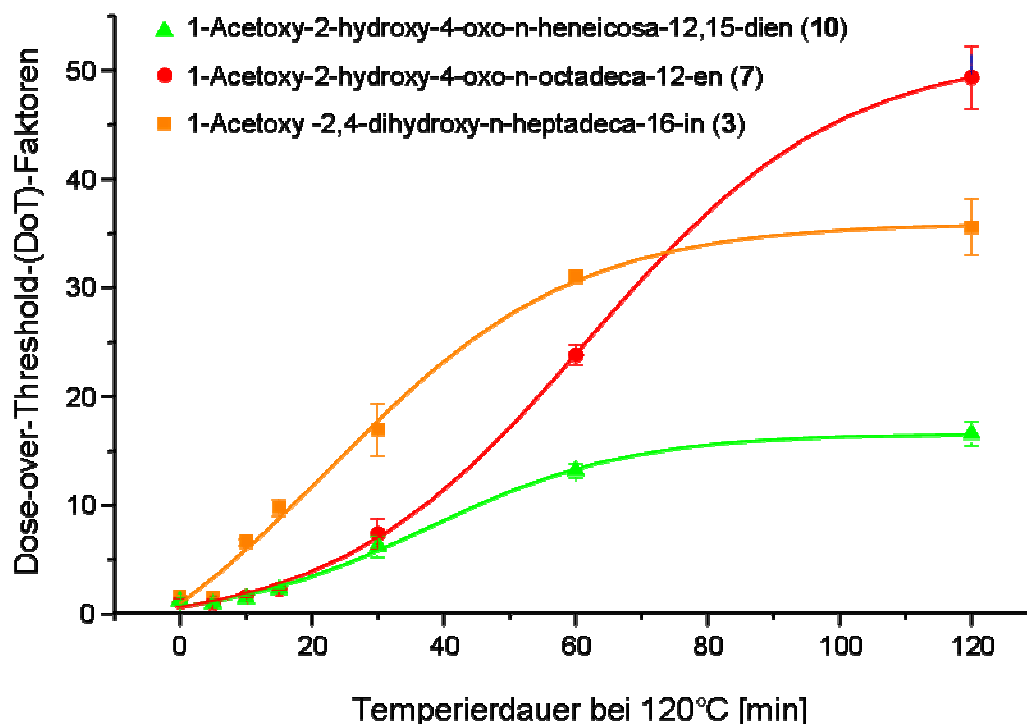


Abbildung 62: Einfluss der Erhitzungsdauer auf die DoT-Faktoren der Bitterstoffe **3**, **7** und **10** in Avocadopulpe.

Somit bewirkte die Verlängerung der Erhitzungsdauer wesentliche DoT-Wertanstiege der ausgewählten Verbindungen. Dabei erreichte die Verbindung **3** einen DoT-Faktor von 30,4, gefolgt von 23,2 und 12,5 für **7** und **10** nach 60 min. Oberhalb dieser Zeit erfolgte nur noch ein geringfügiger DoT-Wertanstieg von **3** und **10**. Dagegen erfuhr die Substanz **7** zwischen 60 und 120 min Erhitzung den stärksten DoT-Wertzuwachs und erreichte letztendlich einen Wert von 48,7.

Die erhaltenen Daten lassen vermuten, dass die identifizierten Oxylipine aus in der Avocadopulpe enthaltenen, unbekanntem Präkursoren hervorgehen. Präkursorfrakti-

onen, welche nach Erhitzung die Verbindungen **2** und **4** freisetzen konnten, wurden in fettlöslichen Anteilen in konserviertem Avocadosaft lokalisiert (Lu et al. 1986). Strukturvorschläge für diese thermolabilen Präkursoren existieren bislang jedoch nicht.

3.2.7 Diskussion

Es ist bekannt, dass das Erhitzen von Avocadopulpe eine Erhöhung der Intensität der Bitterkeit hervorruft. Jedoch wurde bisher noch nicht beschrieben, dass die Bitterkeit erhitzter Avocadopulpe von der Erhitzungstemperatur sowie von der Erhitzungsdauer abhängig ist. Die vorliegende Arbeit beschränkte sich bei der Untersuchung der Bitterintensität erhitzter Avocadopulpe auf eine maximale Erhitzungstemperatur von 120 °C bei einer Temperierzeit von 120 min. Weitere Erhöhungen mit eventuell damit einhergehenden Zunahmen an Bitterintensitäten bzw. Bitterstoffkonzentrationen wären demnach denkbar, sollten dem Sensorikpanel jedoch nicht zugemutet werden, da diese Prozessbedingungen in der industriellen Lebensmittelverarbeitung nicht angewendet werden.

Mittels moderner instrumentell-analytischer Verfahren konnten während der durchgeführten Untersuchungen die Verbindungen 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (**6**) und 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**) erstmalig identifiziert werden. Mithilfe einer durch die Ozonolyse herbeigeführten oxidativen Spaltung und anschließender Identifizierung der Reaktionsprodukte konnte die Position der Doppelbindung von **7** lokalisiert werden. Darüber hinaus wurden weitere Stoffe identifiziert. Zu diesen gehören die Fettalkohole 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (**1**) und 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (**2**). Weiterhin konnten die 1-Acetoxy-Derivate 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**4**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (**5**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (**6**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**), (Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (**8**), (Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (**9**) und (Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**) nachgewiesen werden. Außerdem wurden die Monoglyceride 1-Linoleoylglycerol (**11**) und 1-Stearoylglycerol (**12**) identifiziert. Betrachtet man die 1-Acetoxy-Derivate **3-10** so zeigt sich, dass die Acetoxygruppe C-16-, C-17-, C-18- und C-21-Ketten tragen, welche zum Teil ungesättigte Einheiten darstellen. Bei den identifizierten Verbindungen **1-12** handelt es sich um sogenannte „Oxylipine“.

umfassen eine Stoffgruppe von Oxidationsprodukten mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit Sauerstoff und von diesen primären Oxidationsprodukten abgeleitete Substanzen.

Nach Betrachtung der Molekülstrukturen aller untersuchten Avocadoinhaltsstoffe lässt sich zwischen den ermittelten Bitterschwellenwerten der Acetoxy-Derivate und der Polarität der Moleküle eine Abhängigkeit feststellen: Acetoxy-Derivate mit einer höheren Polarität bzw. Verbindungen mit einem niedrigeren Sättigungsgrad besitzen höhere Schwellenwerte; verdeutlicht ist das bei den Molekülpaar-betrachtungen **3** (27,3 µmol/l) vs. **4** (33,8 µmol/l), **5** (88,3 µmol/l) vs. **6** (313,4 µmol/l) und **8** (70,0 µmol/l) vs. **10** (121,1 µmol/l). Jedoch den bedeutendsten Einfluss auf die Schwellenwertkonzentration für Bitterkeit unter den untersuchten Acetoxy-Derivaten übt – auf Grundlage der vorliegenden Schwellenwerte – die Hydroxylgruppe an der Molekülgerüstposition C-4 aus. Verbindungen, welche an der C-4-Position eine Hydroxylgruppe tragen, besitzen grundsätzlich einen geringeren Schwellenwert als ihre 4-Keto-Struktur-analoga – verdeutlicht ist dies an den paarweisen Strukturbeispielbetrachtungen **4** (33,8 µmol/l) vs. **5** (88,3 µmol/l) und **9** (91,7 µmol/l) vs. **10** (121,1 µmol/l). Somit sind nach der Struktur-Wirkungsbetrachtung die Polarität des Moleküls und das Vorliegen einer Hydroxylgruppe an der C-4-Position die Parameter, welche den größten Einfluss auf die Geschmacksschwellenwerte für Bitterkeit besitzen.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich nach Durchführung der sensorischen Analysen der Monoglyceride (MG) und deren Derivaten **12-16** ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Schwellenwertkonzentration für Bitterkeit und der Polarität feststellen. So besitzen 1-MGs mit kürzeren Fettsäureketten scheinbar niedrigere Schwellenwerte (vgl. **12** (173,8 µmol/l) vs. **15** (161,3 µmol/l)), und 1-MGs mit höheren Sättigungsgraden höhere Schwellenwerte (vgl. **11** (72,3 µmol/l) vs. **13** (138,3 µmol/l) vs. **12** (173,8 µmol/l)) für Bitterkeit. Im Vergleich zu einer Literaturreferenz sei an dieser Stelle erwähnt, dass durch Biermann et al. (1979) für das aus gemahlenem Hafer isolierte (*E,Z*)-9-Hydroxyoctadeca-9,11-dienglycerin-1-ester ein Schwellenwertkonzentrationsbereich für Bitterkeit von 1,1-2,2 mmol/l bestimmt wurde. Folglich ist nicht ausschließlich eine hohe Anzahl an Doppelbindungen innerhalb von Monoglyceridmolekülen für einen niedrigen Bitterschwellenwert entscheidend, sondern scheinbar auch die Konfiguration und Konstitution. Den offensichtlich deutlichsten Einfluss auf den Bitterschwellenwert hat hingegen – gemäß der vorliegenden Daten – die Konsti-

tution des Glycerins und der Fettsäure; da jedoch nur ein einziger (1-MG)-(2-MG)-Vergleich vorliegt, kann diesbezüglich nur eine Hypothese aufgestellt werden: Unter den Monoglyceriden besitzen die 2-MG-Moleküle stets die niedrigeren Schwellenwertkonzentrationen für Bitterkeit als ihre 1-MG-Strukturanaloga. – Diese Hypothese stützt sich jedoch bislang ausschließlich auf das Vorliegen der Schwellenwerte von racemischen 1- (**13**) und 2-Oleoylglycerol (**14**).

Nach den Schwellenwertbestimmungen in der Modellbrühe sowie nach der Struktur-Wirkungsbetrachtung der identifizierten Verbindungen **1-12** ist für das Auftreten des Kokumi-Effektes das 1-Acetoxy-System essentiell, wobei eine große Zahl an Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen für einen geringen Kokumi-Geschmacksschwellenwert prädestiniert ist. Zeigten die 1-Acetoxy-Derivate **3-10** den gewünschten Effekt, so blieben die Triole (**1, 2**) sowie die Monoglyceride (**11, 12**) wirkungslos. Dies ist dahingehend interessant, da in der Literatur bezüglich des Kokumi-Effektes nur polare Verbindungen, bspw. γ -Glutamyl-Derivate (Dunkel et al. 2007; Toelstede et al. 2009), beschrieben sind. Somit sind die identifizierten C₁₇-C₂₁-Oxylipine **3-10** die ersten lipophilen Verbindungen, die eine Verstärkung des Kokumi-Geschmacks und damit eine Geschmacksmodulation verursachen.

Mittels Zugabe der Verbindungen **1-12** in frisches Avocadopüree konnte die Bitterkeit von erhitztem Püree nahezu vollständig in den Intensitäten der Bitterkeit und der Mundfülle rekonstruiert werden. Da die erhitzte gegenüber der nativen Avocadopulpe eine veränderte Konsistenz aufwies, war ein sensorischer Vergleich mit Fokus auf Bitter- und Kokumi-Intensität sehr schwer zu führen. Dennoch waren eine Evaluation und eine Auswertung dieses Experiments möglich. Durch dieses Rekombinationsexperiment konnte gezeigt werden, dass die Substanzen **1-12** für die höhere Bitterintensität sowie für eine höhere Mundfülle von thermisch behandelter Avocadopulpe verantwortlich sind.

Während der Erhitzung von Avocadopulpe kommt es zu Konzentrationserhöhungen aller identifizierten Verbindungen **1-12**, welche jedoch nicht linear und für alle Substanzen gleich verlaufen. Die Untersuchung der Entwicklung der DoT-Faktoren von 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**) sowie (Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**) in Abhängigkeit von der Temperierdauer nach unterschiedlichen Erhitzungszeiten bei 120 °C zeigte, dass die DoT-Werte der Verbindungen bereits nach

10 min den Wert 1,0 überschritten und somit oberhalb ihrer Schwellenwertkonzentration vorlagen. Die ermittelten DoT-Faktoren aller quantifizierten Verbindungen wurden einer Varianz-Analyse, einem „Fisher`s LSD Test“ unterzogen, wobei die kleinsten signifikanten Unterschiede aller Einzelwerte in die Berechnung einfließen. Dabei stellte sich heraus, dass nach Ablauf einer 30minütigen Erhitzungsdauer bei 120 °C die Konzentrationen der Bitterstoffe **3**, **7** und **10** gegenüber denen der nicht erhitzten, nativen Avocadopulpe signifikant erhöht waren. Über die Ursache der Konzentrationszunahmen der Verbindungen **1-12** kann bislang keine schlüssige Erklärung geliefert werden. Lu et al. (1986) lokalisierten die Präkursoren in fettlöslichen Anteilen von konserviertem Avocadosaft und schlussfolgerten, dass die Bildung dieser Präkursorverbindungen durch Fettoxidationsprozesse hervorgerufen werden. Diese Hypothese, dass die Präkursoren in der Fettphase lokalisiert sind, konnte durch den Autor bestätigt werden. Bei Erhitzungsexperimenten von kaltgepresstem Avocadoöl in Gegenwart von Wasser konnte mittels massenspektrometrischer Analyse sowie nach präparativer Isolierung mit anschließendem NMR-Spektrenvergleich die Verbindung Persin (**10**) identifiziert werden. Präparative Isolierungsversuche der entsprechenden Präkursorverbindungen verliefen ohne Erfolg, sodass eine Strukturaufklärung noch aussteht. Abschließend bleibt jedoch die Erkenntnis, dass es sich bei dem Persin-Präkursor – und wahrscheinlich auch bei den Vorläuferverbindungen der anderen Bitterstoffe – um stark unpolare, fettlösliche Komponenten handelt, deren Molekulargewichte wesentlich größer als die ihrer 1-Acetoxy-2-hydroxy-Analoga sind.

4 Experimenteller Teil

Die Durchführung der Experimente für die Untersuchung des Chicorées (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) erfolgte, falls nicht anders angegeben, jeweils für Chicorée-Salatköpfe sowie für die Chicorée-Wurzeln. Die Bezeichnung „Chicorée“ steht, wenn nicht anders angegeben, für den durch Treiben im Dunkeln gewonnenen gebleichten Blattkopf der Zichorie.

Die Bezeichnung „Avocado“ bezieht sich, wenn nicht anders angegeben, auf das pürierte Fruchtfleisch der Avocadosorte „Hass“ (*Persea americana* Mill. cv. *Hass*).

4.1 Materialien und Reagenzien

4.1.1 Untersuchungsmaterialien

4.1.1.1 Chicorées und weitere Korbblütler

Frische, in einer 5-kg-Kiste lichtgeschützt verpackte Chicorée-Salatköpfe wurden in einem Großhandel in Münster/Westfalen gekauft. Für sämtliche Untersuchungen wurden nur ausgewachsene Chicorée-Salatköpfe, welche keine sichtbaren Schäden zeigten, verwendet. Die Chicorées hatten ein Gewicht von 246,1 bis 372,6 g und stammten laut Verpackungsetikett von „The Greenery“ (Barendrecht, NED).

Die Pflanzen für die Bereitstellung der Chicorée-Wurzelproben wurden im Garten des *Instituts für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie* der *Westfälischen Wilhelms-Universität Münster* kultiviert. Im Alter von 15 Monaten wurden die Pflanzen ausgegraben; die Wurzeln wurden innerhalb einer Zeitspanne von sechs Stunden mit einem Messer abgetrennt, gebürstet, gewaschen, mittels flüssigem Stickstoff tiefgefroren, in einer Mühle gemahlen und pulverisiert gefriergetrocknet.

Weitere Korbblütler wie grüner Löwenzahn, gebleichter Löwenzahn, spanische Artischocken, sardinische Artischocken, Radicchio Rosso und Zuckerhut wurden ebenfalls in einem Großhandel in Münster/Westfalen erworben und für Analysen nur verwendet, wenn keine Beschädigungen des Pflanzenmaterials vorlagen.

4.1.1.2 Avocados

Bei den untersuchten Avocados handelte es sich um reife Früchte der Sorte *Hass* (*Persea americana* Mill. cv. *Hass*); sie entsprachen den Qualitätsstufen „Extra Class“ und „Class I“, wurden im Einzelhandel in Münster/Westfalen sowie in Freising erworben und stammten laut Angaben der Importeure *Westfalia Marketing (PTY) Ltd.* (Tzaneen, RSA) aus Südafrika, laut *Xarki S. L.* (Vélez-Málaga, Málaga, ESP) aus Chile sowie laut *Agrexco Ltd.* (Tel-Aviv, ISR) aus Israel.

4.1.2 Reagenzien

Soweit nicht anders aufgeführt, hatten alle verwendeten Reagenzien „p. A.“-Qualität. In der HPLC-Analyse eingesetzte Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität, das eingesetzte Wasser wies Millipore-Qualität auf.

Acetonitril, Merck KGA, Darmstadt, GER

Ameisensäure, Merck KGA, Darmstadt, GER

Chloroform-*d*, Euriso-Top, Gif-sûr-Yvette, FRA

Cichoriensäure, Cfm Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, GER

Coffein, Merck KGA, Darmstadt, GER

Essigsäureethylester, Merck KGA, Darmstadt, GER

Ethanol, Merck KGA, Darmstadt, GER

β -Glucosidase aus Mandeln (> 6 U/mg), Fluka, Buchs, SUI

Hefeextrakt „*Gistex XII LS Pulver AGGL*“, DSM Food Specialties Savoury Ingredients, Delft, NED

1-Linoleoyl-*rac*-glycerol, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER

Maltodextrin, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER

D/L-Milchsäure, Fluka, Buchs, SUI

Methanol, Merck KGA, Darmstadt, GER

Methanol-*d*₄, Euriso-Top, Gif-sûr-Yvette, FRA

Natriumchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER

Natrium-*L*-glutamatmonohydrat, Merck KGA, Darmstadt, GER

1-Oleoyl-*rac*-glycerol, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER

2-Oleoyl-*rac*-glycerol, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER
1-Palmityl-*rac*-glycerol, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER
1-O-Palmityl-*rac*-glycerol, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER
n-Pentan, Merck KGA, Darmstadt, GER
Pyridin-*d*₅, Euriso-Top, Gif-sûr-Yvette, FRA
Quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranosid (Isoquercitin), Roth, Karlsruhe, GER
Saccharose, Merck KGA, Darmstadt, GER
(-)- α -Santonin, Fluka, Buchs, SUI
Sojalecithin „Emultop“ Degussa, Hamburg, GER
1-Stearoyl-*rac*-glycerol, Sigma-Aldrich, Steinheim, GER
Tannin (Gallussäure), Sigma-Aldrich, Steinheim, GER

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Amberlite® XAD-2®, Supelco, Bellefonte, PA, USA
Einwegspritzen Omnifix®-F (1 ml), B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen, GER
597½ S&S Faltenfilter Ø 185 mm, Schelicher & Schuell GmbH, Dasser, GER
Evian®-Mineralwasser, Danone, Wiesbaden, GER
SPE-Kartuschen „Strata C18-E“ 70 Å, 100 × 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, GER
Spritzenfilter Millex®-HA 0,45 µm, 25 mm, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA

4.2 Chicorée – Vorbereitung und Durchführung von Analysen

4.2.1 Gravimetrische Bestimmung des Trockenmasse- und des Wassergehaltes

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurden zwölf Chicorée-Salatköpfe und zehn Wurzeln eingesetzt. Das Material wurde mit einer Bürste unter fließendem Wasser gesäubert, anschließend gewogen, mit einem Messer in ca. daumengroße Stücke geschnitten, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einem Mixer pulverisiert und schließlich gefriergetrocknet. Der Wassergehalt (**Formel 2**) wurde gravimetrisch über die Verhältnisse der Rohmasse zur Trockenmasse (**Formel 1**) bestimmt. Die Gesamtgehalte wurden als arithmetische Mittelwerte (**Formel 3**) der Einzelbestimmungen, die Abweichungen als Standardabweichungen zum Mittelwert (**Formel 4**) angegeben.

Die zwölf diesbezüglich untersuchten Chicorée-Salatköpfe hatten ein Gewicht zwischen 246,1 g und 372,6 g. Ihr Wassergehalt lag bei $94,3 \pm 0,3$ g/100 g, was einem Gehalt an Trockenmasse (TM) von $5,7 \pm 0,3$ g/100 g entspricht.

4.2.2 Sequenzielle Extraktion und sensorische Bewertung der Extrakte

4.2.2.1 Durchführung der Extraktionen

Chicorée-Salat und -Wurzeln (jeweils 100 g TM) wurden separat mit Methanol (200 ml) versetzt und im Ultraschallbad über einen Zeitraum von 20 min extrahiert. Durch Filtration über einen Papierfilter wurden Extrakt und Extraktionsrückstand separiert. Der Extraktionsprozess mit Methanol wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine dreifache Extraktion des unlöslichen Rückstandes mittels einer 70/30-(V/V)-Methanol/Wasser-Mischung (jeweils 200 ml). Die Methanol- und Methanol/Wasser-Extrakte wurden vereinigt und durch Vakuumdestillation vom Methanol befreit; der wässrige Rückstand wurde mit Ethylacetat (200 ml; EtAc) versetzt. Durch Ausschütteln im Scheidetrichter resultierten zwei Phasen: die obere organische Ethylacetat- und die untere Wasserphase. Beide wurden getrennt, wobei die wässrige Phase zwei weiteren Extraktionen mit EtAc (jeweils 200 ml) unterzogen wurde. Die

EtAc- und die Wasserfraktion wurden durch Vakuumdestillation von organischen Lösungsmitteln und durch eine anschließende Gefriertrocknung von Wasser befreit. Letztendlich lagen drei Fraktionen vor: Der unlösliche Rückstand (A), die EtAc-Fraktion (B) sowie die Wasserfraktion (C).

4.2.2.2 Sensorische Bewertung der Chicorée-Fraktionen (A, B und C)

Die EtAc-Fraktion B (80 mg) sowie die Wasserfraktion (3,5 g) wurden entsprechend ihrer Extraktionsausbeuten – unter Berücksichtigung eines durchschnittlichen Wassergehaltes von 95 % – in ihren natürlich vorkommenden Verhältnissen in jeweils 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Um auch die lipophilen Substanzen vollständig in Lösung zu bringen, wurde zunächst Ethanol (5,0 ml) zugegeben; im Anschluss wurden die Fraktionen durch Zugabe von *Evian*[®]-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 1,0 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) auf ein Gesamtgewicht von jeweils 100 g eingestellt. Es erfolgte die Evaluierung der Intensitäten der Bitterkeit durch ein Sensorikpanel.

Der unlösliche Rückstand wurde dem Panel als Trockenmasse angeboten und verkostet.

Als Referenzlösungen dienten *Evian*[®]-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 1,0 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) mit einer definierten Bitterintensität von 0,0 sowie eine aus *Evian*[®]-Sensorikwasser (pH 6,5) hergestellte, wässrige Coffeinlösung (1,0 g/l) mit einer definierten Bitterintensität von 5,0.

4.2.3 Untersuchung der Chicorée-Fraktionen mittels RP-HPLC-DAD

4.2.3.1 HPLC-System:

Pumpe:	L-7100 Merck Hitachi (Darmstadt, GER)
Degaser:	L-7612 Merck Hitachi (Darmstadt, GER)
Probengeber:	L-7200 Merck Hitachi (Darmstadt, GER)
UV/VIS-Detektor:	L-7450 Merck Hitachi (Darmstadt, GER)
Interface:	D-7000 Merck Hitachi (Darmstadt, GER)

Software: HPLC-System Manager Version 4.1 Merck Hitachi
(Darmstadt, GER)

4.2.3.2 RP-HPLC-DAD-Analyse der EtAc-Fraktion B

Probenvorbereitung: Die EtAc-Fraktion B (100 mg) wurde in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, durch Zugabe von Ethanol (5,0 ml) vollständig in Lösung gebracht und mit bidestilliertem Wasser auf das Kolbenendvolumen ergänzt.

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase: Microsorb C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, (Varian, Darmstadt/GER)

Injektionsvolumen: 60 µl

Fluss: 0,8 ml/min

Mobile Phase: A: Wasser pH 5,5
(eingestellt mit 1,0 % wässriger HCOOH-Lösung)
B: Acetonitril

Gradient: 0 min: 90 % A (10 % B) → 35 min: 75 % A (25 % B) →
60 min: 30 % A (70 % B) → 65 min: 30 % A (70 % B) →
75 min: 90 % A (10 % B) → 85 min: 90 % A (10 % B)

UV/VIS-Detektion: $\lambda = 200-700 \text{ nm}$

4.2.3.3 RP-HPLC-DAD-Analyse der Wasserfraktion C

Probenvorbereitung: Die Wasserfraktion C (5,0 g) wurde ebenfalls in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, durch Zugabe von bidestilliertem Wasser vollständig in Lösung gebracht und auf das Kolbenendvolumen ergänzt.

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase: Microsorb C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 µm, (Varian, Darmstadt, GER)

Injektionsvolumen: 100 µl

Fluss:	1,0 ml/min
Mobile Phase:	A: Wasser pH 5,5 (eingestellt mit 1,0 % wässriger HCOOH-Lösung)
	B: Acetonitril
Gradient:	0 min: 100 % A (0 % B) → 20 min: 100 % A (0 % B) → 50 min: 50 % A (50 % B) → 60 min: 0 % A (100 % B) → 70 min: 0 % A (100 % B) → 80 min: 100 % A (0 % B) → 90 min: 100 % A (0 % B)
UV/VIS-Detektion:	$\lambda = 200-700 \text{ nm}$

4.2.4 Isolierung der Inhaltsstoffe der Chicorée-Fractionen mittels HPLC

4.2.4.1 HPLC-System:

Pumpe:	2 × ProStar 210 Varian (Darmstadt, GER)
Probengeber:	Rheodyne, Probenschleife (V = 1.900 μl)
UV/VIS-Detektor:	ProStar 325 UV/VIS Varian (Darmstadt, GER)
Software:	LC Workstation 6.20 Varian (Darmstadt, GER)

4.2.4.2 Isolierung der Inhaltsstoffe der EtAc-Fraktion B mittels präparativer HPLC

Probenvorbereitung: Die Chicorée-EtAc-Fraktion (1,0 g) wurde in Methanol (75,0 ml) gelöst und mit Wasser auf das Endvolumen (100,0 ml) aufgefüllt, membranfiltriert und in das HPLC-System injiziert.

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase:	Microsorb 100-5 C18, 250 mm × 21,2 mm, 5 μm , Varian (Darmstadt, GER)
Injektionsvolumen:	1.900 μl
Fluss:	20,0 ml/min
Mobile Phase:	A: Wasser pH 5,5

(eingestellt mit 1,0 % wässriger HCOOH-Lösung)

B: Acetonitril

Gradient: 0 min: 90 % A (10 % B) → 35 min: 75 % A (25 % B) →
50 min: 30 % A (70 % B) → 55 min: 30 % A (70 % B) →
60 min: 90 % A (10 % B) → 65 min: 90 % A (10 % B)

UV/VIS-Detektion: $\lambda = 258 \text{ nm}$

Fraktionen: Nach Durchführung des Chromatographieverfahrens lagen insgesamt 15 Fraktionen vor, welche gemäß Elutionsreihenfolge mit B1 bis B15 benannt wurden.

4.2.4.3 Isolierung der Inhaltsstoffe der Wasserfraktion C mittels präparativer HPLC

Flash-Säulenvorbereitung: Eine wassergekühlte Glassäule (Höhe 50 cm; \varnothing 5 cm) wurde am unteren Ende mit Glaswolle verschlossen und mit Seesand ca. 2 cm hoch überschichtet. Etwa 200 g in 1,0 l Methanol gequollenes und mit 1,0 l Wasser gewaschenes XAD-2®-Stationärphasenmaterial wurde in die Glassäule eingeschlämmt, sodass diese zur Hälfte gefüllt war. Anschließend erfolgte ein weiteres Durchspülen des XAD-2®-Materials mit 2,0 l Wasser. Der flüssige Überstand oberhalb der Stationärphase betrug niemals weniger als 2 cm.

Herstellung der Flash-Analyselösung – Probenvorbereitung I: Die Chicorée-Wasserfraktion C (20,0 g) wurde in Wasser (100,0 ml) gelöst und membranfiltriert.

Durchführung der Flash-Säulenchromatographie: Die Analyselösung (10,0 ml) wurde auf die Säule gegeben und bei einer Flussrate von 5,0 ml/min durch einen Methanol/Wasser-Gradienten (MeOH/H₂O) eluiert: 0/100-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 10/90-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 20/80-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 30/70-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 40/60-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 50/50-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 60/40-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 70/30-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 80/20-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 90/10-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml) → 100/0-(V/V)-MeOH/H₂O (300 ml). Gemäß der Gradientenetappen wurden insgesamt elf 300-ml-Fraktionen gesammelt. – Nach Beendigung der Elution erfolgte ein Waschen der stationären Phase mit 2,0 Liter Wasser, wodurch die Startbedingungen für eine erneute Elution hergestellt wurden. Die Methanol/Wasser-Gradientenelution wurde weitere neun Male wiederholt. – Aus sämtlichen Fraktionen wurde das Methanol durch Va-

kuumdestillation via Einsatz eines Rotationsverdampfers entfernt. Nach anschließender Gefriertrocknung lagen alle elf erhaltenen Fraktionen, gemäß Methanol/Wasser-Anteilen (V/V) 0/100 (C1) bis 100/0 (C11) genannt, in ihren Trockenmassen vor.

Herstellung der HPLC-Analyselösung – Probenvorbereitung II: Die Fraktionen C5 (0,5 g) und C6 (0,5 g) wurden vereinigt, in Wasser (10,0 ml) gelöst, membranfiltriert und in das HPLC-System injiziert.

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase:	Microsorb 100-5 C18, 250 mm × 21,2 mm, 5 µm, Varian (Darmstadt, GER)
Injektionsvolumen:	1.900 µl
Fluss:	20,0 ml/min
Mobile Phase:	A: Wasser pH 5,5 (eingestellt mit 1,0 % wässriger HCOOH-Lösung) B: Acetonitril
Gradient:	0 min: 95 % A (5 % B) → 40 min: 75 % A (25 % B) → 45 min: 30 % A (70 % B) → 50 min: 30 % A (70 % B) → 55 min: 95 % A (5 % B) → 60 min: 95 % A (5 % B)
UV/VIS-Detektion:	$\lambda = 258 \text{ nm}$

Fraktionen: Nach Durchführung des Chromatographieverfahrens lagen insgesamt zwölf Fraktionen vor, welche gemäß Elutionsreihenfolge mit C5/6-1 bis C5/6-12 benannt wurden.

4.2.5 Enzymatische Konformationsbestimmung von β -Glucose

Durchführung: Die TM der Chicorée-Wasserfraktion C (1,0 g) wurde in Wasser (50 ml) gelöst. Eine Volumenmenge von jeweils 20 ml dieser Lösung wurde in zwei Zentrifugengläser mit Schraubdeckelverschlüssen pipettiert. Der erste Ansatz diente als „Blindwert“. Dem zweiten Ansatz wurden zusätzlich 5,0 mg des Enzyms β -Glucosidase zugefügt. Beide Ansätze rührten bei Lichtausschluss und einer Tem-

peratur von 40 °C über einen Zeitraum von fünf Stunden. Nach Filtration via Membranspritzenfilter wurden beide Ansätze mittels RP-HPLC-DAD (siehe 4.2.3.2) analysiert.

4.2.6 Geschmacksverdünnungsanalyse Chicorée-EtAc-Fraktion B

Aliquote der 15 Fraktionen B1 bis B15 (gewonnene Mengen aus insgesamt sechs präparativen HPLC-Läufen; siehe vorheriger Abschnitt) wurden jeweils mit Ethanol (0,2 ml) sowie mit *Evian*®-Sensorikwasser (20,0 ml, pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) versetzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Sensorikwasser verdünnt. Es resultierten jeweils zehn Lösungen mit Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVF) von 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512. Die sensorische Analyse erfolgte bei Benutzung einer Nasenklemme via Half-Mouth-Test in Analogie zu Scharbert et al. (2004).

Die Panelisten waren angewiesen, die Verdünnungsstufe zu markieren, an der zwischen der Probe und der Leerprobe ein geschmacklicher Unterschied wahrgenommen werden konnte. Die Verdünnungsstufe, ab der ein Unterschied zwischen der verdünnten EtAc-Fraktion und der Kontrollprobe („Blank“) festgestellt werden konnte, wurde als GVF definiert (Frank et al. 2001). Diese GVA wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von vier Stunden zweimal wiederholt. Die Einzelwerte der Panelisten, welche nicht mehr als um plus/minus eine Verdünnungsstufe differierten, wurden durch geometrische Mittelung zunächst zu einem „Panelisten-GVF“, im Anschluss auf gleiche Weise zu einem GVF zusammengefasst.

4.2.7 Geschmacksverdünnungsanalyse der Chicorée-Wasserfraktion C

Aliquote der zwölf Fraktionen C5/6-1 bis C5/6-12 (gewonnene Mengen aus insgesamt acht präparativen HPLC-Läufen) wurden jeweils mit *Evian*®-Sensorikwasser (20,0 ml, pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) versetzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Sensorikwasser verdünnt. Es entstanden jeweils zehn Lösungen mit Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVFs) von 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512. Die sensorische Analyse erfolgte bei Benutzung einer Nasenklemme via Half-Mouth-Test in Analogie zu Scharbert et al. (2004).

Die Panelisten waren angewiesen, die Verdünnungsstufe zu markieren, an der zwischen der Probe und der Leerprobe ein geschmacklicher Unterschied wahrgenommen werden konnte. Die Verdünnungsstufe, ab der ein Unterschied zwischen der verdünnten EtAc-Fraktion und der Kontrollprobe („Blank“) festgestellt werden konnte, wurde als GVF definiert (Frank et. al. 2001). Diese GVA wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von vier Stunden zweimal wiederholt. Die Einzelwerte der Panelisten, welche nicht mehr als um plus/minus eine Verdünnungsstufe differierten, wurden durch geometrische Mittelung (**Formel 5**) zunächst zu einem „Panelisten-GVF“, im Anschluss durch arithmetische Mittelung (**Formel 3**) zu einem GVF zusammengefasst.

4.2.8 Bestimmung der Bitterschwellenwerte und Beschreibung der Bittergeschmacksqualitäten

Die aus der EtAc-Fraktion B isolierten Verbindungen **1** (8,8 mg), **2** (6,2 mg) und **5** (3,3 mg), die aus der Wasserfraktion isolierte Verbindung **6** (4,7 mg) sowie die kommerziell erworbene Substanz **7** (14,0 mg) wurden jeweils mit Ethanol (0,25 ml) versetzt und mit *Evian*®-Sensorikwasser (25 ml; pH 6,5 – eingestellt mit 1,0 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) auf ein Endvolumen von 25,0 ml ergänzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Sensorikwasser verdünnt. Es lagen somit jeweils zehn Lösungen mit Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVFs) von 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512 vor. Von den Substanzen **3** (4,2 mg) und **4** (4,1 mg) wurden in gleicher Weise Lösungen hergestellt, wobei Verdünnungsfaktoren von 32 (**3**) und 64 (**4**) erreicht wurden. Die sensorische Analyse erfolgte bei Benutzung einer Nasenklemme via Half-Mouth-Test in Analogie zu Scharbert et al. (2004).

Die Panelisten waren angehalten, bei den Substanzen **1-6** die Erkennungsschwelle für Bitterkeit, bei **7** jene für Adstringenz bzw. jeweils die Verdünnungsstufen zu markieren, an der zwischen den Proben und den Leerproben ein eindeutiger Bittergeschmack bzw. Adstringenzeffekt wahrgenommen werden konnte. Die Verdünnungsstufe, ab der eine geschmackliche Bitterkeit bzw. Adstringenz in der verdünnten Analysesubstanz im Vergleich zur Kontrollprobe („Blank“) evaluiert werden konnte, wurde als Schwellenwert definiert. Diese Schwellenwertanalyse wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von vier Stunden zweimal wiederholt. Die Einzel-

werte der Panelisten, welche nicht mehr als um plus/minus eine Verdünnungsstufe differierten, wurden durch geometrische Mittelung (**Formel 5**) zunächst zu einem „Panelisten-Schwellenwert“, im Anschluss auf gleiche Weise zu einem Schwellenwert für Bitterkeit zusammengefasst.

Simultan zur Schwellenwertanalyse waren die Panelisten aufgefordert, die Geschmacksqualitäten durch deskriptive Attribute zu charakterisieren. Die Attribute wurden in einem Panelistengruppengespräch bewertet.

4.2.9 Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehungen

Sämtliche Lösungen und Verdünnungsschritte wurden durch Zugabe von *Evian*[®]-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 1,0 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) hergestellt. Alle sensorisch zu bewertenden Verbindungen sowie Referenzen wurden separat angesetzt und nacheinander in 1/1-(V/V)-Volumenschritten verdünnt.

Die Verdünnungsreihen der zu verkostenden Substanzen wurden jedem Panelisten zwecks vertikaler und horizontaler Evaluierung der relativen Bitterintensitäten im Vergleich zu einer Coffein-Referenzreihe präsentiert. Als Referenz diente eine Coffein-Verdünnungsreihe. Dazu wurde eine Coffein-Lösung (1,243 mg/100 ml), welche einem DoT-Faktor von 128 entsprach, jeweils in einem 1/1-(V/V)-Verhältnis verdünnt, woraus insgesamt zehn Lösungen resultierten, welche DoT-Faktoren von 128 (3,7), 64 (3,3), 32 (3,0), 16 (2,7), 8 (2,0), 4 (1,0), 2 (0,5), 1 (0,1), 0,5 (0,0) und 0,25 (0,0) aufwiesen. Die in den Klammern angegebenen Werte stellen die relativen Intensitäten der Bitterkeit dar, welche durch ein Panel vorab bestimmt und in der laufenden sensorischen Analyse als definierte Standardwerte vorgegeben worden sind. Der Wert 0 stand für keinerlei Bitterkeit, 5 für eine sehr starke Bitterintensität. Die Durchführung der Evaluierung erfolgte durch Anwendung der Half-Mouth-Methode.

4.2.9.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehungen von Sesquiterpenlactonen

11β,13-Dihydrolactucin (8,8 mg) (**1**), *Lactucin* (6,2 mg) (**2**), *8-Desoxylactucin* (4,2 mg) (**3**), *11β,13-Dihydro-8-desoxylactucin* (4,1 mg) (**4**) und *Lactucopicrin* (3,3 mg) (**5**) wurden jeweils in 25-ml-Messkolben eingewogen, mit Ethanol (0,1 ml) in Lösung gebracht und mit *Evian*[®]-Sensorikwasser auf das Endvolumen ergänzt. Für die Ver-

dünnungsreihen der Substanzen **1**, **2** und **5** resultierten zehn DoT-Konzentrationsstufen von 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0,25; bei Verbindung **3** lagen acht DoT-Konzentrationen von 32 bis 0,25 vor und für **4** ergaben sich neun DoT-Konzentrationen von 64 bis 0,25.

4.2.9.2 Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Dihydrolactucin und Cichoriosid B

11 β ,13-Dihydrolactucin (4,4 mg) (**1**) wurde in einen 25-ml-Messkolben, *Cichoriosid B* (4,7 mg) (**6**) in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, jeweils mit Ethanol (0,1 ml) versetzt und mit *Evian*[®]-Sensorikwasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Aus der **1**-Lösung wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, welche den DoT-Faktoren 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0,25 entsprach. Acht Verdünnungsstufen mit DoT-Faktoren von 32 bis 0,25 ergaben die Verdünnungsreihe, welche aus der **6**-Lösung erstellt wurde.

4.2.10 Quantifizierung identifizierter Sesquiterpenlactone im Chicorée mittels HPLC-UV/VIS

Prinzip: Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibration, wobei aus Chicorée-Wurzeln präparativ isoliertes Lactucin (**2**) und Lactucopicrin (**5**) als Referenzsubstanzen dienten. – Alle erhaltenen Ergebnisse stellen arithmetische Mittelwerte dar (**Formel 3**), welche auf einer Dreifachbestimmung basieren und deren Abweichungen durch die jeweilige Angabe der *Standardabweichung zum Mittelwert* (**Formel 4**) charakterisiert sind.

Kalibration: Als externe Standardlösungen (**ES**) wurden **2** (4,5 mg) und **5** (7,0 mg) separat in 25-ml-Messkolben eingewogen, mit Methanol (2,5 ml) in Lösung gebracht und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Sämtliche Wiege- und Verdünnungsprozessschritte erfolgten unter einem maximal möglichen Lichtausschluss. Von beiden Standardlösungen (100 %) wurden Konzentrationsreihen mit folgenden sieben weiteren Verdünnungen hergestellt: 80 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % und 1 % (V/V). Nach RP-HPLC-DAD-Analyse (vgl. 4.2.3.2) erfolgte bei einer Wellenlänge von 258 nm die Bestimmung der Peakflächeninhalte der **ES**-Peaks **2** und **5** durch manuelle Integration. Die Auftragung der Peakflächeninhalte (Ordinate) gegen die

adäquaten Konzentrationen (Abszisse) und die anschließende lineare Regression der jeweiligen zusammengehörigen Diagrammdatenpunkte führten zu den Kalibriergeraden von **ES-2** und **ES-5**.

Durchführung: Chicorée-(Salat/Wurzel)-TM-Proben (1,0 g) wurden eingewogen, bei 15minütiger Behandlung im Ultraschallbad zuerst mit Methanol (8,0 ml), der unlösliche Rückstand im Anschluss mit einer 70/30-(V/V)-Methanol/Wasser-Mischung (8,0 ml) extrahiert; der letzte Extraktionsschritt wurde wiederholt. Die Extrakte wurden in einem 25-ml-Messkolben vereint und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Nach Filtration mittels Membranfilterspritze erfolgte die Analyse via RP-HPLC-DAD (siehe 4.2.3.2), die Bestimmung der Peakflächeninhalte von **1**, **2**, **3**, **4** und **5** erfolgte durch manuelle Integration. – Sämtliche Wiege-, Homogenisierungs-, Extraktions- und Filtrationsprozessschritte erfolgten unter einem maximal möglichen Lichtausschluss.

Auswertung: Die Berechnung der Konzentrationen von **1**, **2**, **3** und **4** in den Analysenproben (TM) erfolgte über die Kalibriergerade von **ES-2**. Die Konzentration von **5** wurde über die **ES-5**-Kalibriergerade berechnet. Unter Einbeziehung des durchschnittlichen Wassergehaltes von 94,3 % im Frischgewicht wurden die Konzentrationen der bitteren Sesquiterpenlactone in frischen Chicorée-Salatköpfen ermittelt.

4.2.11 Quantifizierung von Cichoriosid B

Prinzip: Die Quantifizierung erfolgte durch RP-HPLC-DAD-Analyse (siehe 4.2.3.3) mittels externer Kalibration, wobei aus Chicorée-Wurzeln präparativ Cichoriosid B (**6**) als Referenzsubstanz diente. – Das Gesamtergebnis stellt einen arithmetischen Mittelwert (**Formel 3**) dar, welcher auf einer Dreifachbestimmung basiert und dessen Abweichung durch die Angabe der *Standardabweichung zum Mittelwert* (**Formel 4**) charakterisiert ist.

Kalibration: Als externe Standardlösung (**ES**) wurde **6** (9,89 mg) in einen 5-ml-Messkolben eingewogen und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Sämtliche Wiege- und Verdünnungsschritte erfolgten wiederum unter einem maximal möglichen Lichtausschluss. Von der Standardlösung (100 %; 1978 mg/l) wurde eine Konzentrationsreihe mit 1:1-Verdünnungen (V/V) hergestellt, woraus folgende acht weitere Lösungen mit folgenden Konzentrationen resultierten: 50 % (989 mg/l), 25 %

(494,5 mg/l), 12,5 % (247,25 mg/l), 6,25 % (123,63 mg/l), 3,13 % (61,81 mg/l), 1,56 % (30,91 mg/l), 0,78 % (15,45 mg/l) und 0,39 % (7,73 mg/l). Nach RP-HPLC-DAD-Analyse (siehe 4.2.3.3) erfolgte bei einer Wellenlänge von 258 nm die Bestimmung der Peakflächeninhalte der ES-Peaks **6** durch manuelle Integration. Die Auftragung der Peakflächeninhalte (Ordinate) gegen die adäquaten Konzentrationen (Abszisse) und die anschließende lineare Regression der jeweiligen zusammengehörigen Diagrammdatenpunkte führten zu den Kalibriergeraden von **ES-6**.

Flash-Säulenvorbereitung: Eine wassergekühlte Glassäule (Höhe 50 cm; Ø 5 cm) wurde am unteren Ende mit Glaswolle verschlossen und mit Seesand circa 2 cm hoch überschichtet. Etwa 200 g in Methanol (1,0 l) gequollenes und mit Wasser (1,0 l) gewaschenes XAD-2®-Stationärphasenmaterial wurden in die Glassäule eingeschlämmt, sodass diese zur Hälfte gefüllt war. Anschließend erfolgte ein weiteres Durchspülen des XAD-2®-Materials mit Wasser (2,0 l). Der flüssige Überstand oberhalb der Stationärphase betrug niemals weniger als 2 cm.

Probenvorbereitung: Die Chicorée-(Salat/Wurzel)-TM-Proben (1,0 g) wurden eingewogen und bei 15minütiger Behandlung im Ultraschallbad mit Methanol (200 ml) extrahiert. Die Extraktion des unlöslichen Rückstandes wurde zweimal mit Methanol (jeweils 200 ml) und dreimal mit einer 70/30-(V/V)-Methanol/Wasser-Mischung (jeweils 200 ml) wiederholt. Die Extrakte wurden durch Filtration über einen Papierfaltenfilter vom Rückstand isoliert, durch Vakuumdestillation vom Lösungsmittel befreit, gefriergetrocknet, in Methanol (10 ml) gelöst und auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt (Probenlösung).

Flash-Säulenchromatographie – Herstellung der Analysenlösungen: Die Analysenlösung (10,0 ml) wurde auf die Säule gegeben und bei einer Flussrate von 5,0 ml/min durch einen zweistufigen Methanol-Wasser-Gradienten (MeOH/H₂O) eluiert: 0/100-(V/V)-MeOH/H₂O (1000 ml) → 100/0-(V/V)-MeOH/H₂O (1000 ml). Gemäß der Gradientenetappen wurden insgesamt zwei 1000-ml-Fractionen gesammelt. – Nach Beendigung der Elution erfolgte ein Waschen der stationären Phase mit Wasser (2,0 l), wodurch die Startbedingungen für eine erneute Elution hergestellt wurden. Die Methanol/Wasser-Gradientenelution wurde ein weiteres Mal durchgeführt. – Das wässrige Eluat wurde verworfen, die Methanoleluatfraktion wurde durch Vakuumdestillation bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in Wasser (2,5 ml) gelöst und in einen

Messkolben auf ein Endvolumen von 5,0 ml aufgefüllt. Es erfolgte die Untersuchung der Analysenlösung via RP-HPLC-DAD (siehe 4.2.3.3).

Auswertung: Die Berechnung der Konzentrationen von **6** in den Analysenproben (TM) erfolgte über die Kalibriergerade von **ES-6** (vgl. 4.2.10). Unter Einbeziehung des durchschnittlichen Wassergehaltes von 94,3 % im Frischgewicht wurden die Konzentrationen des bitteren Sesquiterpenlactonglycosids in frischen Chicorée-Salatköpfen ermittelt.

4.2.12 Quantifizierung identifizierter Sesquiterpenlactone in verschiedenen Regionen im Chicorée-Salatkopf

Prinzip / Kalibration: Siehe 4.2.10 *Quantifizierung identifizierter Sesquiterpenlactone im Chicorée mittels HPLC-UV/VIS*.

Durchführung: Zehn frische Chicorée-Salatköpfe wurden manuell in gelbe Blattspitzen (A), in äußere weiße Blattstücke (B) und in innere Strunkanteile (C) separiert. Diese drei Salatkopfpportionen wurden jeweils mit einem Küchenmesser in kleine Stücke geschnitten, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einer Messermühle pulverisiert und anschließend gefriergetrocknet. – Der Wassergehalt wurde gravimetrisch über die Verhältnisse der Rohmasse zur Trockenmasse bestimmt. Die Gesamtgehalte wurden als arithmetische Mittelwerte der Einzelbestimmungen, die Abweichungen als Standardabweichungen zum Mittelwert angegeben. – TM-Proben (1,0 g) von A, B und C wurden jeweils eingewogen, bei 15minütiger Behandlung im Ultraschallbad zuerst mit Methanol (8,0 ml), der unlösliche Rückstand hingegen im Anschluss mit einer 70/30-(V/V)-Methanol/Wasser-Mischung (8,0 ml) extrahiert; der letzte Extraktionsschritt wurde wiederholt. Die Extrakte wurden in einem 25-ml-Messkolben vereint und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Nach Filtration mittels Membranfilterspritze erfolgte die Analyse via RP-HPLC-DAD (siehe 4.2.3.2), die Bestimmung der Peakflächeninhalte von **1**, **2**, **3**, **4** und **5** erfolgte durch manuelle Integration. – Sämtliche Wiege-, Homogenisierungs-, Extraktions- und Filtrationsprozessschritte erfolgten unter einem maximal möglichen Lichtausschluss.

Auswertung: Siehe 4.2.10 *Quantifizierung identifizierter Sesquiterpenlactone im Chicorée mittels HPLC-UV/VIS*.

4.2.13 Untersuchung von Korbblütlern auf Chicorée-Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe via RP-HPLC-MS/MS-Multimethode

Prinzip: Die Trockenmassen der Chicorée-(Salat/Wurzel)-, Radicchio-Rosso-, Zuckerhut-, Grüne-Löwenzahn-, Gebleichte-Löwenzahn-, Spanische- und Sardinische-Artischocken-Proben wurden mit Santonin (**IS**) versetzt, extrahiert und nach Membranfiltration direkt für die HPLC-Analyse mit DAD-Detektion eingesetzt.

Tuning: Für die Analyten **1**, **2**, **3**, **4** und **5** sowie den internen Standard (**IS**) wurden die Ionisierungsparameter (DP, CE, CXP) unter Nutzung des Tools „*Quantitative Optimization*“ (Software Analyst 1.4.1) optimiert (**Tabelle 15**). Das Massenspektrometer wurde im positiven Modus (ESI+) betrieben, IS- und Analytenstandardlösungen wurden über eine Spritzenpumpe (10 µl/min) gefördert.

Kalibration: **1** (3,93 mg), **2** (0,29 mg), **3** (0,34 mg), **4** (0,17 mg) und **5** (7,22 mg) wurden in einen 50-ml-Messkolben eingewogen, in einer 10/90-(V/V)-Acetonitril/H₂O-Mischung gelöst und auf das Endvolumen aufgefüllt. Dieser Standard-Mix (100 %) wurde auf die Konzentrationen (V/V) von 50 %, 20 %, 10 %, 5 % und 2,5 % mit 10/90-(V/V)-Acetonitril/H₂O verdünnt. Von diesen insgesamt sechs vorliegenden Kalibrierlösungen wurden jeweils 9,9 ml in einen 10-ml-Messkolben pipettiert, mit jeweils 100 µl Santonin-**IS**-Lösung (20,65 mg/l Santonin in 10/90-(V/V)-Acetonitril/H₂O) versetzt und in das RP-HPLC-MS/MS-System injiziert. Nach Bestimmung der Peakflächeninhalte durch manuelle Integration erfolgte die Berechnung der Responsefaktoren für die Analyten **1**, **2**, **3**, **4** und **5** nach **Formel 6**.

Probenvorbereitung – Herstellung der Analysenlösungen: Chicorée-(Salat/Wurzel)-, Radicchio-Rosso-, Zuckerhut-, Grüne-Löwenzahn-, Gebleichte-Löwenzahn-, Spanische- und Sardinische-Artischocken-TM-Proben (250 mg) wurden jeweils in 10-ml-Messkolben eingewogen, mit 100 µl Santonin-**IS**-Lösung (20,65 mg/l 10/90-(V/V)-Acetonitril/H₂O) versetzt und mit 10/90-(V/V)-Acetonitril/H₂O auf das Endvolumen aufgefüllt. Nach 15minütiger Homogenisierung im Ultraschallbad sowie einer Membranfiltration erfolgte die RP-HPLC-MS/MS-Analyse.

HPLC-System:

Pumpe:	Agilent 1100 (Waldbronn, GER)
Degaser:	Agilent 1100 (Waldbronn, GER)
Probengeber:	Agilent 1200 Autosampler (Waldbronn, GER)

MS-Detektor:	API 4000 QTRAP LC-MS/MS System (AB Sciex Instruments, Darmstadt, GER)
Software:	Sciex Software Analyst 1.4.1 (AB Sciex Instruments, Darmstadt, GER)
Dwell Time:	80 ms
Curtain Gas:	35 psi
Nebulizer Gas:	45 psi
Heater Temperatur:	350 °C
Ion Spray Voltage:	5500 V
Quadrupole Resolution:	Unit
Collision Gas:	N ₂

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase:	ZORBAX Eclipse XDB-C18, 5 µm, 150 mm × 2,1 mm (Agilent Waldbronn, GER)
Injektionsvolumen:	10 µl
Fluss:	0,2 ml/min
Mobile Phase:	A: Ameisensäure (0,1 % in Wasser; V/V) B: Acetonitril
Gradient:	0 min: 90 % A (10 % B) → 3 min: 90 % A (10 % B) → 35 min: 75 % A (25 % B) → 50 min: 30 % A (70 % B) → 55 min: 30 % A (70 % B) → 65 min: 90 % A (10 % B) → 75 min: 90 % A (10 % B)
Ionisierung:	ESI
DP, CXP, CE:	für jeden Analyten individuell bestimmt; vgl. Tabelle 15
Detektionsmodus:	MRM positiv

Tabelle 15: Technische Parameter zur massenspektrometrischen Analyse und Retentionszeiten der Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe 11 β ,13-Dihydrolactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) in Korbblütlern (Frischgewicht)

Identifizierte Sesquiterpenlactone	M [g/mol]	m/z ^a	DP	CE	CXP	RT [min]
11 β ,13-Dihydrolactucin (1)	278	279 → 91	+61	+61	+18	23,58
Lactucin (2)	276	277 → 91	+61	+55	+6	27,37
8-Desoxylactucin (3)	260	261 → 77	+66	+75	+4	44,16
11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4)	262	263 → 77	+66	+93	+4	44,99
Lactucopicrin (5)	410	411 → 259	+71	+15	+14	50,47
Santonin (IS)	246	247 → 173	+86	+19	+10	51,02

^a Massenübergang des Analytmoleküls während der quantitativen Analyse.

Wiederfindung: Die Chicorée-TM (100 mg) wurde mit definierten Mengen von **1-5** (1,0-10,0 mg/100 ml ACN) dotiert. Nach Equilibrieren (20 min) erfolgten die Extraktionsprozedur sowie die HPLC-MS/MS-Analyse gemäß „Probenvorbereitung“ und „Kalibration“ dieses Kapitels. Die durchschnittliche Wiederfindung (n=5) der einzelnen Verbindungen betrug 95,8 % (\pm 2,4 %).

Auswertung: Die Quantifizierung der Verbindungen **1-5** erfolgte über deren Peakflächenverhältnisse zu denen des internen Standards. Unter Berücksichtigung der analytischen Responsefaktoren (0,72-0,89) wurden die Gehalte der Analyten berechnet (**Formel 7**).

4.3 Avocado – Vorbereitung und Durchführung von Analysen

4.3.1 Herstellung von Avocadopüree

Das Fruchtfleisch (Pulpe) von genussreifen *Hass*-Avocados mit einem Gewicht von 380 bis 400 Gramm wurde manuell von Schale und Samen separiert und in einer Messermühle (3.500 U/min, 30 s; *Grindomix 200*, Retsch GmbH, Haan, GER) püriert.

4.3.2 Geschmacksprofilanalyse nativer und erhitzter Avocados

Das Püree aus *Hass*-Avocados wurde auf zwei 200-ml-Kristallisierschalen verteilt. Eine Kristallisierschale wurde mit Aluminiumfolie verschlossen, 30 min bei 105 °C im Trockenschrank erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Aliquote (2,5 g) nativer und erhitzter Pulpe wurden auf Plastiklöffeln eingewogen und nacheinander einem geschulten Panel (zwölf Personen) zur sensorischen Analyse präsentiert. Das Panel musste dabei die Intensitäten der neun Deskriptoren „Adstringenz“, „Bitterkeit“, „Cremigkeit“, „Mundfülle“ („Kokumi“), „Salzigkeit“, „Säuerlichkeit“, „Schärfe“, „Süße“ und „Umami“ auf einer linearen Skala von 0,0 (kein Geschmack) bis 5,0 (sehr starker Geschmack) evaluieren. Aus den individuellen Intensitätswerten der einzelnen Panelisten wurde für jeden Deskriptor das geometrische Mittel (**Formel 5**) berechnet, welches das Geschmacksprofil beschreibt. Die Intensitätswerte zwischen den einzelnen Panelisten sowie zwischen den zwei voneinander unabhängig durchgeführten Wiederholungen der Profilsensoriken differierten nicht um Werte, die mehr als $\pm 0,8$ betragen.

4.3.3 Gravimetrische Bestimmung des Trockenmasse- und des Wassergehaltes

Die Bestimmung des Gehaltes an Trockenmasse bzw. des Wassergehaltes erfolgte gravimetrisch via Doppelbestimmung: Püree (6-14 g) wurde in 200-ml-Kristallisierschalen eingewogen, bei einer Temperatur von -20 °C tiefgefroren und mittels Gefriertrocknung vom Wasser befreit; durch Wiegen des trockenen Rückstandes wurde die Auswaage ermittelt. Aus dem Verhältnis von Einwaage zur Auswaage

wurde der Trockenmassegehalt (**Formel 1**) und daraus wiederum der Wassergehalt berechnet (**Formel 2**). Die Gesamtgehalte wurden als arithmetische Mittelwerte der Einzelbestimmungen, die Abweichungen als Standardabweichungen zum Mittelwert angegeben.

4.3.4 Evaluation der Bitterkeit in Abhängigkeit von der Temperatur und der Erhitzungsdauer

Avocadopüree (100 g) wurde jeweils in insgesamt zwölf 200-ml-Kristallisierschalen gefüllt, welche anschließend mit Aluminiumfolie abgedeckt wurden. In einem Trockenschrank wurden jeweils vier Proben bei Temperaturen von 80, 100 und 120 °C über eine Zeitspanne von 0, 30, 60 und 120 min erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und dessen relative Bitterkeit durch ein elfköpfiges Sensorikpanel evaluiert. Die sensorische Analyse erfolgte in drei Stufen: Als Erstes erfolgte die Bewertung der bei 80 °C erhitzten Proben. Nach einer Pause von 60 min wurde an zweiter Stelle die Bewertung der bei 100 °C erhitzten Proben durchgeführt. Nach weiteren 60 min Pause erfolgte in der dritten Stufe die sensorische Bewertung der Bitterkeit der bei 120 °C erhitzten Proben.

Die Proben mit einer Erhitzungsdauer von 0 min – nicht erhitzte, native Avocadopüreeproben – dienten mit einer definierten relativen Bitterkeit von 0,8 als Referenzproben. Die Evaluierung der relativen Bitterintensitäten erfolgte im Vergleich zur vorgegebenen Referenzprobe auf einer Skala von 0,0 für nicht wahrnehmbar bis 5,0 für sehr stark wahrnehmbar.

4.3.5 Sequenzielle Extraktion und sensorische Bewertung der Extrakte

4.3.5.1 Durchführung der Extraktionen

Die Avocadopüreetrockenmasse (400 g) – nativ sowie vor der Trocknung für eine Dauer von 120 min bei einer Temperatur von 120 °C erhitzt – wurde in einen 1.000-ml-Erlenmeyerkolben gegeben, mit Pentan (200 ml) versetzt, kräftig geschüttelt und 15 min im Ultraschallbad gelagert. Nach einer Papierfiltration wurde der Extraktionsprozess weitere vier Male wiederholt. Die vereinten Pentan-Extrakte wurden in einem

Scheidetrichter insgesamt dreimal mit einer 80/20-(V/V)-Ethanol/Wasser-Mischung (300 ml) extrahiert. Es erfolgte eine weitere Extraktion der Pentanphase einer 90/10-(V/V)-Ethanol/Wasser-Mischung (300 ml), welche ein weiteres Mal wiederholt wurde. Nachdem sämtliche organischen Lösungsmittel durch Vakuumverdampfung entfernt worden waren, wurden die Fraktionen gefriergetrocknet. Es resultierten aus dem nativen und dem erhitzten Püree jeweils drei Fraktionen: Der unlösliche Rückstand (A), die Ethanol/Wasser-Fraktion (B*) und die Pentanfraktion (C).

Die Trockenmassen (ca. 24 g) der Ethanol/Wasser-Fraktionen (B*) aus dem nativen sowie erhitzten Avocadopüree wurden im 250-ml-Rundkolben mit Acetonitril (ACN) versetzt und vollständig in Lösung gebracht. Nach einer 24-stündigen Lagerung bei -20 °C im Gefrierschrank war jeweils ein weißer, cremiger Niederschlag zu beobachten. Mittels Papierfiltration erfolgte die Abtrennung des Niederschlages von dem ACN-Extrakt. Im Anschluss wurden die Lösungsmittel via Vakuumverdampfung entfernt und gefriergetrocknet, sodass die ACN-Fraktionen (B) sowie die Triglycerid-Fraktionen vorlagen.

4.3.5.2 Sensorische Bewertung der aus nativer Avocadopulpe gewonnenen Fraktionen A, B und C

Entsprechend ihren Extraktionsausbeuten – bezogen auf die zu Extraktionsbeginn eingesetzte Menge Trockenmasse unter Berücksichtigung eines Wassergehaltes von durchschnittlich 78 % – wurden der unlösliche Rückstand A (11,2 g), die Ethanol/Wasser-Fraktion B (0,35 g) sowie die Pentanfraktion C (10,4 g) in ihren natürlich vorkommenden Verhältnissen jeweils in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Um auch die lipophilen Substanzen vollständig in Lösung zu bringen, wurde zunächst Ethanol (5,0 ml) zugegeben, im Anschluss wurden die Fraktionen durch Zugabe von *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) auf ein Gesamtgewicht von jeweils 100 g eingestellt. Es erfolgte die Evaluierung der Intensitäten der Bitterkeit durch ein Sensorikpanel.

Als Referenzlösungen dienten *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) mit einer definierten Bitterintensität von 0,0 sowie eine aus *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5) hergestellte, wässrige Coffeinlösung (1,0 g/l) mit einer vorgegebenen Bitterintensität von 5,0.

4.3.5.3 Sensorische Bewertung der aus erhitzter Avocadopulpe gewonnenen Fraktionen A, B und C

Die Pentanfraktion (10,2 g), die Ethanol/Wasser-Fraktion (1,5 g) sowie der unlösliche Rückstand (10,9 g) wurden entsprechend ihren Extraktionsausbeuten – bezogen auf die zu Extraktionsbeginn eingesetzte Menge Trockenmasse unter Berücksichtigung eines Wassergehaltes von durchschnittlich 78 % – in ihren natürlich vorkommenden Verhältnissen jeweils in 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen. Um auch die lipophilen Substanzen vollständig in Lösung zu bringen, wurde zunächst Ethanol (5,0 ml) zugegeben, im Anschluss wurden die Fraktionen durch Zugabe von *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) auf ein Gesamtgewicht von jeweils 100 g eingestellt. Es erfolgte die Evaluierung der Intensitäten der Bitterkeit durch ein Sensorikpanel.

Als Referenzlösungen dienten *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) mit einer definierten Bitterintensität von 0,0 sowie eine aus *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5) hergestellte, wässrige Coffeinlösung (1,0 g/l) mit einer vorgegebenen Bitterintensität von 5,0.

4.3.6 Untersuchung der aus erhitzter Avocadopulpe gewonnenen Fraktion B mittels RP-HPLC-UV/VIS-ELSD

Probenvorbereitung: Fraktion B (100 mg) aus erhitzter Avocadopulpe wurde in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, durch Zugabe von Ethanol (5,0 ml) vollständig in Lösung gebracht und mit bidestilliertem Wasser auf das Kolbenendvolumen ergänzt.

HPLC-System:

Pumpe:	PU-2086 Semi-preparative, JASCO, Groß-Umstadt, GER
Probengeber:	AS-2055, JASCO, Groß-Umstadt, GER
UV/VIS-Detektor:	UV-2075, JASCO, Groß-Umstadt, GER
ELSD-Detektor:	Sedex 85, SEDERE, Olivet, FRA

Software: JASCO *ChromPass Chromatography Data System*,
Version 1.8.6.1

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase: HyperClone 5 µm ODS(C18) 120 Å, 250 × 4,6 mm
(Phenomenex, Aschaffenburg, GER)

Injektionsvolumen: 20 µl

Fluss: 1,0 ml/min

Mobile Phase: A: Wasser pH 5,5
(eingestellt mit 1,0 % wässriger HCOOH-Lösung)

B: Acetonitril

Gradient: 0 min: 40 % A (60 % B) → 3 min: 40 % A (60 % B) →
60 min: 0 % A (100 % B) → 75 min: 0 % A (100 % B) →
85 min: 40 % A (60 % B) → 90 min: 40 % A (60 % B)

Detektion: UV/VIS: $\lambda = 220$ nm; ELSD: Gain 12 (40 °C)

4.3.7 Isolierung der Inhaltsstoffe der Fraktion B mittels präparativer HPLC

Probenvorbereitung: Um eine vollständige Abtrennung von Triglyceriden sicherzustellen, wurde die Fraktion B (1,0 g) aus erhitzter Avocadopulpe in ACN gelöst und auf eine mit ACN konditionierte SPE-Kartusche aufgegeben. Es erfolgte eine Elution mit ACN (150 ml). Der komplette Effluent wurde via Vakuumdestillation auf ein Volumen von ca. 30 ml eingeeengt, Aliquote (1,9 ml) wurden in das HPLC-System injiziert.

HPLC-System:

Pumpe: PU-2086 Semi-preparative, JASCO, Groß-Umstadt,
GER

Probengeber: AS-2055, JASCO, Groß-Umstadt, GER

UV/VIS-Detektor: UV-2075, JASCO, Groß-Umstadt, GER

ELSD-Detektor: Sedex 85, SEDERE, Alfortville Cedex, FRA

Software: JASCO *ChromPass Chromatography Data System*,
Version 1.8.6.1

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase: HyperClone 5 µm ODS(C18) 120 Å, 250 × 21,2 mm
(Phenomenex, Aschaffenburg, GER)

Injektionsvolumen: 1,9 ml

Fluss: 20,0 ml/min

Mobile Phase: A: Wasser pH 5,5
(eingestellt mit 1,0 % wässriger HCOOH-Lösung)

B: Acetonitril

Gradient: 0 min: 40 % A (60 % B) → 2,5 min: 40 % A (60 % B) →
60 min: 25 % A (75 % B) → 65,0 min: 0 % A (100 % B)
→ 70,0 min: 0 % A (100 % B) → 72,5 min: 40 % A
(60 % B) → 75,0 min: 40 % A (60 % B)

Detektion: UV/VIS: $\lambda = 220 \text{ nm}$
ELSD: Gain 5 (40 °C); Splitter: 1,0 ml/min

Fraktionen: Nach Durchführung des Chromatographieverfahrens lagen insgesamt 22 Fraktionen vor, welche gemäß Elutionsreihenfolge numerisch von B1 bis B22 benannt wurden.

4.3.8 Geschmacksverdünnungsanalysen der Fraktion B

4.3.8.1 Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) in Wasser

Die Fraktionen B1 bis B22 (gewonnene Mengen aus insgesamt zehn präparativen HPLC-Läufen; siehe 4.3.7) wurden jeweils mit Ethanol (1,0 ml) sowie mit *Evian*®-Sensorikwasser (20 ml; pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) versetzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Sensorikwasser verdünnt. Es wurde eine Verdünnungsreihe von jeweils zehn Verdünnungsstufen hergestellt, was einem Geschmacksverdünnungsfaktorbereich von 1 (erste Verdünnungsstufe) bis 512 (zehnte Stufe) entspricht. Die sensorische Bestimmung der Ge-

schmacksverdünnungsfaktoren (GVF) erfolgte via Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004).

Die Panelisten waren angewiesen, die Verdünnungsstufe zu markieren, an der zwischen der Probe und der Leerprobe ein geschmacklicher Unterschied wahrgenommen werden konnte. Diese GVA wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von vier Stunden zweimal wiederholt. Die Einzelwerte der Panelisten, welche nicht mehr als um plus/minus eine Verdünnungsstufe differierten, wurden durch geometrische Mittelung zunächst zu einem „Panelisten-GVF“, im Anschluss auf gleiche Weise zu einem GVF zusammengefasst.

4.3.8.2 Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) in Modellbrühe

Herstellung der Modellbrühe: Natrium-L-glutamatmonohydrat (1,9 g), Maltodextrin (6,375 g), Natriumchlorid (2,9 g) sowie Hefeextrakt (2,1 g) wurden in einen Messkolben (1 l) eingewogen, mit Wasser (900 ml) versetzt, mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser (V/V) auf pH 6,5 eingestellt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die Fraktionen B1 bis B22 (gewonnene Mengen aus insgesamt zehn präparativen HPLC-Läufen; siehe 4.3.7) wurden jeweils mit Ethanol (1,0 ml) sowie mit Modellbrühe (20 ml) versetzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Sensorikwasser verdünnt. Es resultierten jeweils zehn Lösungen mit Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVF) von 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512. Die sensorische Analyse erfolgte via Half-Mouth-Test in Analogie zu Scharbert et al. 2004.

Die Panelisten waren angehalten, die Verdünnungsstufe zu markieren, an der zwischen der Probe und der Leerprobe ein geschmacklicher Unterschied wahrgenommen werden konnte. Diese GVA wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von vier Stunden zweimal wiederholt. Die Einzelwerte der Panelisten, welche nicht mehr als um plus/minus eine Verdünnungsstufe differierten, wurden durch geometrische Mittelung (**Formel 5**) zunächst zu einem „Panelisten-GVF“, im Anschluss durch arithmetische Mittelung (**Formel 3**) zu einem GVF zusammengefasst.

4.3.9 Erhitzte Avocadopulpe – Schwellenwertbestimmungen der Inhaltsstoffe der Fraktion B sowie von Monoglyceriden und weiteren Derivaten

4.3.9.1 Bestimmung der Bitterschwellenwerte

Die aus der Fraktion B isolierten Verbindungen (**1-12**), die Monoglyceride (**13-15**) sowie Monoglyceridderivate (**16**) (10 mg) wurden jeweils eingewogen, mit Ethanol (1,0 ml) und *Evian*®-Sensorikwasser (20 ml; pH 6,5 – eingestellt mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) versetzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Sensorikwasser verdünnt. Es entstanden jeweils zehn Lösungen mit Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVF) von 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512. Die sensorische Analyse erfolgte wiederum via Half-Mouth-Test in Analogie zu Scharbert et al. (2004).

Die Panelisten waren angewiesen, die Verdünnungsstufe zu markieren, an der zwischen der Probe und der Leerprobe ein Bittergeschmack eindeutig wahrgenommen werden konnte. Diese Schwellenwertbestimmung wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von jeweils mindestens vier Stunden zweimal wiederholt. Die geometrischen Mittel (**Formel 5**) aus der letzten und der vorletzten erkannten Verdünnungsstufe wurden als individueller Panelisten-Schwellenwert berechnet. Die durchschnittlichen Panelistenwerte wurden im Anschluss jeweils arithmetisch zu einem paneldurchschnittlichen Schwellenwert zusammengefasst (**Formel 3**).

Die Schwellenwerte zwischen den auf Bitterkeit trainierten Panelisten sowie zwischen den jeweiligen Einzelbestimmungen wichen nicht mehr als um plus/minus eine Verdünnungsstufe ab. Somit repräsentiert beispielsweise der für die Verbindung 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (**1**) ermittelte Schwellenwert von 42,8 µmol/l einen Schwellenwertbereich von 21,4 bis 85,6 µmol/l.

4.3.9.2 Bestimmung der Kokumi-Schwellenwerte

Herstellung der Modellbrühe: Natrium-*L*-glutamatmonohydrat (1,9 g), Maltodextrin (6,375 g), Natriumchlorid (2,9 g) sowie Hefeextrakt (2,1 g) wurden in einen Messkolben (1,0 l) eingewogen, mit 900 ml Wasser versetzt, mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser (V/V) auf pH 6,5 eingestellt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die aus der Fraktion B erhitzter Avocadopulpe isolierten Verbindungen (**1-12**) (10 mg) wurden jeweils eingewogen, mit Ethanol (0,2 ml) und Modellbrühe (20 ml) versetzt und stufenweise im 1:1-Volumenverhältnis mit Modellbrühe verdünnt. Es resultierten jeweils zehn Lösungen mit Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVF) von 1 bis 512. Die sensorische Analyse erfolgte via Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004).

Die Panelisten waren aufgefordert, die Verdünnungsstufe zu markieren, an der zwischen der Probe und der Leerprobe ein Kokumi-Enhancing-Effekt eindeutig wahrgenommen werden konnte. Diese Schwellenwertbestimmung wurde für jede Probe von jedem Panelisten im Abstand von jeweils mindestens vier Stunden zweimal wiederholt. Die geometrischen Mittel (**Formel 5**) aus der letzten und der vorletzten erkannten Verdünnungsstufe wurden als individueller Panelisten-Schwellenwert berechnet. Die Schwellenwerte zwischen den auf Kokumi-Geschmack trainierten Panelisten sowie zwischen den jeweiligen Einzelbestimmungen wichen nicht mehr als um plus/minus zwei Verdünnungsstufen ab. Die durchschnittlichen Panelistenwerte wurden im Anschluss jeweils arithmetisch zu einem paneldurchschnittlichen Schwellenwert zusammengefasst (**Formel 3**).

Die Schwellenwerte zwischen den auf Bitterkeit trainierten Panelisten sowie zwischen den jeweiligen Einzelbestimmungen wichen nicht mehr als um plus/minus zwei Verdünnungsstufen ab. Somit repräsentiert beispielsweise der für die Verbindung 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**) ermittelte Schwellenwert von 4,6 µmol/l einen Schwellenwertbereich von 1,15 bis 18,4 µmol/l.

4.3.10 Quantifizierung der identifizierten Inhaltsstoffe 1-12

Probenvorbereitung: Aliquote (jeweils 200 g) von frisch hergestelltem Avocadopüree wurden jeweils nach entsprechender Behandlung – nativ sowie über einen Zeitraum von 240 min bei 120 °C im Trockenschrank temperiert – mit einer methanolischen Lösung (1,1 mg/l) des internen Standards 1-O-Palmitylglycerin (**IS**) (10,10 mg/l) dotiert, durch manuelles Rühren homogenisiert und mit Pentan fünffach (jeweils 200 ml) extrahiert. Die Extraktionen erfolgten jeweils durch kräftiges Schütteln sowie durch eine 15minütige Behandlung im Ultraschallbad. Die vereinten Pentanextrakte wurden nach einer Papierfiltration einer dreifachen Ethanol/Wasser-80/20-(V/V)-Extraktion

(jeweils 200 ml), gefolgt von einer zweifachen Ethanol/Wasser-90/10-(V/V)-Extraktion (jeweils 200 ml), unterzogen. Nach Vereinigung der Ethanol/Wasser-Extrakte wurden durch Vakuumdestillation die Lösungsmittel vollständig entfernt und der ölige Rückstand in Acetonitril (100 ml) aufgenommen. Um eine vollständige Abtrennung von Triglyceriden sicherzustellen, wurde die Fraktion B (1,0 g) in ACN gelöst und auf eine mit ACN konditionierte SPE-Kartusche aufgegeben. Daraufhin erfolgte eine Elution mit ACN (100 ml). Der komplette Effluent wurde gesammelt, via Vakuumdestillation auf ein Volumen von 10 ml eingeeengt und Aliquote (10 µl) in das HPLC-System injiziert.

HPLC-System:

Pumpe:	Agilent 1100 (Waldbronn, GER)
Degaser:	Agilent 1100 (Waldbronn GER)
Probengeber:	Agilent 1200 Autosampler (Waldbronn, GER)
MS-Detektor:	API 4000 QTRAP LC-MS/MS System (AB Sciex Instruments, Darmstadt, GER)
Software:	Sciex Analyst Software (v1.4.2) (AB Sciex Instruments, Darmstadt, GER)
Dwell Time:	80 ms
Curtain Gas:	35 psi
Nebulizer Gas:	45 psi
Heater Temperatur:	350 °C
Ion Spray Voltage:	5500 V
Quadrupole Resolution:	Unit
Collision Gas:	N ₂

HPLC-methodenspezifische Parameter:

Stationäre Phase:	HyperClone 5 µm ODS(C18), 150 × 2,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, GER)
Injektionsvolumen:	10 µl
Fluss:	0,2 ml/min

Mobile Phase: A: Ameisensäure (0,1 % in Wasser; V/V)
 B: Acetonitril

Gradient: 0 min: 90 % A (10 % B) → 3 min: 90 % A (10 % B) →
 35 min: 75 % A (25 % B) → 50 min: 30 % A (70 % B) →
 55 min: 30 % A (70 % B) → 65 min: 90 % A (10 % B) →
 75 min: 90 % A (10 % B)

Ionisierung: APCI

DP, CXP, CE: für jeden Analyten individuell bestimmt; vgl. **Tabelle 16**

Detektionsmodus: MRM positiv

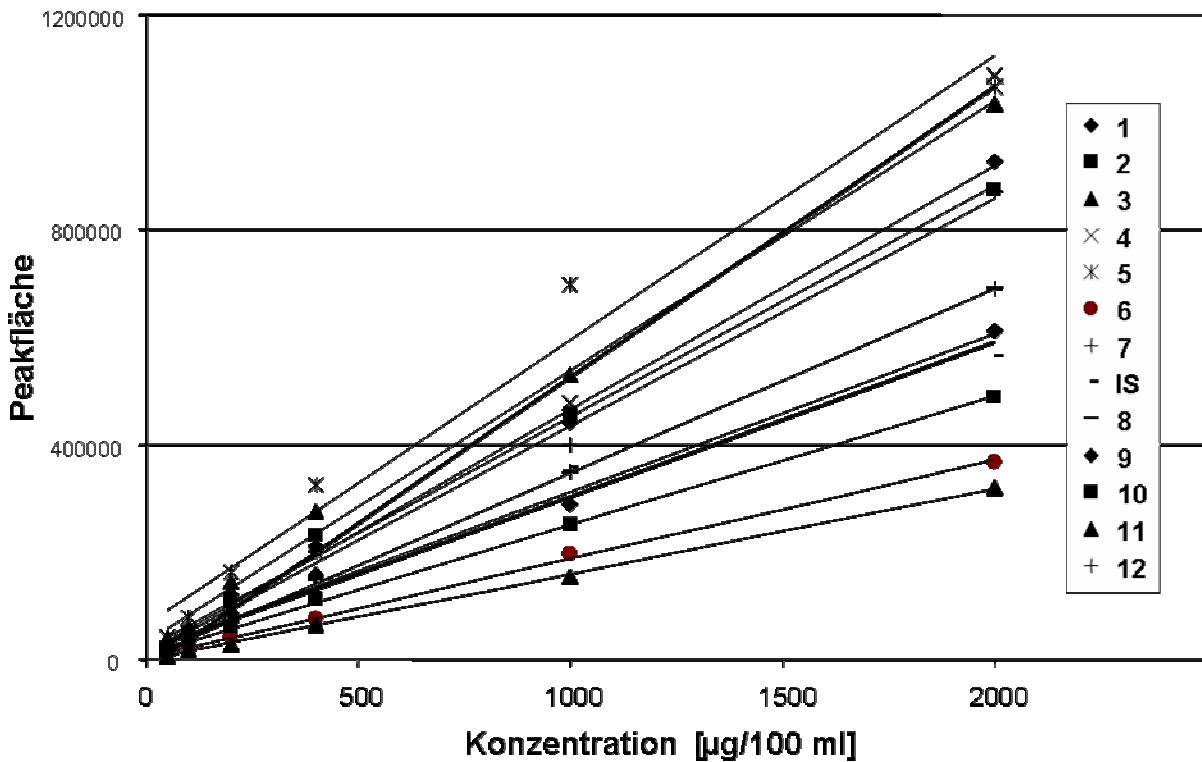


Abbildung 63: Lineare Regressionsgeraden der während der LC-MS/MS-Analysen gewonnenen Kalibrierungspunkte von 1-12 sowie IS.

Kalibration: Aus einer Stocklösung der Inhaltsstoffe (1-12) (jeweils 1,0 mg) in Acetonitril (50 ml) wurde eine Verdünnungsreihe der Konzentrationen 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 (V/V) mit ACN hergestellt. Im Anschluss erfolgte für jede Konzentrationsstufe die Zugabe einer methanolischen Lösung (1,1 mg/l) mit 1-O-Palmitylglycerin (IS) (10,10 mg/l). Nach der Endvolumeneinstellung wurden Aliquote (10 µl) in das HPLC-System injiziert. Mittels linearer Regression wurden die Linearitäten von 1-12 sowie

von **IS** im Peakflächen-Konzentrationsdiagramm (**Abbildung 63**) bestimmt und 0-2.000 µg/100 ml Analysenlösung als Arbeitsbereich definiert.

Tabelle 16: Detektierte Massenübergänge, MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der identifizierten Inhaltsstoffe der Fraktion B (1-12)

Analyten (1-12) und interne Standardverbindung (IS)	M [Da]	Detektierter Massenübergang	DP [eV]	CE [eV]	CXP [eV]	RT [min]
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1)	284	<i>m/z</i> 285 → 67	+31	+55	+4	4,6
1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2)	286	<i>m/z</i> 287 → 69	+31	+23	+6	4,9
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (3)	328	<i>m/z</i> 329 → 67	+36	+57	+4	7,9
1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4)	326	<i>m/z</i> 327 → 67	+41	+59	+4	8,1
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5)	326	<i>m/z</i> 327 → 67	+31	+59	+6	8,6
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6)	328	<i>m/z</i> 329 → 81	+46	+55	+6	18,6
1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7)	340	<i>m/z</i> 341 → 67	+36	+65	+4	21,0
(Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8)	378	<i>m/z</i> 379 → 301	+41	+13	+14	30,5
(Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9)	380	<i>m/z</i> 381 → 81	+36	+49	+6	34,7
(Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10)	380	<i>m/z</i> 381 → 303	+36	+13	+8	35,0
1-Linoleoylglycerol (11)	354	<i>m/z</i> 355 → 113	+41	+33	+8	37,8
1-Stearoylglycerol (12)	358	<i>m/z</i> 359 → 95	+31	+27	+8	40,6
1-O-Palmitylglycerin (IS)	316	<i>m/z</i> 317 → 57	+61	+43	+0	28,4

Wiederfindung: Frisch zubereitete Avocadopürees (100 mg) wurden mit definierten Mengen **1-12** in Form von ACN-Fraktion B (0,1-0,5 mg/10 ml ACN) dotiert. Nach Equilibrieren (20 min) erfolgten die Extraktionsprozedur sowie die HPLC-MS/MS-Analyse gemäß der Absätze „Probenvorbereitung“ und „Kalibration“ dieses Kapitels. Die durchschnittliche Wiederfindung (n=5) der einzelnen Verbindungen betrug 92,6 % ($\pm 5,2$ %).

Auswertung: Die Quantifizierung der Verbindungen **1-12** erfolgte über deren Peakflächenverhältnisse zu dem Verhältnis des internen Standards. Unter Berücksichtigung der analytspezifischen Responsefaktoren (0,6 bis 1,3) wurden die Gehalte der Analyten berechnet (**Formel 6** und **Formel 7**).

4.3.11 Durchführung des Experiments zur Rekonstruktion der Bitterkeit in frischem Avocadopüree

Drei Proben Avocadopüree (jeweils 50 g) wurden auf drei 250-ml-Bechergläser – genannt „I“, „II“ und „III“ – verteilt. Probe „II“ wurde mit ACN-Fraktion B (0,25 g) dotiert, Probe „III“ – mit Aluminiumfolie verschlossen – im Trockenschrank über einen Zeitraum von 180 min bei 120 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. – Die ACN-Fraktion B wurde aus einem adäquat behandelten Avocadopüree (120 °C/180 min) gewonnen.

Nach der manuellen Homogenisierung wurden die Proben „I“, „II“ und „III“ im Vergleich bezüglich der Bitterkeit durch ein Sensorikpanel evaluiert. Als Referenz diente die Probe „I“ mit einer gemäß Profilsensorik definierten Bitterintensität von 0,8.

4.4 Experimente der Kernresonanzspektroskopie (NMR) zur Strukturidentifizierung geschmacksaktiver Verbindungen

Die Daten wurden mit einem DPX-400- sowie mit einem DPX-500-MHz-Kernresonanzspektroskop (Bruker BioSpin, Rheinstetten, GER) bei 298 K aufgenommen. Die Proben befanden sich während der Messung in NMR-Messröhrchen (178×5 mm, Schott Professional, Schott AG, Mainz, GER). Als Lösungsmittel für die Proben dienten Chloroform-*d* (CDCl_3), Methanol-*d*₄ (CD_3OD) sowie Pyridin-*d*₅ ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$), welche jeweils 0,03 % Tetramethylsilan (TMS) (Euriso-Top, Giv-sur-Yvette, FRA) enthielten. Sämtliche Signale wurden auf das TMS-Signal referenziert. Die ^{13}C -NMR-Daten wurden aus HMBC und HMQC ermittelt. Zur Auswertung wurden die Software „MestreC“® in der Version 4.4.6.0 (Universität Santiago de Compostela, ESP) sowie die Software „XWIN-NMR“® in der Version 3.5 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, GER) eingesetzt.

4.4.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

Aus dem ^1H -Spektrum wurden die chemischen Verschiebungen δ in [ppm] sowie die Kopplungskonstanten J in [Hz] zwischen benachbarten Protonen ermittelt. Die chemischen Verschiebungen sind auf TMS-Signale bezogen. Die Aufnahme der Spektren unter ^1H -Breitbandentkopplung führte zu einer Unterdrückung der heteronuklearen J -Kopplungen bzw. zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses.

4.4.2 ^1H - ^1H -Verschiebungskorrelation (COSY)

Die ^1H , ^1H -Verschiebungskorrelation – „zweidimensionale homonuklear ^1H , ^1H -korrelierte NMR-Spektroskopie“ (Friebolin 2006) – beschreibt ein Experiment, bei dem durch zwei 90° -Pulse, ^1H , ^1H -korrelierte zweidimensionale (2D-)Spektren entstehen. In dem 2D-Spektrum entsprechen die Signale der Diagonalen dem eigentlichen ^1H -Spektrum. Symmetrisch angeordnete Signale zeigen dagegen die skalare Kopplung zwischen geminal und vizinal benachbarten Protonen.

4.4.3 Heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (HMQC)

Die HMQC-Spektroskopie – Heteronuclear Multiple Quantum Correlation – ist eine Methode, um ^1H - ^{13}C -Verschiebungskorrelationen über eine Bindung festzustellen. Es handelt sich hier um ein Entkopplungsexperiment, bei dem einzelne Protonen angeregt werden. Es wird die Erzeugung von Kohärenzen im Kanal der unempfindlichen ^{13}C -Kerne, die im Anschluss auf die empfindlichen ^1H -Kerne übertragen werden, ausgenutzt. Die eine Achse entspricht hierbei den ^1H -Signalen und die andere den ^{13}C -Signalen. Quartäre Kohlenstoffatome werden nicht angezeigt. Die Kreuzpeaks entsprechen dabei jeweils den aneinander gebundenen ^1H - und ^{13}C -Kernen.

4.4.4 Heteronucleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC)

Das HMBC-Experiment – Heteronuclear Multiple Bond Correlation – ist eine modifizierte Version des HMQC-Experiments. Es findet Anwendung zur Bestimmung von Kopplungen über mehrere Bindungen; vorwiegend zur Detektion von $^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$ und $^4J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen. Geminale Kopplungen werden dabei unterdrückt. Im Gegensatz zum HMQC-Experiment werden auch quartäre Kohlenstoffe detektiert, da diese über mehrere Bindungen ein Proton als Kopplungspartner haben können.

4.4.5 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT)

Das DEPT-Experiment basiert auf den Eigenschaften der hohen Polarisierung und den kurzen Relaxationszeiten von ^1H -Atomen. Durch einen abschließenden ^1H -Pulswinkel von 135° erhält man für Methyl- und Methinkohlenstoffe Signale mit positiver Intensität, für Methylenkohlenstoffe Signale mit negativer Intensität.

4.5 Verwendete mathematische Operationen – Formelverzeichnis

4.5.1 Berechnung des Trockenmassegehaltes

Bei der gravimetrischen Bestimmung der *Trockenmasse* (TM) wurde folgende Formel verwendet:

$$TM = \frac{AW}{EW} \times 100$$

Formel 1: Berechnung der Trockenmasse.

AW: Auswaage des Untersuchungsmaterials nach der Trocknung [g]

EW: Einwaage des Untersuchungsmaterials vor der Trocknung [g]

100: Umrechnungsfaktor auf [%] bzw. [g/100g]

4.5.2 Berechnung des Wassergehaltes

Der *Wassergehalt* (WG) wurde stets aus der zuvor ermittelten *Trockenmasse* (TM) bestimmt:

$$WG[\%] = 100 - TM[\%]$$

Formel 2: Berechnung des Wassergehaltes.

4.5.3 Berechnung des arithmetischen Mittels (Mittelwert)

Bei quantitativen Analysen wurden sämtliche Mittelwertangaben als *arithmetische Mittel* (\bar{x}) nach folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Formel 3: Berechnung des arithmetischen Mittels.

n : Anzahl der unabhängigen Bestimmungen

x_i : Einzelergebnis

4.5.4 Berechnung der Standardabweichung

Die quantitativen Analysenergebnisse wurden stets in Verbindung mit der berechneten *Standardabweichung des Mittelwertes* (\bar{s}) – auch als „Messunsicherheit“ bezeichnet – angegeben. Die Berechnung der Messunsicherheit erfolgte über die Bestimmung der *Standardabweichung der Einzelbestimmungen* (s) nach folgenden Formeln:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \bar{s} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Formel 4: Berechnung der Standardabweichung der Einzelbestimmung sowie der Standardabweichung vom Mittelwert.

n : Anzahl der unabhängigen Bestimmungen
 x_i : Einzelergebnis
 \bar{x} : Arithmetisches Mittel der Einzelergebnisse

4.5.5 Berechnung des geometrischen Mittels

Sämtliche Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren sowie Schwellenwertkonzentrationen wurden als *geometrische Mittel* (\bar{E}) angegeben und über die Bestimmung der *Erkennungsschwelle jeder einzelnen Prüfperson* (E_i) nach folgender Formel berechnet:

$$E_i = \sqrt{c_e \times c_{e-1}} \quad \bar{E} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n E_i}$$

Formel 5: Berechnung des geometrischen Mittels zur Schwellenwertkonzentrationsbestimmung aus den Erkennungsschwellenwertkonzentrationen der Einzelprüfpersonen.

c_e : Arithmetischer Mittelwert der Konzentration der ersten richtig erkannten Schwelle
 c_{e-1} : Arithmetischer Mittelwert der Konzentration der vorangegangenen Probenlösung
 n : Anzahl der unabhängigen Prüfpersonen

4.5.6 Berechnung von Responsefaktoren

Die Responsefaktoren (R_f) zur Quantifizierung von Analyten (X) über eine interne Standardsubstanz (IS) wurden gemäß folgender Formel berechnet:

$$R_f = \frac{c_X \times A_{IS}}{c_{IS} \times A_X}$$

Formel 6: Berechnung der Responsefaktoren.

c_X : Konzentration der Analytsubstanz in der Analysenlösung [mg/l]

c_{IS} : Konzentration der IS-Substanz in der Analysenlösung [mg/l]

A_X : Peakflächeninhalte der Analytsubstanz

A_{IS} : Peakflächeninhalte der IS-Substanz

4.5.7 Berechnung von Konzentrationen über IS-Peakflächen

Bei Quantifizierungen unter Einsatz einer internen Standardsubstanz (IS) wurden mittels Responsefaktoren (R_f) die Gehalte der Analyten (c_X) folgendermaßen berechnet:

$$c_X = \frac{R_f \times A_X \times c_{IS} \times U_f}{A_{IS} \times EW}$$

Formel 7: Berechnung der Analytgehalte über die Peakflächeninhalte.

R_f : Responsefaktor der Analytsubstanz

A_X : Peakflächeninhalte der Analytsubstanz

c_{IS} : Konzentration der IS-Substanz in der Analysenlösung [mg/l]

U_f : Umrechnungsfaktor: 100 → [100 g Probe]; 1000 → [kg Probe]

A_{IS} : Peakflächeninhalte der IS-Substanz

EW : Einwaage der Probe pro Extrakt [g/l]

4.5.8 Berechnung der DoT-Faktoren

Der Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktor einer Substanz ist der Quotient aus dessen Konzentration in der Matrix und dessen Erkennungsschwellenwertkonzentration; dimensionslose Angabe; die Einheiten des Zählers und des Nenners müssen identisch sein:

$$DoT = \frac{C_{Analyt}}{C_{Erkennungsschwelle}}$$

Formel 8: Berechnung der DoT-Faktoren.

C_{Analyt} : Analytkonzentration in der Matrix

$C_{Erkennungsschwelle}$: Konzentration der Erkennungsschwelle

4.6 Sensorische Analysen

4.6.1 Durchführende Personen – Sensorikpanel

Jede sensorische Evaluierung wurde durch ein sogenanntes „Sensorikpanel“ von mindestens acht, maximal 16 Personen unterschiedlichen Geschlechts im Alter von 23 bis 40 Lebensjahren durchgeführt. Die teilnehmenden Personen waren allesamt fachkundige Mitarbeiter des *Instituts für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster* bzw. des *Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik an der Technischen Universität München* und hatten das Studium des Faches Lebensmittelchemie erfolgreich abgeschlossen. Die Durchführung der sensorischen Analysen erfolgte an Werktagen in der Zeit zwischen 8.00 und 15.00 Uhr. Zur Vermeidung von nasalen sowie retronasalen Aromaeinflüssen wurden die sensorischen Experimente stets unter Verwendung von Nasenklammern durchgeführt (*Pri-jon Nasenklemme*, Globetrotter Ausrüstung Denart & Lechhart GmbH, Hamburg, GER). Die Temperatur der Räumlichkeiten betrug 18 bis 22 °C.

Zur Auswahl und Schulung der Geschmacksqualitäten wurden den Panelisten verschiedene Referenzlösungen gereicht, die mit *Evian*®-Sensorikwasser (pH 6,5 – eingestellt mit 1,0 %iger Ameisensäure in Wasser; V/V) angesetzt und mittels Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004) verkostet wurden. Als Referenzen dienten Saccharose (50 mmol/l) für süß, *D/L*-Milchsäure (20 mmol/l) für sauer, Natriumchlorid (20 mmol/l) für salzig, Coffein (1 mmol/l) für bitter, Natrium-*L*-glutamatmonohydrat (3 mmol/l) für umami, Tannin (0,05 %) für raue Adstringenz, Quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranosid (0,002 mmol/l) für samtige Adstringenz, eine wässrige Emulsion von Sojalecithin (5 %) und Ölsäure (5 mmol/l) für Cremigkeit.

Um die Aktivität der Mundfülle bzw. deren Verstärkungseffekt – die sogenannte „Kokumi-Verstärkung“ – zu trainieren, mussten die Panelisten Modellbrühen mit verschiedenen Gehalten an Glutathion (0; 0,5; 1,0; 2,5 mmol/l) in drei unabhängigen Sitzungen sensorisch vergleichen; vgl. Dunkel et al. (2007). Zur Herstellung der Modellbrühe wurden Natrium-*L*-glutamatmonohydrat (1,9 g), Maltodextrin (6,375 g), Natriumchlorid (2,9 g) sowie Hefeextrakt (2,1 g) in einen Messkolben (1,0 l) eingewogen, mit 900 ml Wasser versetzt, mit 0,1 %iger Ameisensäure in Wasser (V/V) auf pH 6,5 eingestellt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

4.6.2 Geschmacksprofilanalyse

Die Geschmacksprofilanalyse verfolgt die quantitative Bewertung verschiedener zuvor festgelegter Deskriptoren auf einer linearen Skala von 0 (kein Geschmack) bis 5 (sehr starker Geschmack) durch ein Sensorikpanel.

4.6.3 Geschmacksverdünnungsanalyse

Die Geschmacksverdünnungsanalyse nach Frank et al. (2001) ermöglicht die Lokalisierung geschmacksaktiver Verbindungen in komplexen Lebensmittelproben, Extrakten oder sonstigen Stoffgemischen. Die Fraktionen, welche nach Anwendung präparativer chromatographischer Trenntechniken vorliegen, werden in ihren in der Natur bzw. in dem Untersuchungsmaterial vorkommenden Konzentrationsverhältnissen unter Zuhilfenahme von Ethanol und Sensorikwasser gelöst und in 1/1-(V/V)-Volumenschritten verdünnt. Mit der geringsten Konzentration beginnend, werden die Verdünnungsreihen in aufsteigender Konzentrationsfolge durch den Half-Mouth-Test sensorisch untersucht. Die Verdünnungsstufe, bei der die Panelisten einen Unterschied zwischen der Probenlösung und einer „Blindlösung“ feststellen, ist als Geschmacksverdünnungsfaktor (GVF) definiert (Glabasnia 2007).

4.6.4 Triangeltest (Dreieckstest)

Der Triangel- oder Dreieckstest ist ein Prüfverfahren zur Untersuchung, ob zwischen zwei Prüfproben (A und B) ein sensorisch wahrnehmbarer Unterschied vorhanden ist. Dabei erhält jeder Prüfer (Panelist) drei Proben, zwei identische und eine abweichende. Jeder Prüfer ist aufgefordert, die abweichende Probe zu benennen; jeder Prüfer muss sich für eine Probe entscheiden (Quadt et al. 2009).

4.6.5 Half-Mouth-Test

Der Half-Mouth-Test (Scharbert et al. 2004) ist eine Sonderform des Duo-Trio-Tests, bei dem allgemein nach der Existenz eines Geschmacksunterschieds gefragt wird.

Jeder Panelist erhält drei Proben (Quadt et al. 2009): zwei „Blindproben“, von denen zwecks „Konditionierung“ eine als solche gekennzeichnet ist, sowie eine abweichende Probe. Von den für ihn unbekanntem Probenlösungen werden jeweils 1 ml auf der linken bzw. auf der rechten Zungenhälfte des Prüfers simultan appliziert. Eine Durchmischung darf dabei nicht stattfinden. Nach einer Wartezeit von 10 bis 30 s und einem Reiben der Zunge am Gaumen werden die sensorischen Geschmackseindrücke beider Zungenhälften verglichen (Glabasnia 2007). Die im Vergleich zur „Blindprobe“ abweichende Probe muss durch den Prüfer benannt werden; der Prüfer muss eine Benennung vornehmen.

4.6.6 Schwellenwertbestimmung

Die Schwellenwertbestimmung der einzelnen Substanzen und Extrakte erfolgt durch Anwendung des Triangel- oder Half-Mouth-Tests mit der Modifizierung, dass nicht der sensorische Unterschied der Probenlösung im Vergleich zur „Blindlösung“, sondern die Erkennung der Geschmacksqualität im Fokus der sensorischen Analyse steht. Somit handelt es sich bei sämtlichen Schwellenwertbestimmungen um die Bestimmung von Erkennungsschwellen.

4.6.7 Dosis-Wirkungskurven

Die sensorisch zu bewertenden Verbindungen sowie Referenzen werden nacheinander in 1/1-(V/V)-Volumenschritten bis einschließlich zwei Verdünnungsstufen unterhalb des jeweiligen Geschmackserkennungsschwellenwertes verdünnt. Dabei werden die Einwaagen so gewählt, dass die Verdünnungsstufen ganzzahligen DoT-Faktoren entsprechen. Die Geschmacksintensitäten der Referenzen sind definiert. Beginnend bei der jeweils geringsten Konzentration werden mittels Half-Mouth-Test die zu evaluierende Verbindung auf der einen, die Referenz auf der anderen Zungenhälfte simultan aufgetragen. Im Anschluss bewerten die Panelisten die relative Geschmacksintensität der zu untersuchenden Substanz (Stark 2006) im Vergleich zur Referenzlösung auf einer Intensitätsskala von 0 – nicht wahrnehmbar – bis 5 – stark wahrnehmbar.

Nachdem die Verdünnungsreihe einer Substanz im Vergleich zur Referenzreihe bezüglich der Geschmacksintensität komplett evaluiert wurde, können weitere Substanzen auf gleiche Weise mittels des Half-Mouth-Tests bewertet werden. Dabei werden die Verdünnungen der gleichen Substanz – vertikal – und durch Quervergleich mit anderen Verbindungen der gleichen DoT-Konzentration – horizontal – verglichen und bewertet.

5 Spektroskopische Daten zu identifizierten Geschmacksstoffen

5.1 Verbindungen aus Chicorée

5.1.1 11 β ,13-Dihydrolactucin (1)

(3*S*,3*aR*,4*S*,9*aS*,9*bR*)-4-Hydroxy-9-(hydroxymethyl)-3,6-dimethyl-3,3*a*,4,5-tetrahydroazuleno[4,5-*b*]furan-2,7(9*aH*,9*bH*)-dion

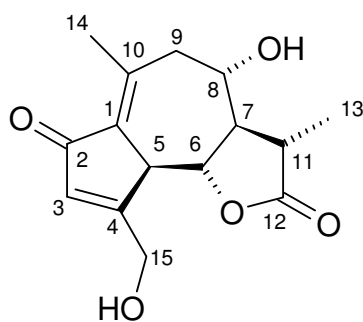


Abbildung 64: Molekülstruktur von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).

UV/VIS (Acetonitril/Wasser (pH 5,5), 15/85 (V/V)): λ_{\max} = 258 nm; MS (ESI⁺) *m/z* (%): 261 (18, [M+H-H₂O]⁺), 279 (70, [M+H]⁺), 296 (14, [M+Ammonium]⁺), 301 (100, [M+Na]⁺), 317 (42, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) *m/z* (%): 259 (12, [M-H-H₂O]⁻), 277 (14, [M-H]⁻), 313 (55, [M+Cl]⁻), 323 (100, [M+Formiat]⁻); MS/MS (ESI⁺, DP: +50; CE: +20, IS: +5500) *m/z* (%): 261 (22, [M+H₂O+H]⁺), 279 (62, [M+H]⁺); MS/MS (ESI⁻, DP: -50; CE: -15, IS: -4500) *m/z* (%): 259 (16, [M-H₂O-H]⁻), 277 (24, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄), δ /ppm 1,40 [d, 3H, *J* = 6,8 Hz, H-C(13)], 2,19 [m, 1H, H-C(7)], 2,39 [d, 1H, *J* = 2,0, H-C(9 β)], 2,44 [s, 3H, *J* = 6,8 Hz, H-C(14)], 2,67 [td, 1H, *J* = 6,8 Hz, 13,9 Hz, 18,7 Hz, H-C(11)], 2,83 [dd, 1H, *J* = 10,6 Hz, 13,6 Hz, H-C(9 α)], 3,66 [m, 1H, H-C(6)], 3,71 [m, 1H, H-C(5)], 4,37 [dd, 1H, *J* = 1,5 Hz, 18,7 Hz, H-C(8)], 4,41 [dd, 1H, *J* = 1,8 Hz, 18,7 Hz, H-C(15^ˆ)], 4,84 [d, 1H, *J* = 1,8 Hz, H-C(15)], 6,41 [d, 1H, *J* = 0,8 Hz, H-C(3)].

5.1.2 Lactucin (2)

(3aR,4S,9bR)-4-Hydroxy-9-(hydroxymethyl)-6-methyl-3-methylen-3,3a,4,5-tetrahydroazuleno[4,5-b]furan-2,7(9aH,9bH)-dion

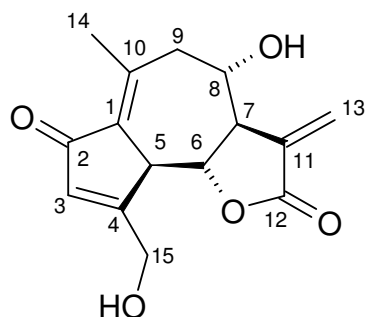


Abbildung 65: Molekülstruktur von Lactucin (2).

UV/VIS (Acetonitril/Wasser (pH 5,5), 15/85 (V/V)): $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$; MS (ESI⁺) *m/z* (%): 277 (100, [M+H]⁺), 294 (38, [M+Ammonium]⁺), 299 (96, [M+Na]⁺), 315 (44, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) *m/z* (%): 257 (14, [M-H-H₂O]⁻), 275 (16, [M-H]⁻), 311 (38, [M+Cl]⁻), 321 (80, [M+Formiat]⁻); MS/MS (ESI⁺, DP: +50; CE: +20, IS: +5500) *m/z* (%): 259 (22, [M+H₂O+H]⁺), 277 (100, [M+H]⁺); MS/MS (ESI⁻, DP: -50; CE: -15, IS: -4500) *m/z* (%): 257 (100, [M-H₂O-H]⁻), 275 (60, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄) δ /ppm 2,42 [m, 1H, H-C(9 β)], 2,44 [s, 3H, H-C(14)], 2,88 [dd, 1H, *J* = 10,9 Hz, 13,6 Hz, H-C(9 α)], 3,10 [tt, 1H, *J* = 3,0 Hz, 6,3 Hz, 9,9 Hz, H-C(7)], 3,71 [t, 1H, *J* = 9,9 Hz, 10,4 Hz, H-C(6)], 3,82 [m, 1H, H-C(5)], 3,87 [m, 1H, H-C(8)], 4,45 [d, 1H, *J* = 18,4 Hz, H-C(15 \prime)], 4,92 [d, 1H, *J* = 1,3 Hz, H-C(15)], 6,15 [dd, 1H, *J* = 1,3 Hz, 3,3 Hz, H-C(13 α)], 6,25 [dd, 1H, *J* = 1,3 Hz, 3,0 Hz, H-C(13 β)], 6,43 [d, 1H, *J* = 1,2 Hz, H-C(3)].

5.1.3 8-Desoxylactucin (3)

(3aS,9bS)-9-(Hydroxymethyl)-6-methyl-3-methylen-3,3a,4,5-tetrahydroazuleno[4,5-b]furan-2,7(9aH,9bH)-dion

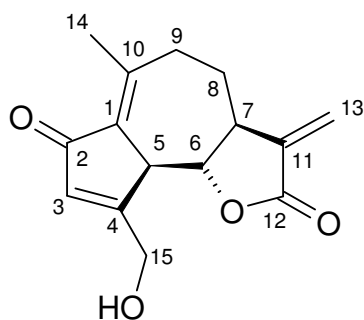


Abbildung 66: Molekülstruktur von 8-Desoxylactucin (3).

UV/VIS (Acetonitril/Wasser (pH 5,5), 25/75 (V/V)): $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$; MS (ESI⁺) m/z (%): 243 (10, [M+H-H₂O]⁺), 261 (100, [M+H]⁺), 283 (48, [M+Na]⁺), 299 (36, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) m/z (%): 259 (92, [M-H]⁻), 295 (62, [M+Cl]⁻), 305 (80, [M+Formiat]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄), δ /ppm 1,49 [q, 1H, $J = 12,1 \text{ Hz}, 12,6 \text{ Hz}, 12,9 \text{ Hz}$, H-C(8 β)], 2,29 [dt, 1H, $J = 2,8 \text{ Hz}, 6,1 \text{ Hz}, 13,6 \text{ Hz}$, H-C(8 α)], 2,42 [m, 1H, H-C(9 β)], 2,44 [s, 3H, H-C(14)], 2,88 [dd, 1H, $J = 10,9 \text{ Hz}, 13,6 \text{ Hz}$, H-C(9 α)], 3,05 [tt, 1H, $J = 2,8 \text{ Hz}, 11,1 \text{ Hz}, 21,0 \text{ Hz}$, H-C(7)], 3,71 [t, 1H, $J = 9,9 \text{ Hz}, 10,4 \text{ Hz}$, H-C(6)], 3,82 [m, 1H, H-C(5)], 4,45 [d, 1H, $J = 18,4 \text{ Hz}$, H-C(15 \prime)], 4,92 [d, 1H, $J = 1,3 \text{ Hz}$, H-C(15)], 6,15 [dd, 1H, $J = 1,3 \text{ Hz}, 3,3 \text{ Hz}$, H-C(13 \prime)], 6,25 [dd, 1H, $J = 1,3 \text{ Hz}, 3,0 \text{ Hz}$, H-C(13)], 6,43 [d, 1H, $J = 1,2 \text{ Hz}$, H-C(3)].

5.1.4 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4)

(3*S*,3*aS*,9*bS*)-9-(Hydroxymethyl)-3,6-dimethyl-3,3*a*,4,5-tetrahydroazuleno[4,5-*b*]furan-2,7(9*aH*,9*bH*)-dion

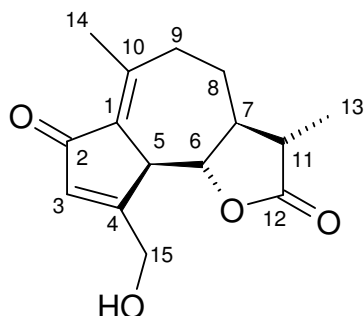


Abbildung 67: Molekülstruktur von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).

UV/VIS (Acetonitril/Wasser (pH 5,5), 25/75 (V/V)): $\lambda_{\max} = 258 \text{ nm}$; MS (ESI⁺) m/z (%): 263 (82, [M+H]⁺), 285 (100, [M+Na]⁺), 301 (58, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) m/z (%): 261 (20,

[M-H]⁻), 297 (10, [M+Cl]⁻), 307 (24, [M+Formiat]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄), δ/ppm 1,23 [d, 3H, *J* = 6,8 Hz, H-C(13)], 1,41 [q, 1H, *J* = 12,1 Hz, 12,6 Hz, 13,1 Hz, H-C(8β)], 2,03 [m, 1H, H-C(8α)], 2,39 [m, 1H, H-C(9β)], 2,44 [s, 3H, H-C(14)], 2,56 [t, 1H, *J* = 14,4 Hz, 27,0 Hz, H-C(9α)], 2,67 [td, 1H, *J* = 6,8 Hz, 13,9 Hz, 18,7 Hz, H-C(11)], 3,05 [tt, 1H, *J* = 2,8 Hz, 11,1 Hz, 21,0 Hz, H-C(7)], 3,31 [m, 1H, H-C(6)], 3,34 [m, 1H, H-C(5)], 4,41 [d, 1H, *J* = 18,7 Hz, H-C(15′)], 4,84 [d, 1H, *J* = 1,5 Hz, H-C(15)], 6,42 [m, 1H, H-C(3)].

5.1.5 Lactucopicrin (5)

(3*aR*,4*S*,9*bR*)-9-(Hydroxymethyl)-6-methyl-3-methylen-2,7-dioxo-2,3,3*a*,4,5,7,9*a*,9*b*-octahydroazuleno[4,5-*b*]furan-4-yl-2-(4-hydroxyphenyl)acetat

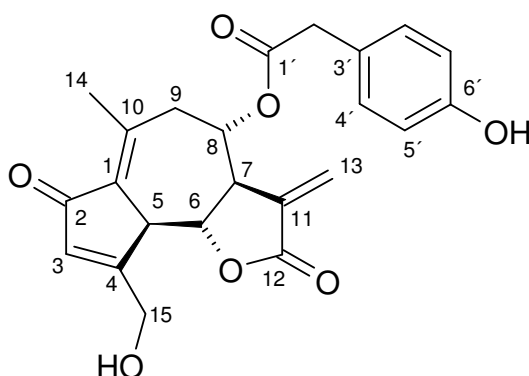


Abbildung 68: Molekülstruktur von Lactucopicrin (5).

UV/VIS (Acetonitril/Wasser (pH 5,5), 40/60 (V/V)): λ_{\max} = 258 nm; MS (ESI⁺) *m/z* (%): 411 (100, [M+H]⁺), 428 (24, [M+Ammonium]⁺), 433 (86, [M+Na]⁺), 449 (46, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) *m/z* (%): 391 (24, [M-H-H₂O]⁻), 409 (84, [M-H]⁻), 445 (38, [M+Cl]⁻), 455 (45, [M+Formiat]⁻); MS/MS (ESI⁺, DP: +50; CE: +20, IS: +5500) *m/z* (%): 411 (100, [M+H]⁺); MS/MS (ESI⁻, DP: -50; CE: -20, IS: -4500) *m/z* (%): 275 (20, [M-Lactucin-H]⁻), 409 (15, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*₄), δ/ppm 2,42 [m, 1H, H-C(9β)], 2,44 [s, 3H, H-C(14)], 2,88 [dd, 1H, *J* = 10,9 Hz, 13,6 Hz, H-C(9α)], 3,10 [tt, 1H, *J* = 3,0 Hz, 6,3 Hz, 9,9 Hz, H-C(7)], 3,71 [t, 1H, *J* = 9,9 Hz, 10,4 Hz, H-C(6)], 3,82 [m, 1H, H-C(5)], 3,87 [m, 1H, H-C(8)], 4,45 [d, 1H, *J* = 18,4 Hz, H-C(15′)], 4,62 [m, 1H, H-C(2′)], 4,92 [d, 1H, *J* = 1,3 Hz, H-C(15)], 6,15 [dd, 1H, *J* = 1,3 Hz, 3,3 Hz, H-C(13′)], 6,25 [dd, 1H, *J* = 1,3 Hz, 3,0 Hz, H-C(13)], 6,43 [s, 1H, H-C(3)], 6,75 [dd, 2H, *J* = 8,3 Hz, 14,1 Hz, H-C(5′), H-C(7′)], 7,14 [dd, 2H, *J* = 8,3 Hz, 14,1 Hz, H-C(4′), H-C(8′)].

5.1.6 Cichoriosid B (6)

9-[(β -D-Glucopyranosyloxy)methyl]-3,3a,4,5,9a,9b-(3S,3aR,4S,9aS,9bR)-hexahydro-4-hydroxy-3,6-dimethyl-azuleno[4,5-b]furan-2,7-dion;

11 β ,13-Dihydrolactucin-O- β -D-glucopyranosid

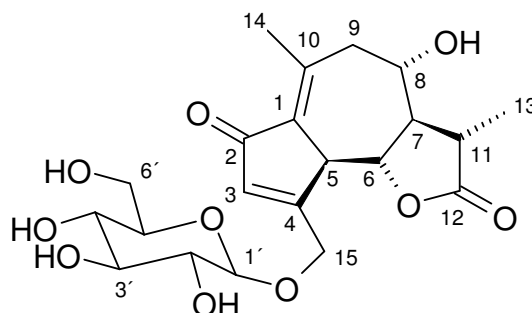


Abbildung 69: Molekülstruktur von Cichoriosid B (6).

UV/VIS (Acetonitril/Wasser (pH 5,5), 5/95 (V/V)): $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$; MS (ESI⁺) m/z (%): 279 (8, [M-Glucose+H]⁺), 441 (18, [M+H]⁺), 458 (40, [M+Ammonium]⁺), 463 (100, [M+Na]⁺), 479 (22, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) m/z (%): 439 (10, [M-H]⁻), 475 (38, [M+Cl]⁻), 485 (100, [M+Formiat]⁻); MS/MS (ESI⁺, DP: +50; CE: +20, IS: +5500) m/z (%): 243 (22, [M-Glucose-2H₂O+H]⁺), 261 (38, [M-Glucose-H₂O+H]⁺), 279 (78, [M-Glucose+H]⁺), 441 (100, [M+H]⁺); ¹H-NMR (400 MHz, Pyridin-*d*₅, COSY), δ /ppm 1,65 [d, 3H, $J = 6,92 \text{ Hz}$, H-C(13)], 2,27 [dd, 1H, $J = 21,23 \text{ Hz}$, 9,48 Hz, H-C(7)], 2,45 [s, 3H, H-C(14)], 2,54 [dd, 1H, $J = 13,62 \text{ Hz}$, 1,61 Hz, H-C(9a)], 2,77 [td, 1H, $J = 13,75 \text{ Hz}$, 6,88 Hz, 6,88 Hz, H-C(11)], 2,85 [td, 1H, $J = 14,13 \text{ Hz}$, 7,12 Hz, 7,12 Hz, H-C(9b)], 3,55 [d, 1H, $J = 10,22 \text{ Hz}$, H-C(5)], 3,58 [m, 1H, H-C(6)], 3,83 [t, 1H, $J = 9,95 \text{ Hz}$, 9,95 Hz, H-C(8)], 3,90 [m, 1H, H-C(4')], 4,09 [t, 1H, $J = 8,13 \text{ Hz}$, 8,13 Hz, H-C(2')], 4,25 [m, 1H, H-C(3')], 4,30 [m, 1H, H-C(6')], 4,38 [dd, 1H, $J = 11,80 \text{ Hz}$, 5,06 Hz, H-C(5')], 4,52 [dd, 1H, $J = 11,78 \text{ Hz}$, 2,02 Hz, H-C(6')], 4,94 [d, 1H, $J = 7,74 \text{ Hz}$, H-C(1')], 4,99 [m, 1H, H-C(15a)], 5,23 [m, 1H, H-C(15b)], 6,94 [s, 1H, H-C(3)]; ¹³C-NMR (400 MHz, Pyridin-*d*₅, HMQC, HMBC), δ /ppm 11,6 [C-13], 19,6 [C-14], 38,4 [C-11], 48,6 [C-5], 49,1 [C-9], 61,2 [C-7], 61,9 [C-6'], 68,4 [C-15], 68,8 [C-8], 70,9 [C-3'], 74,0 [C-2'], 77,9 [C-5'], 78,2 [C-4'], 80,1 [C-6], 103,8 [C-1'], 131,9 [C-1], 133,9 [C-3], 147,1 [C-10], 169,2 [C-12], 176,7 [C-4], 192,7 [C-2].

5.1.7 Cichoriensäure (7)

(2R,2R)-2,3-Bis[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-butan-1,4-disäure;
Chicoréesäure;

(2R,3R)-Dicaffeoylweinsäure

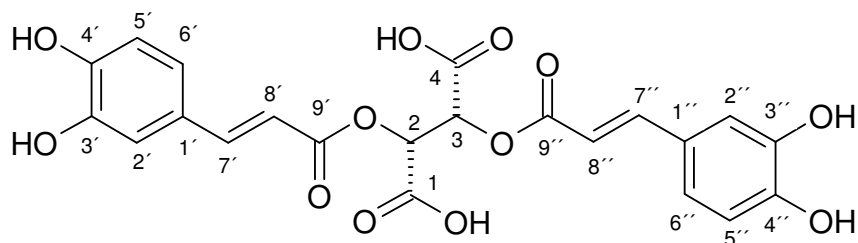


Abbildung 70: Molekülstruktur von Cichoriensäure (7).

UV/VIS (Acetonitril/0,1 % HCOOH in H₂O (pH 3,5), 5/95 (V/V)): $\lambda_{\max} = 244 \text{ nm}$; $\lambda_{\max} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\max} = 330 \text{ nm}$; MS (ESI⁺) m/z (%): 497 (100, [M+Na]⁺), 513 (8, [M+K]⁺); MS (ESI⁻) m/z (%): 473 (90, [M-H]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CO-SY), δ /ppm 5,81 [s, 2H, H-C(2), H-C(3)], 6,39 [d, 2H, $J = 15,9 \text{ Hz}$, H-C(8'), H-C(8'')], 6,80 [d, 2H, $J = 8,2 \text{ Hz}$, H-C(6'), H-C(6'')], 7,01 [dd, 2H, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 8,4 Hz, H-C(5'), H-C(5'')], 7,09 [d, 2H, $J = 2,1 \text{ Hz}$, H-C(2'), H-C(2'')], 7,67 [d, 2H, $J = 15,9 \text{ Hz}$, H-C(7'), H-C(7'')]; ¹³C-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, HMQC, HMBC), δ /ppm 71,0 [C-2], 71,0 [C-3], 112,1 [C-2'], 112,1 [C-2''], 113,7 [C-8'], 113,7 [C-8''], 115,1 [C-5'], 115,1 [C-5''], 122,0 [C-6'], 122,0 [C-6''], 126,1 [C-1'], 126,1 [C-1''], 145,5 [C-7'], 145,5 [C-7''], 147,2 [C-3'], 147,2 [C-3''], 148,6 [C-4'], 148,6 [C-4''], 166,2 [C-9'], 166,2 [C-9''], 168,2 [C-1], 168,2 [C-4].

5.2 Verbindungen aus Avocado

5.2.1 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1)

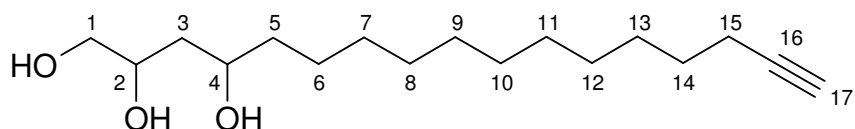


Abbildung 71: Molekülstruktur von 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 231 (30, [M-3H₂O+H]⁺), 249 (100, [M-2H₂O+H]⁺), 267 (60, [M-H₂O+H]⁺), 285 (50, [M+H]⁺), 569 (100, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 247 (45, [M-2H₂O-H]⁻), 265 (25, [M-H₂O-H]⁻), 283 (100, [M-H]⁻); MS/MS (APCI⁻, DP: -120, EP: -11, CE: -25, CXP: -6) *m/z* (%): 247 (100, [M-2H₂O-H]⁻), 265 (25, [M-H₂O-H]⁻), 283 (45, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 1,20 (s, 16H, H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13)), 1,42 [m, 2H, H-C(5)], 1,44 [qu, 2H, *J* = 6,8 Hz, 13,8 Hz, 21,0 Hz, H-C(14)], 1,53 [m, 2H, H-C(3)], 2,45 [m, 2H, H-C(15)], 2,86 [s, H, H-C(17)], 3,82 [m, 1H, H-C(4)], 3,93 [dd, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 12,1 Hz, H-C(2)], 4,04 [m, 2H, H-C(1)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 19,8 [C-15], 25,3 [C-6], 29,3 [C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 38,2 [C-5], 39,1 [C-3], 68,4 [C-17], 68,6 [C-1], 70,8 [C-2], 72,5 [C-4], 77,3 [C-16].

5.2.2 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2)

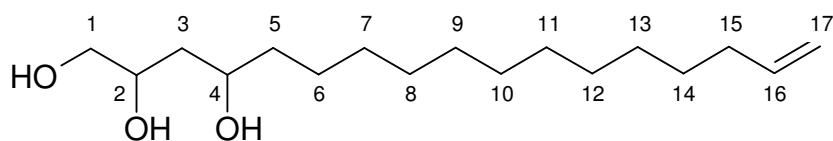


Abbildung 72: Molekülstruktur von 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 233 (30, [M-3H₂O+H]⁺), 251 (100, [M-2H₂O+H]⁺), 269 (50, [M-H₂O+H]⁺), 287 (50, [M+H]⁺), 571 (100, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 249 (45, [M-2H₂O-H]⁻), 267 (35, [M-H₂O-H]⁻), 285 (100, [M-H]⁻); MS/MS (APCI⁻, DP: -120, EP: -11, CE: -25, CXP: -6) *m/z* (%): 249 (100, [M-2H₂O-H]⁻), 267 (35, [M-H₂O-H]⁻), 285 (35, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 1,20 (s, 16H, H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13)), 1,31 [qu, 2H, *J* = 6,8 Hz, 13,8 Hz,

21,0 Hz, H-C(14)], 1,42 [m, 2H, H-C(5)], 1,53 [m, 2H, H-C(3)], 1,95 [m, 2H, H-C(15)], 3,82 [m, 1H, H-C(4)], 3,93 [dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 12,1$ Hz, H-C(2)], 4,04 (m, 2H, H-C(1)), 4,86 [dd, 2H, $J = 10,1$ Hz, H-C(17 β)], 4,92 [d, 1H, $J = 17,1$ Hz, H-C(17 α)], 5,74 [m, 1H, H-C(16)]; ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ/ppm 25,3 [C-6], 29,3 [C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 33,8 [C-15], 38,2 [C-5], 39,1 [C-3], 68,6 [C-1], 70,8 [C-2], 72,5 [C-4], 114,1 [C-17], 139,3 [C-16].

5.2.3 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-*n*-heptadeca-16-in (3)

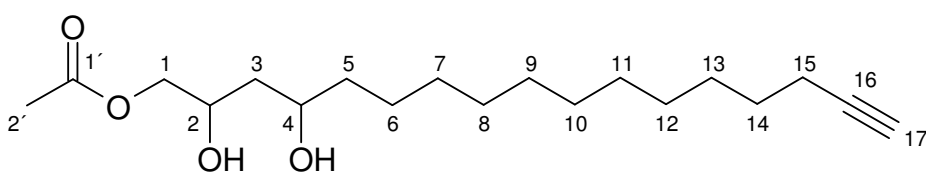


Abbildung 73: Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-*n*-heptadeca-16-in (3).

MS (APCI⁺) m/z (%): 231 (40, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 249 (80, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 267 (15, [M-HAc+H]⁺), 291 (30, [M-2H₂O+H]⁺), 309 (45, [M-H₂O+H]⁺), 327 (20, [M+H]⁺), 653 (100, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) m/z (%): 247 (35, [M-HAc-H₂O-H]⁻), 265 (30, [M-HAc-H]⁻), 283 (100, [M-CH₃CO]⁻), 325 (25, [M-H]⁻), 651 (100, [2M-H]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +120, CE: +25, CES: +10) m/z (%): 231 (10, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 249 (25, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 267 (10, [M-HAc+H]⁺), 309 (10, [M-H₂O+H]⁺), 327 (100, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -120, CE: -25, CES: -10) m/z (%): 307 (20, [M-H₂O-H]⁻), 325 (100, [M-H]⁻); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ/ppm 1,20 [s, 16H, H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13)], 1,42 [m, 2H, H-C(5)], 1,44 [qu, 2H, $J = 6,8$ Hz, 13,8 Hz, 21,0 Hz, H-C(14)], 1,53 [m, 2H, H-C(3)], 2,45 [m, 2H, H-C(15)], 2,04 [s, 3H, H-C(2')], 2,86 [s, H, H-C(17)], 3,82 [m, 1H, H-C(4)], 3,93 [dd, 1H, $J = 7,6$ Hz, $J = 12,1$ Hz, H-C(2)], 4,04 [m, 2H, H-C(1)]; ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ/ppm 19,8 [C-15], 20,9 [C-2'], 25,3 [C-6], 29,3 [C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 38,2 [C-5], 39,1 [C-3], 68,6 [C-2], 68,8 [C-17], 70,8 [C-4], 72,5 [C-1], 77,3 [C-16], 171,2 [C-1'].

5.2.4 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4)

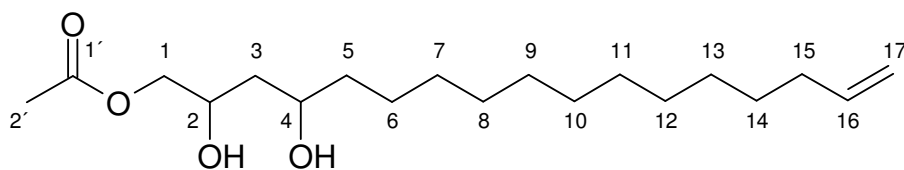


Abbildung 74: Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 233 (75, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 251 (70, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 269 (10, [M-HAc+H]⁺), 293 (15, [M-2H₂O+H]⁺), 311 (70, [M-H₂O+H]⁺), 329 (30, [M+H]⁺), 657 (100, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 655 (100, [2M-H]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +120, CE: +25, CES: +10) *m/z* (%): 233 (100, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 251 (90, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 269 (20, [M-HAc+H]⁺), 293 (5, [M-2H₂O+H]⁺), 311 (75, [M-H₂O+H]⁺), 329 (45, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -120, CE: -25, CES: -10) *m/z* (%): 285 (10, [M-CH₃O]⁻), 327 (100, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 1,20 [s, 16H, H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13)], 1,31 [qu, 2H, *J* = 6,8 Hz, 13,8 Hz, 21,0 Hz, H-C(14)], 1,42 [m, 2H, H-C(5)], 1,53 [m, 2H, H-C(3)], 1,95 [m, 2H, H-C(15)], 2,04 [s, 3H, H-C(2')], 3,82 [m, 1H, H-C(4)], 3,93 [dd, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J* = 12,1 Hz, H-C(2)], 4,04 [m, 2H, H-C(1)], 4,86 [dd, 2H, *J* = 10,1 Hz, H-C(17β)], 4,92 [d, 1H, *J* = 17,1 Hz, H-C(17α)], 5,74 [m, 1H, H-C(16)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 20,9 [C-2'], 25,3 [C-6], 29,3 [C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 33,8 [C-15], 38,2 [C-5], 39,1 [C-3], 68,6 [C-2], 70,8 [C-4], 72,5 [C-1], 114,1 [C-17], 139,3 [C-16], 171,2 [C-1].

5.2.5 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5)

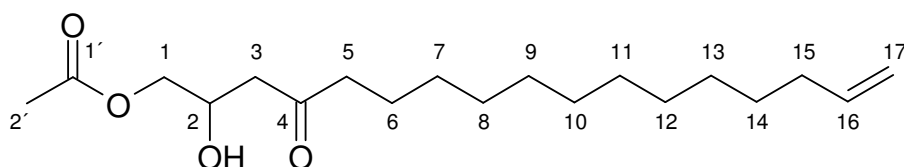


Abbildung 75: Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 231 (65, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 249 (85, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 267 (20, [M-HAc+H]⁺), 291 (70, [M-2H₂O+H]⁺), 309 (100, [M-H₂O+H]⁺), 327 (70, [M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 283 (45, [M-CH₃CO]⁻), 325 (40, [M-H]⁻), 651 (100, [2M-H]⁻);

EPI (APCI⁺, DP: +120, CE: +25, CES: +10) *m/z* (%): 231 (15, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 249 (35, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 267 (45, [M-HAc+H]⁺), 309 (10, [M-H₂O+H]⁺), 327 (100, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -120, CE: -25, CES: -28) *m/z* (%): 247 (10, [M-HAc-H₂O-H]⁻), 307 (10, [M-H₂O-H]⁻), 325 (100, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 1,20 [s, 16H, H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13), H-C(14)], 1,53 [m, H-C(6)], 1,98 [m, 2H, H-C(15)], 2,04 [s, 3H, H-C(1')], 2,48 [t, 2H, H-C(5)], 2,79 [m, 2H, H-C(3)], 4,12 [m, 2H, H-C(1)], 4,32 [m, 1H, H-C(2)], 4,86 [dd, 2H, *J* = 10,1 Hz, H-C(17β)], 4,92 [d, 1H, *J* = 17,1 Hz, H-C(17α)], 5,74 [m, 1H, H-C(16)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 20,9 [C-2'], 23,5 [C-6], 29,3 [C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 33,8 [C-15], 43,6 [C-5], 45,8 [C-3], 66,6 [C-2], 72,5 [C-1], 114,1 [C-17], 139,3 [C-16], 171,0 [C-1'], 210,9 [C-4].

5.2.6 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-*n*-heptadecan (6)

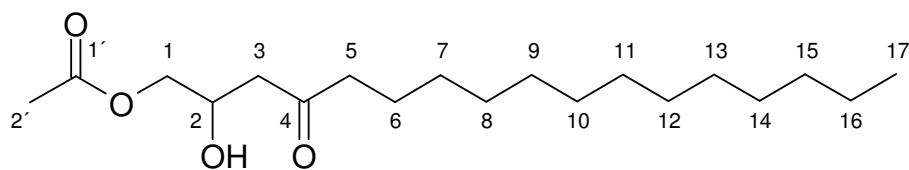


Abbildung 76: Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-*n*-heptadecan (6).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 233 (100, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 251 (55, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 269 (10, [M-HAc+H]⁺), 293 (35, [M-2H₂O+H]⁺), 311 (80, [M-H₂O+H]⁺), 329 (40, [M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 285 (45, [M-CH₃CO]⁻), 327 (25, [M-H]⁻), 655 (100, [2M-H]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +120, CE: +25, CES: +10) *m/z* (%): 233 (60, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 251 (40, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 269 (10, [M-HAc+H]⁺), 311 (5, [M-H₂O+H]⁺), 329 (10, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -120, CE: -25, CES: -10) *m/z* (%): 327 (100, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 0,89 [t, 3H, *J* = 6,5 Hz, *J* = 13,1 Hz, H-C(17)], 1,20 [s, 18H, H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13), H-C(14), H-C(15), H-C(16)], 1,53 [m, H-C(6)], 2,04 [s, 3H, H-C(1')], 2,48 [t, 2H, H-C(5)], 2,79 [m, 2H, H-C(3)], 4,12 [m, 2H, H-C(1)], 4,32 [m, 1H, H-C(2)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 14,1 [C-17], 20,9 [C-2'], 23,5 [C-16], 29,3 [C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 33,8 [C-15], 43,6 [C-5], 45,8 [C-3], 66,6 [C-2], 72,5 [C-1], 171,0 [C-1'], 210,9 [C-4].

5.2.7 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7)

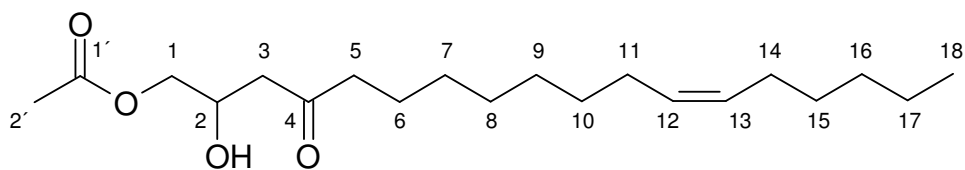


Abbildung 77: Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7).

MS (APCI⁺) m/z (%): 287 (75, [M-3H₂O+H]⁺), 305 (80, [M-2H₂O+H]⁺), 323 (100, [M-H₂O+H]⁺), 341 (25, [M+H]⁺), 663 (95, [2M-H₂O+H]⁺), 681 (40, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) m/z (%): 339 (40, [M-H]⁻), 385 (95, [M+Formiat]⁻), 679 (100, [2M-H]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +50, CE: +30, CES: +25) m/z (%): 287 (45, [M-3H₂O+H]⁺), 305 (50, [M-2H₂O+H]⁺), 323 (100, [M-H₂O+H]⁺), 341 (15, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -50, CE: -30, CES: -25) m/z (%): 303 (100, [M-2H₂O-H]⁻), 321 (80, [M-H₂O-H]⁻), 339 (35, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ /ppm 0,89 [t, 3H, $J = 6,5$ Hz, $J = 13,1$ Hz, H-C(18)], 1,30 [m, 14H, H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,49 [m, 2H, H-C(6)], 2,03 [dd, 4H, $J = 6,6$ Hz, 13,3 Hz, H-C(11), H-C(14)], 2,11 [s, 3H, H-C(2')], 2,52 [t, 2H, $J = 5,8$ Hz, 12,8 Hz, H-C(5)], 2,79 [m, 2H, H-C(3)], 4,12 [m, 2H, H-C(1)], 4,32 [m, 1H, H-C(2)], 5,37 [m, 4H, H-C(12), H-C(13)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ /ppm 14,1 [C-18], 20,9 [C-2'], 22,6 [C-17], 25,3 [C-6], 27,2 [C-11, C-14], 29,1 [C-7], 29,3 [C-8], 29,4 [C-15], 29,6 [C-9], 29,7 [C-10], 31,5 [C-16], 41,2 [C-5], 43,0 [C-3], 68,6 [C-2], 70,8 [C-1], 130,2 [C-12, C-13], 171,3 [C-1'], 210,9 [C-4]. Die Kopplungskonstante $J = 11,69$ Hz zwischen den Protonensignalen $\delta_H = 5,35$ ppm und $\delta_H = 5,37$ ppm bestätigte das Vorliegen der Doppelbindung in (*Z*)-Konfiguration.

5.2.8 (*Z,Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8)

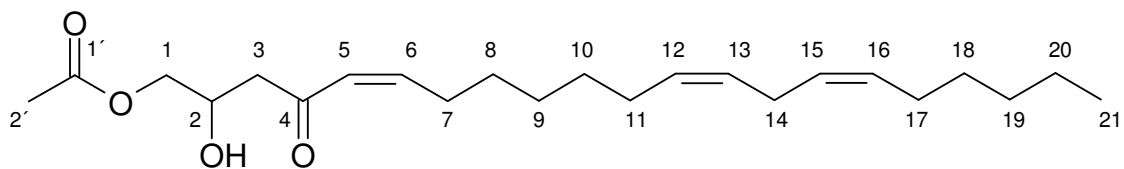


Abbildung 78: Molekülstruktur von (*Z,Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8).

MS (APCI⁺) m/z (%): 283 (10, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 301 (100, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 319 (75, [M-HAc+H]⁺), 361 (10, [M-H₂O+H]⁺), 379 (20, [M+H]⁺); MS (APCI⁻) m/z (%): 361

(10, [M-H₂O-H]⁻), 377 (40, [M-H]⁻), 755 (50, [2M-H]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +90, CE: +35, CES: +30) *m/z* (%): 283 (30, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 301 (100, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 319 (15, [M-HAc+H]⁺), 343 (5, [M-2H₂O+H]⁺), 361 (50, [M-H₂O+H]⁺), 379 (50, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -60, CE: -15, CES: -9) *m/z* (%): 299 (5, [M-HAc-H₂O-H]⁻), 317 (25, [M-HAc-H]⁻), 377 (10, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 0,89 [m, 3H, H-C(21)], 1,28 [m, 12H, H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(18), H-C(19), H-C(20)], 2,06 [m, 6H, H-C(7), H-C(11), H-C(17)], 2,11 [s, 3H, H-C(2')], 2,32 [qu, 2H, *J* = 6,9 Hz, 13,9 Hz, H-C(14)], 2,77 [d, 2H, *J* = 5,7 Hz, H-C(3)], 4,12 [m, 2H, H-C(2)], 4,35 [m, 1H, H-C(1)], 5,37 [m, 4H, H-C(12), H-C(13), H-C(15), H-C(16)], 6,11 [d, 1H, *J* = 15,9 Hz, H-C(5)], 6,89 [m, 1H, H-C(6)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 14,1 [C-21], 20,9 [C-2'], 22,6 [C-20], 25,6 [C-14], 27,2 [C-11, C-17], 29,6 [C-18], 27,9 [C-8], 28,8 [C-9], 29,4 [C-10], 31,5 [C-19], 32,5 [C-7], 42,3 [C-3], 66,2 [C-2], 67,3 [C-1], 127,8 [C-13, C-15], 129,7 [C-12, C-16], 130,3 [C-5], 149,4 [C-6], 171,1 [C-1'], 199,7 [C-4]. Die Kopplungskonstante *J* = 12,03 Hz zwischen den Protonensignalen δ_H = 5,39 ppm und δ_H = 5,35 ppm bestätigte die (*Z*)-Konfiguration der zwei Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C-12/13 und C-15/16. Die Kopplungskonstante von *J* = 15,79 Hz zwischen δ_H = 6,89 ppm und δ_H = 6,11 ppm charakterisierte die C-5/6-Doppelbindung ebenfalls als (*Z*)-konfiguriert.

5.2.9 (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9)

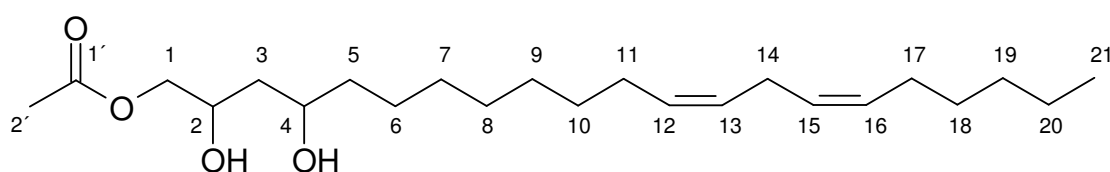


Abbildung 79: Molekülstruktur von (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 287 (100, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 305 90(, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 323 (30, [M-HAc+H]⁺), 347 55(, [M-2H₂O+H]⁺), 365 (85, [M-H₂O+H]⁺), 383 (75, [M+H]⁺), 765 (100, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 381 (15, [M-H]⁻), 763 (10, [2M-H]⁻), 809 (35, [2M+Formiat]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +60, CE: +20, CES: +15) *m/z* (%): 287 (40, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 305 (100, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 323 (10, [M-HAc+H]⁺), 347 (5, [M-2H₂O+H]⁺), 365 (20, [M-H₂O+H]⁺), 383 (5, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -60, CE: -15, CES: -9) *m/z* (%): 303 (10, [M-HAc-H₂O-H]⁻), 321 (30, [M-HAc-H]⁻), 363 (50, [M-H₂O-

H⁺], 381 (100, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 0,89 [t, 3H, *J* = 6,5 Hz, *J* = 13,1 Hz, H-C(21)], 1,30 [m, 14H, H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(18), H-C(19), H-C(20)], 1,49 [m, 2H, H-C(5)], 1,59 [m, 2H, H-C(3)], 2,03 [qu, 4H, *J* = 6,6 Hz, 13,3 Hz, H-C(11), H-C(17)], 2,11 [s, 3H, H-C(2')], 2,62 [t, 2H, *J* = 5,8 Hz, 12,8 Hz, H-C(14)], 3,90 [m, 1H, H-C(4)], 4,06 [qu, 1H, *J* = 7,9 Hz, 12,1 Hz, H-C(2)], 4,30 [m, 2H, H-C(1)], 5,36 [m, 4H, H-C(12), H-C(13), H-C(15), H-C(16)]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ/ppm 14,1 [C-21], 20,9 [C-2'], 22,6 [C-20], 25,3 [C-6], 25,6 [C-14], 27,2 [C-11, C-17], 29,1 [C-7], 29,3 [C-8], 29,4 [C-18], 29,6 [C-9], 29,7 [C-10], 31,5 [C-19], 38,2 [C-5], 39,0 [C-3], 68,6 [C-2], 70,8 [C-1], 72,6 [C-4], 128,0 [C-13, C-15], 130,2 [C-12, C-16], 171,3 [C-1']. Die Kopplungskonstante *J* = 11,69 Hz zwischen den Protonensignalen δ_H = 5,35 ppm und δ_H = 5,37 ppm bestätigte die (*Z*)-Konfiguration der zwei Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C-12/13 und C-15/16.

5.2.10 (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10)

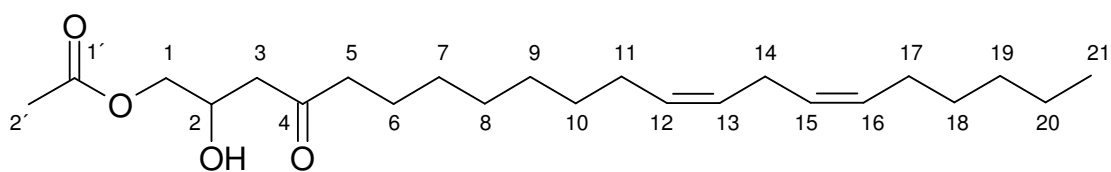


Abbildung 80: Molekülstruktur von (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10).

MS (APCI⁺) *m/z* (%): 285 (20, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 303 (100, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 321 (65, [M-HAc+H]⁺), 363 (10, [M-H₂O+H]⁺), 381 (50, [M+H]⁺), 643 (20, [2M-H₂O +H]⁺), 761 (20, [2M+H]⁺); MS (APCI⁻) *m/z* (%): 319 (45, [M-HAc-H]⁻), 379 (10, [M-H]⁻), 805 (15, [2M+Formiat]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +60, CE: +45, CES: +50) *m/z* (%): 285 (20, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 303 (35, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 321 (20, [M-HAc+H]⁺), 363 (5, [M-H₂O+H]⁺), 381 (100, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -90, CE: -30, CES: -40) *m/z* (%): 301 (90, [M-HAc-H₂O-H]⁻), 319 (80, [M-HAc-H]⁻), 361 (15, [M-H₂O-H]⁻), 379 (100, [M-H]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ/ppm 0,87 [t, 3H, *J* = 6,7 Hz, *J* = 14,0 Hz, H-C(21)], 1,28 [m, 14H, H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(18), H-C(19), H-C(20)], 1,56 [q, 2H, *J* = 7,3 Hz, 14,7 Hz, H-C(6)], 2,03 [m, 4H, H-C(11), H-C(17)], 2,09 [s, 3H, H-C(2')], 2,48 [t, 2H, *J* = 7,1 Hz, 7,6 Hz, H-C(5)], 2,62 [m, 2H, H-C(14)], 2,79 [t, 2H, *J* = 6,6 Hz, 6,7 Hz, H-C(3)], 4,06 [m, 2H, H-C(1)], 4,30 [m, 1H, H-C(2)], 5,37 [m, 4H, H-

C(12), H-C(13), H-C(15), H-C(16)]; ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3), δ/ppm 14,1 [C-21], 20,9 [C-2'], 22,6 [C-20], 23,5 [C-6], 25,6 [C-14], 27,2 [C-11, C-17], 29,1 [C-7], 29,3 [C-8], 29,4 [C-18], 29,6 [C-9], 29,7 [C-10], 31,5 [C-19], 43,6 [C-5], 45,2 [C-3], 66,6 [C-2], 77,2 [C-1], 127,9 [C-13, C-15], 130,1 [C-12, C-16], 171,0 [C-1'], 210,9 [C-4]. Die Kopplungskonstante $J = 12,14$ Hz zwischen den Protonensignalen $\delta_{\text{H}} = 5,39$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 5,36$ ppm bestätigte die (*Z*)-Konfiguration der zwei Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C-12/13 und C-15/16.

5.2.11 1-Linoleoylglycerol (11)

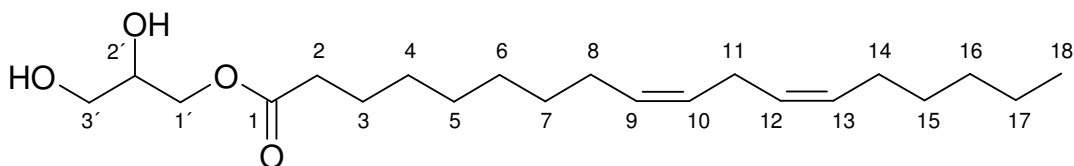


Abbildung 81: Molekülstruktur von 1-Linoleoylglycerol (11).

MS (APCI⁺) m/z (%): 277 (100, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 295 (95, [M-HAc+H]⁺), 355 (25, [M+H]⁺), 691 (100, [2M-H₂O+H]⁺); MS (APCI⁻) m/z (%): 293 (40, [M-HAc-H]⁻), 353 (35, [M-H]⁻), 399 (15, [M+Formiat]⁻), 707 (55, [2M-H]⁻); EPI (APCI⁺, DP: +120, CE: +20, CES: +30) m/z (%): 277 (100, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 295 (25, [M-HAc+H]⁺), 337 (5, [M-H₂O+H]⁺), 355 (15, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -120, CE: -60, CES: -40) m/z (%): 335 (5, [M-H₂O-H]⁻), 353 (50, [M-H]⁻); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ/ppm 0,87 [t, 3H, $J = 5,4$ Hz, 12,5 Hz, H-C(18)], 1,26 [m, 12H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,63 [q, 2H, $J = 7,6$ Hz, 14,9 Hz, H-C(3)], 2,11 [m, 4H, H-C(8), H-C(14)], 2,23 [qu, 2H, $J = 7,2$ Hz, 14,4 Hz, H-C(2)], 2,77 [d, 2H, $J = 5,18$ Hz, H-C(11)], 3,65 [m, 2H, H-C(3')], 3,93 [q, 1H, $J = 6,1$ Hz, 3,8 Hz, H-C(2')], 4,17 [m, 2H, H-C(1')], 5,57 [m, 2H, H-C(9), H-C(13)], 5,74 [m, 2H, H-C(10), H-C(12)]; ^{13}C -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ/ppm 14,0 [C-18], 22,6 [C-17], 24,9 [C-3], 25,3 [C-11], 27,5 [C-8, C-14], 28,9 [C-4, C-5], 29,4 [C-6, C-7, C-15], 30,6 [C-16], 34,1 [C-2], 63,4 [C-3'], 65,1 [C-1'], 70,3 [C-2'], 127,1 [C-10, C-12], 129,9 [C-9, C-13], 174,4 [C-1].

5.2.12 1-Stearyl glycerol (12)

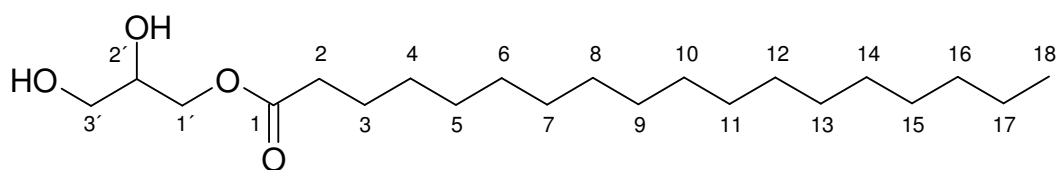


Abbildung 82: Molekülstruktur von 1-Stearyl glycerol (12).

MS (APCI⁺) m/z (%): 263 (35, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 281 (50, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 305 (25, [M-3H₂O+H]⁺), 323 (35, [M-2H₂O+H]⁺), 341 (60, [M-H₂O+H]⁺), 359 (35, [M+H]⁺), 717 (25, [2M+H]⁺); EPI (APCI⁺, DP: +90, CE: +10, CES: +20) m/z (%): 263 (100, [M-HAc-2H₂O+H]⁺), 281 (40, [M-HAc-H₂O+H]⁺), 305 (5, [M-3H₂O+H]⁺), 323 (35, [M-2H₂O+H]⁺), 341 (40, [M-H₂O+H]⁺), 359 (35, [M+H]⁺); EPI (APCI⁻, DP: -60, CE: -10, CES: -20) m/z (%): 357 (100, [M-H]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ /ppm 0,82 [t, 3H, J = 6,9 Hz, H-C(18)], 1,92 [m, 28H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13), H-C(14), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,63 [q, 2H, J = 7,6 Hz, 14,9 Hz, H-C(3)], 2,25 [t, 2H, J = 7,4 Hz, H-C(2)], 3,60 [qu, 1H, J = 5,8 Hz, 11,4 Hz, H-C(3' α)], 3,69 [qu, 1H, J = 3,8 Hz, 7,6 Hz, H-C(3' β)], 3,93 [q, 1H, J = 6,1 Hz, 3,8 Hz, H-C(2')], 4,17 [m, 2H, H-C(1')]; ¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ /ppm 14,0 [C-18], 22,6 [C-17], 24,9 [C-3], 28,9 [C-4, C-5, C-15], 29,1 [C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14], 31,6 [C-16], 34,1 [C-2], 63,4 [C-3'], 65,1 [C-1'], 70,3 [C-2'], 174,4 [C-1].



6 Zusammenfassung

Die Klärung kausaler Zusammenhänge zwischen individuellen Geschmackspräferenzen und Ernährungsverhalten legt interindividuelle Variationen in der Ausstattung mit Geschmacksrezeptorgen nahe und setzt die Klärung der dem Geschmack zugrunde liegenden Moleküle voraus. Da insbesondere die individuelle Bitterwahrnehmung mit der Verzehrpräferenz pflanzlicher Lebensmittel wie z.B. Chicorée (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) oder erhitzter Avocado (*Persea americana* Mill. cv. *Hass*) zusammenzuhängen scheint, gilt es, die diesen Bittergeschmack induzierenden Verbindungen zunächst zweifelsfrei zu identifizieren.

Durch aktivitätsorientierte Fraktionierung konnten unter Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse die Guaiansesquiterpenlactone 11 β ,13-Dihydro-lactucin (**1**), Lactucin (**2**), 8-Desoxylactucin (**3**), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (**4**) und Lactucopicrin (**5**) sowie das Sesquiterpenlactonglycosid Cichoriosid B (**6**) als Schlüsselbitterstoffe von Chicorée identifiziert werden. Als weitere geschmacksaktive Verbindung konnte die Cichoriensäure (**7**) identifiziert werden, die einen stark adstringierenden Mundeindruck hinterließ. Humansensorische Studien ergaben Schwellenwerte der Lactone **1-5** in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 20,2 $\mu\text{mol/l}$ und unabhängig von deren Struktur ähnlich verlaufende Dosis/Wirkungs-Funktionen. Um den Dosis-Wirkungsverlauf bzw. das sensorische Verhalten oberhalb ihrer Bitterschwellenwertkonzentrationen zu untersuchen, wurde von Dihydro-lactucin (**1**) im Vergleich zu seinem O- β -D-Glycosid-Analogen Cichoriosid B (**6**) jeweils eine Dosis-Wirkungs-Funktion erstellt. Dabei zeigte **6** bei den Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren oberhalb der Geschmacksschwellenwertkonzentration stets die höheren Intensitäten an Bitterkeit.

Quantitative Analysen einzelner Salatkopfpartien mittels HPLC-MS/MS führten zu dem Ergebnis, dass die Sesquiterpenlactonbitterstoffe **1-5** innerhalb eines Chicorée-Salatkopfes nicht homogen verteilt sind. Gerade in den Blattspitzen sind starke Anreicherungen von Lactucopicrin (**5**), dem Bitterstoff mit dem niedrigsten Schwellenwert, zu verzeichnen, was mit einem erhöhten Schutzbedürfnis dieser Wachstumsregionen einhergeht. Des Weiteren wurde eine HPLC-MS/MS-Multimethode zwecks Screening von Korbblütlern auf Chicorée-Bitterstoffe **1-5** entwickelt. Neben Chicorée-

Salat (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) wurden Chicorée-Wurzeln (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*), Radicchio Rosso (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*), Zuckerhut (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*), grüner Löwenzahn (*Taraxacum officinale* F. H. Wigg.), gebleichter Löwenzahn (*Taraxacum officinale* F. H. Wigg.) sowie die spanische und sardinische Artischocke (*Cynara scolymus* L.) untersucht. Dihydrolactucin (**1**), 8-Desoxylactucin (**3**) und Lactucopicrin (**5**) konnten dabei in allen Untersuchungsmaterialien nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

Um die im Zuge der thermischen Verarbeitung von Avocado auftretende Bitterkeit auf molekularer Ebene zu definieren, wurden Lösungsmittelextrakte aktivitätsorientiert fraktioniert, im Anschluß konnten mittels LC-MS/MS und NMR-Studien insgesamt zwölf Oxylipine als Bitterstoffe identifiziert werden: 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (**1**), 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (**2**), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (**3**), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (**4**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (**5**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (**6**), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (**7**), (*Z,Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (**8**), (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (**9**), (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**), 1-Linoleoylglycerin (**11**) und 1-Stearoylglycerin (**12**). Interessanterweise zeigten einige dieser Verbindungen in Konzentrationen unterhalb deren Bitterschwellenwertkonzentration geschmacksverstärkende Wirkung. So verstärkte die Anwesenheit dieser Verbindungen die sogenannte Kokumi-Intensität einer Modellbrühe. Dieser Mundfülle bzw. Kokumi verstärkende Effekt bzw. dessen Auftreten wurde erstmalig im Zusammenhang mit den isolierten Verbindungen beobachtet. Dabei zeigte sich das (*Z,Z*)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (**10**) als die Schlüsselverbindung mit den jeweils höchsten Aktivitätswerten für den Bittergeschmack als auch den Kokumi-Eindruck. Struktur/Wirkungs-Überlegungen ergaben, dass interessanterweise nur Verbindungen mit einer 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo- oder 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-Partialstruktur einen Kokumi-Effekt auslösten, während die anderen Avocado-Inhaltsstoffe inaktiv waren.

Mittels interner Standardkalibration, wobei 1-O-Palmitylglycerin (**IS**) als interne Referenzsubstanz fungierte, erfolgte anschließend die Quantifizierung der identifizierten Substanzen mittels HPLC-MS/MS-Analyse. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Geschmacksstoffe **1-12** erst beim Erhitzen von Avocado entstehen und deren Bildungen mit zunehmender Temperatur sowie Erhitzungsdauer begünstigt waren.

Die vorliegende Arbeit liefert letztendlich zentrale Daten zur Struktur und sensorischen Wirksamkeit von Bitterstoffen und Kokumi-Verbindungen in Chicorée und Avocado und legt somit die Grundlage zur Deorphanisierung von Bitterrezeptoren und zu Folgestudien zur Aktivierbarkeit von Geschmacksrezeptorgenvarianten durch definierte bittere Liganden.



7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der bittere Geschmack (Adriaen Brouwer, 1605/06-1638). Bildnachweis: Mit freundlicher Genehmigung durch das Städelsche Kunstinstitut, Frankfurt am Main, Deutschland 2010.	2
Abbildung 2:	Chicorée (<i>Cichorium intybus</i> L. var. <i>foliosum</i> Hegl).....	5
Abbildung 3:	Herkunfts- und Kultivierungsregionen der Gemeinen Wegwarte (Universität Hamburg 2006). Bildnachweis: Mit freundlicher Genehmigung durch Paul von Sengbusch, Heide, Deutschland 2009.	6
Abbildung 4:	Biosynthesewege zur Bildung von Eudesman-, Germacran- und Guaian-Molekülgerüsten aus Farnesyldiphosphat.	9
Abbildung 5:	Schema zur Bildung von (+)-Costunolid als Vorstufe von Sesquiterpenlactonen in Chicorée.	10
Abbildung 6:	Eudesman-Derivate in der Chicorée-Wurzel (Seto et al. 1988).	11
Abbildung 7:	Germacran-Derivate in der Chicorée-Wurzel (Seto et al. 1988).	11
Abbildung 8:	Guaian-Derivate in der Chicorée-Wurzel (Seto et al. 1988).....	11
Abbildung 9:	<i>Hass-Avocados</i> (<i>Persea americana</i> Mill. cv. <i>Hass</i>).....	16
Abbildung 10:	Zeitliche Entwicklung der Avocadoweltproduktion 1961-2007 (FAO 2009) und der Weltbevölkerung 1961-2007 (UN 2009).	17
Abbildung 11:	Hauptanbauregionen von Avocados (Hofshi Foundation 2009). Bildnachweis: Mit freundlicher Genehmigung durch Reuben Hofshi, Fallbrook, Kalifornien, USA 2009.	18
Abbildung 12:	Molekülstrukturen von 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (A) und 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (B).....	20
Abbildung 13:	Chicorée-Extraktionsschema	26
Abbildung 14:	Präparatives RP-HPLC-UV/VIS-Chromatogramm ($\lambda = 258$ nm) der Chicorée-Ethylacetatfraktion.	28
Abbildung 15:	Molekülstruktur von Guaian (links) und allgemeine Molekülgrundstruktur der in Fraktion B identifizierten Guaiansesquiterpenlactone (rechts)..	30
Abbildung 16:	Molekülstruktur von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).	31
Abbildung 17:	ESI(+)-LC-MS-Spektrum von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).....	31
Abbildung 18:	HMQC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).....	32
Abbildung 19:	HMBC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).....	33
Abbildung 20:	Molekülstruktur von Lactucin (2).	34
Abbildung 21:	ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Lactucin (2).....	34
Abbildung 22:	¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von Lactucin (2).....	35
Abbildung 23:	HMQC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von Lactucin (2).....	36
Abbildung 24:	Molekülstruktur von 8-Desoxylactucin (3).....	37
Abbildung 25:	Molekülstruktur von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).	38
Abbildung 26:	ESI(+)-LC-MS-Spektrum von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4)...	38
Abbildung 27:	¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).....	39

Abbildung 28:	HMQC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).	40
Abbildung 29:	Molekülstruktur von Lactucopicrin (5).	41
Abbildung 30:	ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Lactucopicrin (5).	42
Abbildung 31:	HMBC-NMR-Spektrum (400 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von Lactucopicrin (5).	43
Abbildung 32:	Präparatives RP-HPLC-UV/VIS-Chromatogramm (λ = 258 nm) der XAD-2®-Fraktion C5/6.	45
Abbildung 33:	Molekülstruktur von Cichoriensäure (7).	47
Abbildung 34:	ESI(-)-LC-MS-Spektrum von Cichoriensäure (7).	48
Abbildung 35:	ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Cichoriensäure (7).	48
Abbildung 36:	COSY-NMR-Spektrum (500 MHz, Methanol- <i>d</i> ₄) von Cichoriensäure (7).	49
Abbildung 37:	Molekülstruktur von Cichoriosid B (6).	50
Abbildung 38:	ESI(+)-LC-MS-Spektrum von Cichoriosid B (6).	51
Abbildung 39:	ESI(-)-LC-MS-Spektrum von Cichoriosid B (6).	51
Abbildung 40:	ESI(+)-LC-MS/MS-Spektrum (<i>m/z</i> 441) von Cichoriosid B (6).	52
Abbildung 41:	¹ H-NMR-Spektrum (Auszug) von Cichoriosid B (6).	53
Abbildung 42:	HMBC-Spektrum von Cichoriosid B (6).	54
Abbildung 43:	Analytische RP-HPLC-DAD-Chromatogramme (λ = 258 nm) der wässrigen Chicorée-Fraktion C vor (A) bzw. nach (B) Behandlung mit β -Glucosidase: Cichoriosid B (6) (RT 12,6-12,8 min), Dihydrolactucin (1) (RT 16,2-16,5 min).	55
Abbildung 44:	Molekülstrukturen von Rosmarinsäure (A), (-)-N-[3',4'-Dihydroxy-(<i>E</i> -cinnamoyl)]-3-hydroxy- <i>L</i> -tyrosin (B) und Cichoriensäure (C).	57
Abbildung 45:	Humane Dosis-Wirkungskurven von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) in Sensorikwasser (pH 6,5).	60
Abbildung 46:	Humane Dosis-Wirkungsfunktionen von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1) und Cichoriosid B (6) in Sensorikwasser (pH 6,5): Bitterintensität vs. Konzentration (A) und Bitterintensität vs. DoT-Faktor-Konzentration (B).	61
Abbildung 47:	Kalibriergeraden von Lactucin (2) und Lactucopicrin (5). – Berechnet durch lineare Regression der Koordinatenpunkte im Peakflächen-Konzentrationen-Diagramm.	63
Abbildung 48:	Struktur von (-)- α -Santonin.	67
Abbildung 49:	Rasteruntersuchungen und Quantifizierung von Chicorée-Bitterstoffen 1-5 in Korbblütlern mittels HPLC-MS/MS-Analyse.	68
Abbildung 50:	Profilsensorik nativer und erhitzter (120 °C, 30 min) Avocadopulpe.	73
Abbildung 51:	Relative Intensitäten der Bitterkeit von Avocadopulpe nach Erhitzung bei 80, 100 und 120 °C über einen Zeitraum von 0, 30, 60 und 120 min.	75
Abbildung 52:	Extraktionsschema für Avocadopulpe und erhitze Avocadopulpe.	76
Abbildung 53:	Separation der Triglyceride von Avocado-Bitter-/Kokumi-Verbindungen – Herstellung der triglyceridfreien Fraktion B.	77
Abbildung 54:	Präparatives RP-HPLC-ELSD-Chromatogramm der Fraktion B aus erhitzter Avocadopulpe, 22 Subfraktionen (B1-B22) wurden separiert.	78
Abbildung 55:	Molekülstrukturen der identifizierten Verbindungen in erhitzter Avocadopulpe: 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1), 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy- <i>n</i> -heptadeca-16-in (3), 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy- <i>n</i> -heptadeca-16-en (4), 1-Acetoxy-2-	

	hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6), 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7), (Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8), (Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9), (Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10), 1-Linoleoylglycerol (11), 1-Stearoylglycerol (12).....	80
Abbildung 56:	Molekülgrundstruktur identifizierter Fettalkohole 1-2 (links) und Molekülgrundstruktur identifizierter 1-Acetoxy-Derivate 3-10 (rechts) aus erhitzter <i>Hass-Avocadopulpe</i>	81
Abbildung 57:	APCI(+)-LC-MS-Spektrum von 1-Linoleoylglycerol (11).	83
Abbildung 58:	APCI(+)-LC-MS-Spektrum von 1-Stearoylglycerol (12).	84
Abbildung 59:	Molekülstrukturen der identifizierten Monoglyceride 1-Linoleoylglycerol (11), 1-Stearoylglycerol (12) sowie der Monoglyceridderivate 1-Oleoylglycerol (13), 2-Oleoylglycerol (14), 1-Palmitoylglycerol (15). 1-O-Palmitylglycerin (16).....	86
Abbildung 60:	Quantifizierung ausgewählter Verbindungen in erhitzter Avocadopulpe mittels HPLC-MS/MS unter Einsatz einer internen Standardverbindung (IS).....	90
Abbildung 61:	Relative Intensität der Bitterkeit und der Mundfülle von nativen, mit den Substanzen 1-12 versetzten nativen sowie erhitzten Avocadopürees.	93
Abbildung 62:	Einfluss der Erhitzungsdauer auf die DoT-Faktoren der Bitterstoffe 3, 7 und 10 in Avocadopulpe.	94
Abbildung 63:	Lineare Regressionsgeraden der während der LC-MS/MS-Analysen gewonnenen Kalibrationspunkte von 1-12 sowie IS.	128
Abbildung 64:	Molekülstruktur von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1).	141
Abbildung 65:	Molekülstruktur von Lactucin (2).	142
Abbildung 66:	Molekülstruktur von 8-Desoxylactucin (3).....	143
Abbildung 67:	Molekülstruktur von 8-Desoxy-11 β ,13-Dihydrolactucin (4).	143
Abbildung 68:	Molekülstruktur von Lactucopicrin (5).....	144
Abbildung 69:	Molekülstruktur von Cichoriosid B (6).....	145
Abbildung 70:	Molekülstruktur von Cichoriensäure (7).....	146
Abbildung 71:	Molekülstruktur von 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-in (1).	147
Abbildung 72:	Molekülstruktur von 1,2,4-Trihydroxyheptadeca-16-en (2).	147
Abbildung 73:	Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-in (3).	148
Abbildung 74:	Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2,4-dihydroxy-n-heptadeca-16-en (4).	149
Abbildung 75:	Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadeca-16-en (5).	149
Abbildung 76:	Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-heptadecan (6). .	150
Abbildung 77:	Molekülstruktur von 1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-n-octadeca-12-en (7).	151
Abbildung 78:	Molekülstruktur von (Z,Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trien (8).	151
Abbildung 79:	Molekülstruktur von (Z,Z)-1-Acetoxy-2,4-dihydroxyheneicosa-12,15-dien (9).	152
Abbildung 80:	Molekülstruktur von (Z,Z)-1-Acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-dien (10).	153
Abbildung 81:	Molekülstruktur von 1-Linoleoylglycerol (11).	154
Abbildung 82:	Molekülstruktur von 1-Stearoylglycerol (12).	155



8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Extraktionsausbeuten und relative Bittergeschmacksintensitäten der Chicorée-Fraktionen A-C	27
Tabelle 2:	Geschmacksqualitäten und Geschmacksverdünnungsfaktoren (GVF) isolierter Subfraktionen B1-B15	29
Tabelle 3:	Geschmacksqualitäten und relative Intensitäten der Bitterkeit isolierter XAD-2®-Eluat-Fraktionen (Methanol/Wasser 0/100-100/0; V/V) der Chicorée-Wasserfraktion	44
Tabelle 4:	Geschmacksqualitäten und Geschmacksverdünnungsfaktoren der HPLC-Fraktionen C5/6-1 bis C5/6-12	46
Tabelle 5:	Schwellenwerte identifizierter Chicorée-Bitterstoffe	56
Tabelle 6:	Schwellenwerte adstringierender Verbindungen in Chicorée	58
Tabelle 7:	Konzentrationen, Bitterschwellenwerte und Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren von Sesquiterpenlactonbitterstoffen in Chicorée-Salatköpfen (Frischgewicht)	64
Tabelle 8:	Konzentrationen identifizierter Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe in gelben Blattspitzen, weißen Blattstücken und im inneren Strunk von Chicorée-Salatköpfen (Frischgewicht).....	65
Tabelle 9:	Konzentrationen (bezogen auf Frischgewichte) und berechnete Dose-over-Threshold-(DoT)-Faktoren von 11 β ,13-Dihydrolactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) in Chicorée-Salat, -Wurzeln, Radicchio Rosso, Zuckerhut, grünem Löwenzahn, gebleichtem Löwenzahn, spanischer und sardinischer Artischocke	69
Tabelle 10:	Geschmacksqualitäten und Geschmacksverdünnungsfaktoren isolierter Fraktionen der Fraktion B erhitzter Avocadopulpe	79
Tabelle 11:	Schwellenwertkonzentrationen für die Bitterkeit der identifizierten Verbindungen	85
Tabelle 12:	Schwellenwertkonzentrationen für Bitterkeit der Monoglyceride und Abkömmlinge	87
Tabelle 13:	Schwellenwertkonzentrationen für den Kokumi-Enhancing-Effekt der identifizierten Verbindungen.....	88
Tabelle 14:	Konzentrationen identifizierter Avocadoinhaltsstoffe und DoT-Faktoren in nativer und erhitzter Avocadopulpe.....	91
Tabelle 15:	Technische Parameter zur massenspektrometrischen Analyse und Retentionszeiten der Sesquiterpenlacton-Bitterstoffe 11 β ,13-Dihydrolactucin (1), Lactucin (2), 8-Desoxylactucin (3), 11 β ,13-Dihydro-8-desoxylactucin (4) und Lactucopicrin (5) in Korbblütlern (Frischgewicht)	117
Tabelle 16:	Detektierte Massenübergänge, MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der identifizierten Inhaltsstoffe der Fraktion B (1-12)	129



9 Literaturverzeichnis

Adikaram, N. K. B.; Ewing, D. F.; Karunaratne, A. M.; Wijeratne, E. M. K. (1992) Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry* 31(1): 93-96.

Alves, H. M.; Coxon, D. T.; Falshaw, C. P.; Godtfredsen, W. O.; Ollis, W. D. (1970) Avocatins. New class of natural products. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 42: 45-48.

Bates, R. P. (1970) Heat-induced off-flavor in avocado flesh. *Journal of Food Science* 35(4): 478-482.

Behrens, M.; Meyerhof, W. (2008) Bitter Taste Sensitivity in Humans and Chimpanzees. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd.

Behrens, M.; Meyerhof, W. (2006) Signaling in the Chemosensory Systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(13): 1501-1509.

Ben-Et, G.; Dolev, A.; Tatarsky, D. (1973) Compounds contributing to heat-induced bitter off-flavor in avocado. *Journal of Food Science* 38(3): 546-547.

Bennett, M. H.; Sessa, R. A.; Lewis, M. J.; Beale, M. H.; Mansfield, J. W. (2001) The identification of novel sesquiterpene lactones from *Lactuca* species. *Advances in Mass Spectrometry* 15: 897-898.

Biermann, U.; Grosch, W. (1979) Bitter-tasting monoglycerides from stored oat flour. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 169(1): 22-26.

Bilger, L. N.; Young, W. Y.; Robbiss, R. C. (1932) Avocado chemical investigations. *Hawaii Agricultural Experiment Station Annual Report 1931*: 14-17.

Bischoff, T. A.; Kelley, C. J.; Karchesy, Y.; Laurantos, M.; Nguyen-Dinh, P.; Arefi, A. G. (2004) Antimalarial activity of Lactucin and Lactuopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 95(2-3): 455-457.

Brockhoff, A.; Behrens, M.; Massarotti, A.; Appendino, G.; Meyerhof, W. (2007) Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 6236-6243.

Brown, B. I. (1972) Isolation of unpleasant flavor compounds in the avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20(4): 753-757.

Brown, B. I. (1973) Qualitative and quantitative estimation by thin-layer and gas chromatography of a series of C17 oxygenated aliphatic compounds in the avocado (*Persea americana*). *Journal of Chromatography* 86(1): 239-245.

Bufe, B.; Hofmann, T.; Krautwurst, D.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. (2002) The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nature Genetics* 32(3): 397-401.

Bull, S. D.; Carman, R. M. (1994) Synthesis of the avocado antifungal (*Z,Z*)-2-Hydroxy-4-oxohexacos-12,15-dien-1-yl acetate. *Australian Journal of Chemistry* 47: 1661-1672.

California Avocado Society, Carpinteria, Kalifornien, USA (2009): <http://www.californiaavocadosociety.org/motherhass.html>; Zugriff am 9.1.2009.

Carman, R. M.; Duffield, A. R. (1995) The isolation of (*R*)-2-Hydroxy-4-oxohexacosan-1-yl acetate from avocado leaves. *Tetrahedron Letters* 36(12): 2119-2120.

Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444(7117): 288-294.

Chkhikvishvili, I. D.; Kharebava, G. I. (2001) Chicoric and chlorogenic acids in plant species from Georgia. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37: 214-217.

Crues, W. V.; Gibson, A.; Brekke, J. (1951) Avocado products experiments. *Canner* 112(2): 11; 112(3): 14.

Degenhardt, A. G.; Hofmann, T. (2010) Bitter-Tasting and Kokumi-Enhancing Molecules in Thermally Processed Avocado (*Persea americana Mill.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(24): 12906-12915.

De Kraker, J.-W.; Franssen, M. C. R.; De Groot, A.; König, W. A.; Bouwmeester, H. J. (1998) (+)-Germacrene A biosynthesis. The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology* 117(4): 1381-1392.

De Kraker, J.-W.; Franssen, M. C. R.; Joerink, M.; De Groot, A.; Bouwmeester, H. J. (2002) Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiology* 129(1): 257-268.

Deng, Y.; Scott, L.; Swanson, D.; Snyder, J. K.; Sari, N.; Dogan, H. (2001) Guaianolide sesquiterpene lactones from *Cichorium intybus* (Asteraceae). *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences* 56(8): 787-796.

Die Zeit. Das Lexikon in 20 Bänden. (2005) Zeitverlag Gerd Brucerius GmbH & Co. KG, Hamburg, Bd. 3: 31; Bd. 16: 101-102.

Domergue, F.; Helms, G. L.; Prusky, D.; Browse, J. (2000) Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54(2): 183-189.

Duncann, G. (2006) Absolutely avocado. Rio Nuevo Publishers, Tucson, Arizona, USA: 8-9.

Dunkel, A.; Köster, J.; Hofmann, T. (2007) Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6712 -6719.

El-Lakany, A. M.; Aboul-Ela, M. A.; Abdul-Ghani, M. M.; Mekky, H. (2004) Chemical constituents and biological activities of *Cichorium intybus L.* *Natural Product Sciences* 10(2): 69-73.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) – Chief, Publishing Management Service, Information Division – Rom, Italien (2005): http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en; Zugriff am 15.1.2009: Codex Standard for Avocado. Codex Stan 197-2005: 1-2.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) – Chief, Electronic Publishing Policy and Support Branch, Communication Division – Rom, Italien (2009): <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>; Zugriff am 8.1.2009.

Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. (2001) Characterization of an intense bitter-tasting 1*H*,4*H*-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 231-238.

Franke, W. (1997) Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Auflage: 218, 222, 280-282.

Frey, U.; Claude, J.; Crelier, S.; Juillerat, M.-A. (2002) UV degradation of sesquiterpene lactones in chicory extract: kinetics and identification of reaction products by HPLC-MS. *Chimia* 56: 292-293.

Friebolin, H. (2006) Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 4. Auflage: 261.

Glabasnia, A. (2007) Molekulare und sensorische Untersuchungen zu geschmacksgebenden Verbindungen in Whiskey sowie von verarbeitungsbedingt gebildeten Ellagtannin-Transformationsprodukten. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Verlag Schöling, Münster: 186-189.

Harrold, E. V. (1931) Avocado preservation and utilization. *Hawaii Agricultural Experiment Station Annual Report 1930*:19-22.

Hashimura, H.; Ueda, C.; Kawabata, J.; Kasai, T. (2001) Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from avocado (*Persea americana* Mill) fruits. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65(7): 1656-58.

Hofshi Foundation, Fallbrook, Kalifornien, USA (2009) <http://www.avocadosource.com/orld.asp>; Zugriff am 7.1.2009.

Holzer, K.; Zinke, A. (1953) Über die Bitterstoffe der Zichorie (*Cichorium intybus* L.). II. Lactucin and lactucopicrin. *Monatshefte fuer Chemie* 84: 901-909.

Hufnagel, J. C.; Hofmann, T. (2008) Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensome-tabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9190-9199.

Kashman, Y.; Neeman, I.; Lifshitz, A. (1969) New compounds from avocado pear. *Tetrahedron* 25: 4617-4631.

Kashman, Y.; Néeman, I.; Lifshitz, A. (1970) New compounds from avocado pear–II. *Tetrahedron* 26: 1943-1953.

Kawagishi, H.; Fukumoto, Y.; Hatakeyama, M.; He, P.; Arimoto, H.; Matsuzawa, T.; Arimoto, Y.; Saganuma, H.; Inakuma, T.; Sugiyama, K. (2001) Liver injury suppressing compounds from avocado (*Persea americana*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2215-2221.

Kim, O. K.; Murakami, A.; Nakamura, Y.; Takeda, N.; Yoshizumi, H.; Ohigashi, H. (2000) Novel Nitric Oxide and Superoxide Generation Inhibitors, Persenone A and B, from Avocado Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5): 1557-1563.

Kim, O. K.; Murakami, A.; Nakamura, Y.; Kim, H. W.; Ohigashi, H. (2000) Inhibition by (-)-persenone A-related compounds of nitric oxide and superoxide generation from inflammatory leukocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64(11): 2500-2503.

Kim, O. K.; Murakami, A.; Takahashi, D.; Nakamura, Y.; Torikai, K.; Kim, H. W.; Ohigashi, H. (2000) An avocado constituent, Persenone A, suppresses expression of inducible forms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in macrophages, and hydrogen peroxide generation in mouse skin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64(11): 2504-2507.

Kisiel, W.; Zielinska, K. (2001) Guaianolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 57(4): 523-527.

Körber-Grohne, U. (1995) Nutzpflanzen in Deutschland. Von der Vorgeschichte bis heute. Das kompetente Nachschlagewerk. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg: 288-289.

Leclercq, E. (1984) Determination of lactucin in roots of chicory (*Cichorium intybus* L.) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 283: 441-444.

Leclercq, E. (1992) Sesquiterpene Lactones and Inulin from Chicory Roots: Extraction, Identification, Enzymatic Release and Sensory Analysis. Dissertation, Landbouwniversiteit Wageningen, NED: 3-129.

Lehari, G.; Teusen, G. (1999) Natürlich fit und schön durch Avocado. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: 10-12, 36-48, 54-56.

Lindemann, B. (2001) Receptors and transduction in taste. In: *Nature* 413(6852): 219-225.

Lu, S. C.; Wu, J. S.-B. (1986) Studies on the Major Bitter Compounds in Canned Avocado Juice. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society* 24(2): 130-136.

LWG (Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau) (2007) ChicoréeKulturanleitung. Bayrische Gartenakademie, Merkblatt 2152, Veitshöchheim: 1-2.

MacLeod, J. K.; Schöffeler, L. (1995) A short enantioselective synthesis of a biologically active compound from *Persea americana*. *Journal of Natural Products* 58(8): 1270-1273.

Mares, D.; Romagnoli, C.; Tosi, B.; Andreotti, E.; Chillemi, G.; Poli, F. (2005) Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals. *Mycopathologia* 160(1): 85-91.

Matissek, R.; Schnepel, F.-M.; Steiner, G. (1992) Lebensmittelanalytik. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2. Auflage: 32-37.

Meyerhof, W. (2005) Elucidation of mammalian bitter taste. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 154: 37-72.

Michl, H.; Hogenauer, G. (1960) Über die chemische Konstitution des Lactucopikrins. *Monatshefte für Chemie* 91: 500-504.

Munk, K. (2001): Grundstudium Biologie: Botanik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 2001: Kapitel 2, 2-4.

Naamani, G. (2007) Developments in Avocado World. *California Avocado Society 2007 Yearbook* 90: 71-76.

-
- Nandagopal, S.; Ranjitha Kumari, B. D. (2007) Phytochemical and Antibacterial Studies of Chicory (*Cichorium intybus* L.) – A Multipurpose Medicinal Plant. *Advances in Biological Research* 1(1-2): 17-21.
- Neeman, L.; Lifshitz, A.; Kashman, Y. (1970) New antibacterial agent isolated from the avocado pear. *Applied Microbiology* 19(3): 470-473.
- Nishimura, K.; Miyase, T.; Ueno, A.; Noro, T.; Kuroyanagi, M.; Fukushima, S. (1986) Sesquiterpene lactones from *Lactuca Laciniata*. *Phytochemistry* 25(10): 2375-2379.
- Oelrichs, P. B.; Ng, J. C.; Seawright, A. A.; Ward, A.; Schäffeler, L.; MacLeod, J. K. (1995) Isolation and identification of a compound from avocado (*Persea americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of the lactating mammary gland and the myocardium. *Natural Toxins* 3: 344-349.
- Popenoe, W. (1920) Manual of Tropical and Subtropical Fruits. Macmillan, London: 524 ff.
- Pozorski, S. G. (1976) Prehistoric subsistence patterns and the site economics in the Moche Valley, Peru. PhD thesis, University of Texas, Austin.
- Price, K. R.; Dupont, M. S.; Shepherd, R.; Fenwick, G. R.; Chan, H. W. S. (1989) Chemical and sensory aspects of exotic salad crops. *Agric., Food Chem. Consum., Proc. Eur. Conf. Food Chem., 5th* 1: 216-220.
- Price, K. R.; DuPont, M. S.; Shepherd, R.; Chan, H. W. S.; Fenwick, G. R. (1990) Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops - colored lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53(2): 185-192.
- Pyrek, J. S. (1985) Sesquiterpene Lactones of *Cichorium intybus* and *Leontodon autumnalis*. *Phytochemistry* 24(1): 186-188.
- Quadt, A.; Schönberger, S.; Schwarz, M. (2009) Statistische Auswertung in der Sensorik. Leitfaden für die Praxis. B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg: 21, 26.
- Ramos, M. del R.; Jerz, G.; Villanueva, S.; Winterhalter, P. (2006) Bioactive lipids from avocado seeds (*Persea americana* Mill., *Lauraceae*) by HSCCC. *Lebensmittelchemie* 60: 84.
- Ren, Y.-L.; Zhou, Y.-W.; Ye, Y.-H. (2003) Structural study on NMR and X-Ray of lactucopicrin – a quaianolide ester. *Structural Chemistry* 14(6): 581-585.
- Rias-Bucher, B. (1998) Exotische Früchte von A-Z. Verlag Weltbild, Augsburg: 25-26, 225.
- Ruban, G.; Zabel, V.; Gensch, K. H.; Smalla, H. (1978) The crystal structure and absolute configuration of lactucin. *Acta Crystallographica, Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 34(4): 1163-1167.
- Savona, G.; Bruno, M. (1982) High resolution NMR of 8-Desoxy-Lactucin. *Journal of Natural Products* 46(2): 277-278.
- Scarpati, M. L.; Oriente, G. (1958) Chicoric acid (Dicaffeoyltartaric acid): Its isolation from chicory (*Cichorium intybus*) and synthesis. *Tetrahedron* 4: 43-48.
- Schäfer, K. (2006) Untersuchung von Bitterstoffen in *Chichorium intybus* L. mittels instrumentell-analytischer und sensorischer Techniken. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie.

Schäffeler, L.; MacLeod, J. K. (1994) A short enantioselective synthesis of an antifungal compound from avocado. Proceedings of the 14th National R. A. C. I. Conference of Organic Chemistry, Woolongong, N. S. W. Australia, July 3-8.

Scharbert S.; Holzmann N.; Hofmann T. (2004) Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3498-3508.

Schenck, G.; Graf, H. (1937) Zur Kenntnis des Lactucariums. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* 275: 36-44.

Scherz, H.; Senser, F. (2000) Food composition and nutrition tables. Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart: 949-950.

Schmiedeberg, O. (1912) History and Experimental Observations on Chicory and Chicory Coffee with Reference to Dietetic and Health Relations. *Archiv fuer Hygiene* 76: 210-244.

Schmitt, A. (1940) Bitter principles in the milky juice of *Lactuca virosa*. IX. The determination of lactucopicrin and lactucin in composites, especially in *Lactuca virosa*. *Botanisches Archiv* 40: 516-559.

Seto, M.; Miyase, T.; Umehara, K.; Ueno, A.; Hirano, Y.; Otani, N. (1988) Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 36(7): 2423-2429.

Smith, C. E. Jr (1966) Archaeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany* 20: 169-175.

Smith, C. E. Jr (1969) Additional notes on pre-conquest avocados in Mexico. *Economic Botany* 23: 135-140.

Sobolev, A. P.; Brosio, E.; Gianferri, R.; Segre, A. L. (2005) Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* 43: 625-638.

Sowka, S.; Hsieh, L.-S.; Krebitz, M.; Akasawa, A.; Martin, B. M.; Starrett, D.; Peterbauer, C. K.; Scheiner, O.; Breiteneder, H. (1998) Identification and cloning of Prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biological Chemistry* 273: 28091-28097.

Stark, T. (2006) Charakterisierung der wertgebenden Geschmacksstoffe von geröstetem Kakao (*Theobroma cacao*) mittels Dekompositions- und Rekonstruktions-Analyse. Dissertation, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Verlag Dr. Hut, München: 22-23, 182-186.

Stark T.; Hofmann T. (2005) Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of *N*-phenylpropenoyl-*L*-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5419-5428.

Storey, W. B.; Bergh, B. O.; Zentmyer, G. A. (1986) The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 127-133.

Sugiyama, T.; Sato, A.; Yamashita, K. (1982) Synthesis of all four stereoisomers of antibacterial component of avocado. *Agricultural and Biological Chemistry* 46(2): 481-485.

Toelstede, S.; Dunkel, A.; Hofmann, T. (2009) A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured gouda cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(4): 1140-1448.

Toelstede, S.; Hofmann, T. (2009) Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogeneration by *Penicillium roquefortii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(9): 3738-3748.

Ueda, Y.; Sakaguchi, M.; Hirayama, K.; Miyajima, R.; Kimizuka, A. (1990) Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agricultural and Biological Chemistry* 54(1): 163-169.

Ueda, Y.; Tsubuku, T.; Miyajima, R. (1994) Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58(1): 108-110.

UN (United Nations), Department of Economic and Social Affairs, Population Division, New York, USA (2009): <http://www.un.org/esa/population/aboutpop.htm>; Zugriff am 15.1.2009.

Universität Hamburg (2009): <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/schaugarten/CichoriumintybusL/CichoriumintybusL.jpg>; Zugriff am 26.1.2009.

Van Beek, T. A.; Maas, P.; King, B. M.; Leclercg, E.; Voragen, A. G. J.; de Groot, A. (1990) Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1035-1038.

Weatherby, L. S.; Sorber, D. G. (1931) Chemical composition of the avocado seed. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* (Washington, D. C.) 23: 1421-1423.

Whiley, A. W.; Schaffer, B.; Wolstenhole, B. N. (2002) The Avocado. Botany, Production and Uses. Centre for Agriculture and Biosciences International, Canberra, AUS: 1-169.

Wolf, H. (1666) Kurzer und Nothwendiger Bericht / Wie bey Itziger geschwinden eingerissenen Pest / sich jeder auff dem Lande / und anderswo da allemahl kein Medicus gegenwertig / durch Göttliche Hulff Praeserviren auch theils curiren könne. Nebst einem Anhang / von der allgemeinen rothen und weissen Ruhr. Wolmeynendlich dem Landvolke und gemeinen Leuthen zum besten in Eyl auff Begehren verfertigt und zusammen getragen. In: Müller, M. (2008) Die Schwarze Kunst im Eichsfeld. Mecke Druck und Verlag, Duderstadt: 72.



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Georg Degenhardt
Geburtsdatum: 30.11.1979
Geburtsort: Heiligenstadt
Religion: römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Hermann Josef Degenhardt
Annette Margarete Degenhardt, geb. Tryba
Geschwister: Mathias Degenhardt
Familienstand: verheiratet mit Katharina Degenhardt, geb. Lorenz
Aktuelle Anschrift: Köln-Aachener Straße 138-140, 50189 Elsdorf

Schulbildung

08/1986 – 07/1990 Polytechnische Oberschule „Ernst Schneller“
in Wüstheuterode
08/1990 – 07/1991 Regelschule Wüstheuterode
08/1991 – 07/1998 Staatliches Gymnasium Heiligenstadt;
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (09.07.1998)

Wehrdienst

09/1998 – 06/1999 1./Panzerartilleriebataillon 2 in Hessisch-Lichtenau

Studium

- 10/1999 – 10/2003 Studium der Lebensmittelchemie (Teil A) an der *Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*; Abschluss: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker (14.10.2003)
- 05/2004 – 11/2004 Studium der Lebensmittelchemie (Teil B) am *Staatlichen Untersuchungsamt Hessen (SUAH)* in Wiesbaden; Abschluss: 2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker (25.11.2004)
- Seit 01.12.2004 „Befähigung als staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker“

Berufstätigkeit

- 10/2002 – 06/2003 Studentisch-wissenschaftlicher Mitarbeiter am *Institut für Botanik* an der *Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*
- 11/2003 – 04/2004 Praktikant der Lebensmittelchemie im *Institut für Oenologie und Getränkeforschung, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung* an der *Forschungsanstalt Geisenheim*
- 02/2005 – 09/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am *Institut für Lebensmittelchemie* der *Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*
- 10/2007 – 05/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am *Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik* an der *Technischen Universität München*
- 06/2008 – 12/2009 „Post-Doktorand“ am *Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik* an der *Technischen Universität München*
- Seit 02/2010 Wissenschaftlicher Angestellter im Unternehmen der Zuckerindustrie *Pfeifer & Langen KG*, Abteilung *Entwicklung/ Technologie/ Analytik*, Dienstsitz in Elsdorf (Rheinland)

Gesellschaftliche und soziale Engagements

Seit 27.01.1980:

Mitglied der Gemeinde „Sankt Bonifatius“ Wüstheuterode.

Seit 12.07.1996:

Aktives Mitglied der *Freiwilligen Feuerwehr Wüstheuterode* (gegenwärtige/r Dienstgrad/Dienststellung: Löschmeister/Gruppenführer); seit 16.01.2009 *Schriftführer und Pressewart* im örtlichen Feuerwehrverein „*Freiwillige Feuerwehr Wüstheuterode e. V.*“.

Seit 08.03.2007:

Aktives Mitglied im „*Verein für Eichsfeldische Heimatkunde e. V.*“.

Seit 06.06.2008:

Mitglied der „*Landesarbeitsgemeinschaft Feuerwehrhistorik Thüringen*“.

Seit 01.11.2008:

Bestellter Ortschronist der Gemeinde Wüstheuterode (Landkreis Eichsfeld, Thüringen).

Mitgliedschaften in Berufsinteressenverbänden

Seit 27.04.2005:

Gesellschaft Deutscher Chemiker e. V. (GDCh) / German Chemical Society – Fachgruppe Lebensmittelchemische Gesellschaft (LChG)

Seit 19.05.2010:

The International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA) – Deutsches Nationalkomitee der Internationalen Kommission für einheitliche Methoden der Zuckeruntersuchung e. V. (DNK-ICUMSA)

Seit 29.06.2011:

Verein Deutscher Zuckertechniker (VDZ)