TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik

Studien zur Struktur, Bildung und sensorischen Aktivität von Polyphenol-Thermolyseprodukten: Ein Beitrag zur Identifizierung unbekannter Bitterstoffe in Röstkaffee

Stefanie Kreppenhofer

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. P. Schieberle

Diese Dissertation wurde am 23.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.07.2012 angenommen.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Hofmann für die Überlassung des interessanten Themas und für die sehr gute Zusammenarbeit. Vielen Dank für die vielen wertvollen Anregungen und die gute wissenschaftliche Betreuung.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis in Freising für die gute Zusammenarbeit und die tolle Zeit. Mein besonderer Dank gilt hierbei meinen Laborkollegen Andy Daschner, Sofie Lösch, Hedda Hillmann, Christof Kunert, Barbara Süß, Dr. Oliver Frank, Dr. Timo Stark und Matthias Bader für die vielen gemeinsam Stunden im Labor mit dem guten Arbeitsklima.

Beim NMR-Team und besonders bei Dr. Oliver Frank bedanke ich mich für die zuverlässige Messung zahlreicher NMRs und die Diskussionen bei der Auswertung der Spektren. Dem MS-Team und hier speziell Dr. Timo Stark und Dr. Daniel Intelmann danke ich für die super gute Zusammenarbeit und das geteilte Wissen.

Vielen vielen Dank liebes Sensorikpanel für die zuverlässige Teilnahme an all den durchgeführten Sensoriken. Liebe Arbeitsbesprechungsgruppen Euch danke ich für die vielen Diskussionen und Anregungen auch außerhalb der Besprechungstermine.

Ein super großes Dankeschön an das Korrekturleseteam Dr. Gesa Haseleu, Kerstin Wenker, Eva Hanke, Dr. Alexander Eilfeld, Walter Kreppenhofer und Christina Schmidt für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit und das gewissenhafte Fehlersuchen.

Danke an Christina Schmidt und Barbara Süß, dass wir uns vom ersten Tag unserer Promotion an so gut verstanden haben. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Gesa Haseleu, Caroline Hellfritsch, Daniel Festring und Dr. Daniel Intelmann für die vielen gemeinsamen Ausflüge und gemütlich verbrachten Abende.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Promotion immer unterstützt haben. Danke, dass Ihr an mich geglaubt und mich immer wieder motiviert habt weiter zu machen.

Vorbemerkungen

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2007 bis August 2010 am Institut für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann durchgeführt.

Auszüge dieser Arbeit wurden in einer international anerkannten Zeitschrift veröffentlicht.

Veröffentlichung

Kreppenhofer, S.; Frank, O.; Hofmann, T. Identification of (furan-2-yl)methylated benzene diols and triols as a novel class of bitter compounds in roasted coffee, *Food Chem.* **2010**, *126*, 441-449.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kaffee	1
1.1.1	Zusammensetzung von Rohkaffee	4
1.1.2	Stoffliche Veränderungen beim Rösten unter Bildung von Geruchs- und	
	Geschmacksstoffen	7
1.1.2.1	Bildung flüchtiger Substanzen und Aromastoffe	7
1.1.2.2	Thermischer Abbau von Chlorogensäuren und die Bildung von Bitterstoffen	9
1.1.2.3	Bisherige Erkenntnisse zu Bitterstoffen im Kaffeegetränk	14
1.2	Ziel der Untersuchungen	17
2	Ergebnisse	18
2.1	Struktur und Bildung von Bitterstoffen aus Di- und Trihydroxybenzolen	
	in Röstkaffee	18
2.1.1	Reaktionen von Di- und Trihydroxybenzolen mit Furfurylalkohol	19
2.1.1.1	Reaktion von Catechol mit Furfurylalkohol	19
2.1.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Reaktion weiterer Di- und	
	Trihydroxybenzole mit Furfurylalkohol	22
2.1.2	Reaktionsprodukte aus Di- und Trihydroxybenzolen und Furfural	28
2.1.3	Reaktionsprodukte aus Di- und Trihydroxybenzolen und 5-Hydroxymethyl-	
		31
2.1.4	Geschmacksschwellenwerte der Rostbitterstoffe	34
2.1.5	Identifizierung und Quantifizierung bitterer Polyphenol-Thermolyse-	~ ~
	produkte in Rostkaffee	36
2.1.5.1	Analytische Bestimmung von Bitterstoffen und deren Vorstufen	39
2.1.6	Diskussion	53
2.2	Struktur und Bildung von Bitterstoffen aus Polyphenol/ Kohlenhydrat-	
	Reaktionen	59
2.2.1	Identifizierung von Polyphenol/Kohlenhydrat-Reaktionsprodukten	59
2.2.2	Studien zur Bildung der 8-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on-Reaktions-	
	produkte	62
2.2.3	Sensorische Evaluierung der 8-Oxabicyclo[3.2.1]-oct-3-en-2-on-Derivate	71
2.2.4	Identifizierung und Quantifizierung bitterer 8-Oxabicyclo[3.2.1]-oct-3-en-2-	
	on-Derivate in Röstkaffee	73
2.2.5	Diskussion	79

3	Experimenteller Teil 82
3.1	Reagenzien und Materialien82
3.2	Untersuchungsmaterial
3.3	Reaktionen von Hydroxybenzolen mit Furanmolekülen
3.3.1	Röstexperimente der binären Mischungen von Catechol und Furfuryl-
	alkohol
3.3.2	Modellreaktionen mit binären Mischungen aus Di- und Trihydroxybenzolen
	und Furanderivaten
3.3.2.1	Einfluss des Lösungsmittels auf die Generierung von Reaktionsprodukten 87
3.3.2.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Generierung von Reaktionsprodukten
3.3.2.3	Einfluss der Erhitzungsdauer auf die Generierung von Reaktionsprodukten 87
3.3.2.4	Einfluss des molaren Verhältnisses der binären Mischungen auf die
	Generierung von Reaktionsprodukten87
3.3.3	Präparative Ansätze zur Isolierung der generierten Reaktionsprodukte
3.3.4	Synthese von isotopenmarkierten Standards aus Catechol und Pyrogallol
	mit Furfurylalkohol
3.3.4.1	[² H ₂]-Furfurylalkohol93
3.3.4.2	Synthese der isotopenmarkierten Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate 94
3.4	Synthese von Hydroxyzimtsäure-Maillard-Reaktionsprodukten
3.4.1	Identifizierung von Reaktionsprodukten in Modellreaktionen
3.4.2	Optimierung der Modellröstansätze96
3.4.2.1	Einfluss der Temperatur auf die Generierung von Reaktionsprodukten97
3.4.2.2	Einfluss des Phenols auf die Generierung von Reaktionsprodukten
3.4.2.3	Einfluss des Kohlenhydrates auf die Generierung von Reaktionsprodukten97
3.4.2.4	Einfluss der Aminosäure auf die Generierung von Reaktionsprodukten
3.4.3	Präparative Ansätze zur Isolierung der generierten Reaktionsprodukte
3.4.4	Synthese des "Carbon Bond Labeling" (CBL)-Standards
3.4.5	Synthese des ¹³ C-markierten Standards der endo- und exo-8-
	Oxabicyclo[3.2.1][¹³ C ₆]oct-3-en-2-on-Reaktionsprodukte
3.5	Quantitative Analytik 103
3.5.1	Quantifizierung der Furan-2-ylmethylhydroxybenzole in Kaffee
3.5.2	Quantifizierung der Hydroxybenzole in Kaffee 105
3.5.3	Quantifizierung der Furanderivate in Kaffee107
3.5.4	Quantifizierung der Hydroxyzimtsäure-Maillard-Reaktionsprodukte in
	Modellansätzen
3.5.5	Quantifizierung der Hydroxyzimtsäure-Maillard-Reaktionsprodukte in Kaffee 110

3.6	Sensorische Analyse	112
3.6.1	Schulung des Sensorikpanels	112
3.6.2	Schwellenwertbestimmung	113
3.6.3	Half-Mouth Test	113
3.7	Chromatographische Methoden	114
3.7.1	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	114
3.7.1.1	Analytische HPLC – UV/Vis-Detektion	114
3.7.1.2	Preparative HPLC – UV/Vis-Detektion	115
3.7.1.3	HPLC – Tandem Massenspektrometer (HPLC-MS)	115
3.7.1.4	HPLC Säulen	115
3.7.2	Middle Pressure Liquid Chromatography (MPLC)	116
3.8	Spektroskopische Methoden	116
3.8.1	UV/Vis-Spektroskopie	116
3.8.2	HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	116
3.8.3	Hochaufgelöste Massenspektrometrie	117
3.8.4	Kernresonanzspektroskopie	117
3.8.4.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	117
3.8.4.2	¹³ C-NMR-Spektroskopie	118
3.8.4.3	gradient selected ¹ H- ¹ H-Verschiebungskorrelation (gs-COSY)	118
3.8.4.4	gradient selected heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (gs-	
	HMQC)	118
3.8.4.5	gradient selected heteronukleare inverse Long-Range-	
	Verschiebungskorrelation (gs-HMBC)	119
3.8.4.6	¹³ C, ¹³ C-INADEQUATE-NMR	119
4	Zusammenfassung	120
5	Literaturverzeichnis	123
6	Anhang	132

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μA	Micro Ampere
5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural
amu	Atomic Mass Unit
APCI	Atmospheric Pressure Ionisiation
Asn	L-Asparagin
Asp	L-Asparaginsäure
CBL	Carbon Bond Labeling
CE	Collision Energy
CFQA	Caffeoylferuloylchinasäure
CoCQA	p-Cumaroylchinasäure
COSY	Correlated Spectroscopy
CPD	Composite Pulse Decoupling
CQA	Caffeoylchinasäure
CXP	Cell Exit Potential
Cys	L-Cystein
d	Dublett
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
diCQA	Dicaffeoylchinasäure
DP	Declustering Potential
dt	Dublett vom Triplett
ESI	Electrospray Ionisation
FQA	Feruloylchinasäure
Gly	Glycin
gs	Gradient Selected
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
Hz	Hertz
i.d.	Innendurchmesser

INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment				
lle	L-Isoleucin				
IS	Interner Standard				
Leu	L-Leucin				
LC	Liquid Chromatography				
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry				
Lys	L-Lysin				
m	Multiplett				
MeOD	Deuteriertes Methanol				
MeOH	Methanol				
MHz	Mega Hertz				
MPLC	Middle Pressure Liquid Chromatography				
MRM	Multiple Reaction Monitoring				
MS	Mass Spectrometry				
n.d.	nicht detektiert				
NMR	Nuclear Magnetic Resonance				
Pro	L-Prolin				
Phe	L-Phenylalanin				
рр	Polypropylen				
ppm	Parts Per Million				
psi	Pound-force Per Square Inch				
pt	Pseudotriplett				
RP	Reversed Phase				
S	Singulett				
SKT	Skalenteile (Einheit zur Angabe der Farbe oder Helligkeit von Kaffee-				
	bohnen)				
t	Triplett				
TMS	Tetramethylsilan				
TOF	Time of Flight				
Val	L-Valin				
UV/Vis	Ultraviolett/Visible-Spectroscopy				
V	Volt				

Symbole

δ	Chemische Verschiebung [ppm]
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
J	Kopplungskonstante [Hz]
λ	Wellenlänge [nm]

1 Einleitung

1.1 Kaffee

Die ersten Erwähnungen eines Kaffeegetränkes stammen aus dem 9. Jahrhundert aus der äthiopischen Region Kaffa. Von dort gelangte die Rezeptur im 14. Jahrhundert anscheinend durch Sklavenhändler nach Arabien und verbreitete sich von dort aus weltweit. Ab dem 17. Jahrhundert war das Kaffeegetränk auch in Europa bekannt. Die ersten Kaffeehäuser wurden 1645 in Venedig, 1650 in Oxford und 1652 in London eröffnet. Das erste deutsche Kaffeehaus stand 1673 in Bremen.

Heute ist Kaffee nach Wasser das in Deutschland am häufigsten konsumierte Getränk. Mit 150 Litern pro Bundesbürger verzeichnete der Deutsche Kaffeeverband 2009 einen Zuwachs von 2 % gegenüber dem Vorjahr. Insgesamt wurden in den Jahren 2008/2009 38 Mio. Sack Kaffee à 60 kg in allen Verarbeitungsstufen in die EU-Länder importiert; davon allein 8 Mio. Sack nach Deutschland. Die Hauptursprungsländer der Rohkaffee-Einfuhren nach Deutschland waren 2009 Brasilien (312 Mio. kg), Vietnam (171 Mio. kg) und Indonesien (92 Mio. kg) (*Deutscher Kaffeeverband e.V., 2010*).

Die Definition der International Coffee Organization (*International Coffee Agreement, 2001*) besagt, dass Kaffee die Bohnen und Kirschen des Kaffeebaumes sind, ob mit Pergamenthäutchen, grün oder geröstet. Außerdem beinhaltet diese Definition gemahlenen, entkoffeinierten, flüssigen und löslichen Kaffee.

Der Kaffeebaum gehört botanisch zu der Gattung Coffea aus der Familie der *Rubiaceae* (Rötegewächse). Es sind etwa 80 Coffea Arten bekannt, wobei lediglich die Arten *Coffea arabica* und *Coffea canephora* von wirtschaftlicher Bedeutung sind. Die Coffea Bäume werden durch ständigen Rückschnitt als Sträucher mit bis zu 4 m Höhe angebaut, um eine einfachere Ernte zu ermöglichen. Die roten Steinfrüchte wachsen aus den weißen Blüten, dabei ist die Reifedauer der Früchte abhängig von der jeweiligen Gattung. *Coffea arabica* Früchte brauchen 6 - 8 Monate und die der Gattung *Coffea canephora* bis zu 11 Monate zur Reifung. Die Kaffeebohnen wachsen im Inneren der Kaffeekirsche und sind von einem sogenannten Silberhäutchen und einem Pergamenthäutchen umgeben (**Abbildung 1**). Die maximalen Ernteerträge von 0,5 bis 1 kg pro Jahr werden von den Sträuchern in einem Alter von 3 - 20 Jahren erreicht.



Abbildung 1: Schnitt durch die Kaffeefrucht (nach Vitzthum et al., 1976).

Die Ernte der Kaffeekirschen geschieht heutzutage mittels zwei verschiedener Methoden. Die aufwendige Handlese, die meist für die hochwertigen Arabica-Kaffees erfolgt, liefert ein qualitativ erstklassiges Produkt, da nur die reifen Früchte gepflückt werden. Bei der sogenannten "Strip-Pflückung" werden in einem Vorgang alle Kirschen von den Zweigen gestreift und somit eine Mischung aus reifen und unreifen Früchten geerntet. Diese Methode wird vor allem für Robusta-Kaffeekirschen sowie für brasilianische und äthiopische Arabica-Kaffeekirschen verwendet, die bedingt durch diese Erntetechnik eine verminderte Qualität besitzen.

Nach der Ernte folgt die Behandlung der Kaffeekirschen entweder nach dem "trockenen" oder dem "nassen" Aufarbeitungsverfahren (**Abbildung 2**). Ziel der Behandlung ist in jedem Fall die Entfernung der Fruchthaut, des Fruchtfleisches, sowie der Pergamenthülle und des Silberhäutchens. Bei der Trockenaufarbeitung werden die Kaffeefrüchte ausgebreitet und unter Wenden luftgetrocknet. Hingegen werden bei der Nassaufbereitung die Früchte zunächst von der Fruchthaut und dem Fruchtfleisch befreit. Nach anschließender Fermentation werden die Bohnen gewaschen und ebenfalls getrocknet. Die Trocknung erfolgt in beiden Fällen bis zu einer Restfeuchte von ca. 12 %.



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nass- und Trockenaufarbeitung der Kaffeekirschen.

Die grünen Rohkaffeebohnen verfügen über einen wenig attraktiven Geschmack und über ein erbsenartiges Aroma. Um das typische schweflig-röstige, erdige und rauchig-phenolische Kaffeearoma, sowie den angenehm bitteren Geschmack bei den Bohnen zu erreichen, erfolgt im Anschluss an das Trocknen die Röstung der grünen Bohnen. Die Rösttemperatur, welche typischerweise zwischen 200 und 250 °C liegt, sowie die Röstdauer von 5 bis 20 min, sind die beiden Hauptparameter, die den Kaffeegeschmack, das Aroma und die Farbe der Kaffeebohnen primär beeinflussen.

Die Röstung der Bohnen kann in vier Hauptphasen unterteilt werden (**Abbildung 3**). Die Trocknungsphase startet bei 50 bis 100 °C, einhergehend mit einer Wasserverdampfung und ablaufender *Maillard*-Reaktion zwischen Kohlenhydraten und Aminosäuren, was zum Beginn der Bräunung führt. In der Entwicklungsphase, bei ca. 150 °C, bilden sich gasförmige Reaktionsprodukte wie Wasserdampf, Kohlenmonoxid und Kohlendioxid, wodurch es zu einer Volumenvergrößerung der Bohne kommt. In der Zersetzungsphase, welche in einem Temperaturbereich von 180 - 200 °C liegt, platzen die Bohnen auf und es bildet sich das typische Kaffeearoma. Als letzte Phase folgt die Vollröstung bei 200 – 230 °C, bei der die Bohnen die optimale Farbe erhalten, und die Karamellisierung stattfindet. Im Stadium der Vollröstung haben die Bohnen noch einen Restwassergehalt von 1,5 bis 3,5 %.

3



Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Röstphasen der Kaffeebohnen während des Röstprozesses.

1.1.1 Zusammensetzung von Rohkaffee

Die Zusammensetzung von Rohkaffee ist stark von Sorte, Herkunft, Gewinnung und klimatischen Einflüssen abhängig (*Alonso-Salces et al., 2009*). Die Hauptinhaltsstoffe der rohen Kaffeebohne sind unlösliche Polysaccharide, lösliche Kohlenhydrate, organische Säuren, Polyphenole, Lipide, freie Aminosäuren und die Alkaloide Koffein und Trigonellin. In **Tabelle 1** sind die Unterschiede zwischen einem Arabica- und einem Robusta-Kaffee aufgeführt.

Das dominierende Kohlenhydrat in Kaffee ist die Saccharose, mit Konzentrationen von bis zu 9 % der Trockenmasse. Die Bohnen der Arabica-Varietät weisen signifikant höhere Konzentrationen an Saccharose auf (bis zu 9 %) als die Bohnen der Robusta-Varietät (4 % Saccharose) (*Murkovic und Derler, 2006, Clark, 2003*). Bei der Betrachtung der Aminosäuren stellt sich ein anderes Bild dar. Die meisten Aminosäuren liegen in den Robusta-Kaffeesorten in höheren Konzentrationen vor als in Arabica-Kaffee. Hier sticht besonders die Aminosäure Asparagin hervor, die in Robusta-Kaffee weitaus höhere Konzentrationen aufweist als in Arabica-Kaffee. Die dominierenden Aminosäuren in beiden Kaffeesorten sind Alanin, Asparagin, Phenylalanin, sowie Isoleucin, Valin, Serin und Glutaminsäure. Die Aminosäuren, die in Kaffee in nur sehr geringen Konzentrationen vorkommen, sind hingegen Glutamin, Histidin, Prolin, Tyrosin, Methionin und Lysin. Die einzige Aminosäure, die in Arabica-Kaffee eine höhere Konzentration aufweist als in Robusta-Kaffee, ist das Prolin (*Murkovic und Derler, 2006*).

Bestandteil	Arabica [%] ^{a,b}	Robusta [%] ^{a,b}
Lösliche Kohlenhydrate	9 - 12,5	6 - 11,5
Monosaccharide	0,2 - 0,2	0,2 - 0,5
Oligosaccharide	6 - 9	3 - 7
Polysaccharide	3 - 4	3 - 4
Unlösliche Polysaccharide	46 - 53	34 - 44
Hemicellulosen	5 - 10	3 - 4
Cellulose	41 - 43	32 - 40
Säuren und Phenole		
Flüchtige Säuren	0,1	0,1
Nichtflüchtige Säuren	2 - 2,9	1,3 - 2,2
Chlorogensäuren ^c	6,7 - 9,2	7,1 - 12,1
Lignin	1 - 3	1 - 3
Lipide	15 - 18	8 - 12
Wachs	0,2 - 0,3	0,2 - 0,3
Öl	7,7 - 17,7	7,7 - 17,7
N-Verbindungen	11 - 15	11 - 15
Freie Aminosäuren	0,2 - 0,8	0,2 - 0,8
Proteine	8,5 - 12	8,5 - 12
Koffein	0,8 - 1,4	1,7 - 4
Trigonellin	0,6 - 1,2	0,3 - 0,9
Mineralstoffe	3 - 5,4	3 - 5,4

^a Werte in % der Trockenmasse, ^b Wassergehalt des Rohkaffees: 7 - 13 %, ^c Hauptkomponente 5-Caffeoylchinasäure (Chlorogensäure: Arabica 3,0 - 5,6 %; Robusta 4,4 - 6,6 %).

Die Chlorogensäuren, die mit 6 – 10 % der Trockenmasse in grünen Kaffeebohnen vorkommen, stellen eine heterogene Substanzgruppe dar (*Clifford, 1979, Clifford und Kellard, 1989*). Das Grundgerüst der Chlorogensäuren bildet die Chinasäure (**4**), welche mit Kaffeesäure (**1**), Ferulasäure (**2**) oder *p*-Cumarsäure (**3**) verestert ist. So entstehen insgesamt 15 Isomere, die in fünf Gruppen unterteilt werden können: Caffeoylchinasäuren (CQA) (**5** - **7**), Dicaffeoylchinasäuren (diCQA) (**14** - **16**), Feruloylchinasäuren (FQA) (**8** - **10**), *p*-Cumaroylchinasäuren (CoCQA) (**11** - **13**) und letztlich die Caffeoylferuloylchinasäuren (CFQA) (**17** - **19**) (**Abbildung 4**). Die CQAs dominieren mengenmäßig mit 66 % in Arabica-und 56 % in Robusta-Kaffee im Anteil der totalen Chlorogensäuren. Bei beiden Kaffeesorten fallen ca. 75 % auf die 5-Isomere (*Van der Stegen und Van Duijn, 1980, Trugo und Macrae, 1984*).



Chlorogensäure-Derivate	Abkürzung	R ³	R^4	R⁵	Nummerierung
3-O-Caffeoylchinasäure	3-CQA	1	Н	Н	5
4-O-Caffeoylchinasäure	4-CQA	Н	1	Н	6
5-O-Caffeoylchinasäure	5-CQA	Н	Н	1	7
3-O-Feruloylchinasäure	3-FQA	2	Н	Н	8
4-O-Feruloylchinasäure	4-FQA	Н	2	Н	9
5-O-Feruloylchinasäure	5-FQA	Н	Н	2	10
3-0-p-Cumaroylchinasäure	3-CoCQA	3	Н	Н	11
4-O-p-Cumaroylchinasäure	4-CoCQA	Н	3	Н	12
5-O-p-Cumaroylchinasäure	5-CoCQA	Н	Н	3	13
3,4-di-O-Caffeoylchinasäure	3,4-diCQA	1	1	Н	14
3,5-di-O-Caffeoylchinasäure	3,5-diCQA	1	Н	1	15
4,5-di-O-Caffeoylchinasäure	4,5-diCQA	Н	1	1	16
3,4-O-Caffeoylferuloylchinasäure	3,4-CFQA	1	2	Н	17
3,5-O-Caffeoylferuloylchinasäure	3,5-CFQA	1	Н	2	18
4,5-O-Caffeoylferuloylchinasäure	4,5-CFQA	Н	1	2	19

Abbildung 4: Strukturen der Chlorogensäuren 5-19, und der Bausteine Chinasäure (4), Kaffeesäure (1), Ferulasäure (2) und *p*-Cumarsäure (3).

In der Gruppe der Alkaloide sind besonders das Koffein und das Trigonellin zu nennen. Koffein stellt den mengenmäßig wichtigsten Vertreter der bitteren Alkaloide im Kaffee dar und kommt mit 1 - 2,5 % in der grünen Bohne vor. Diese Gehalte bleiben während der Röstung recht stabil, so dass die gerösteten Bohnen noch 1 – 2 % Koffein enthalten.

Das Koffein wird als Ursache der anregenden Wirkung des Kaffees angesehen. Darüber hinaus wird dieser Substanz ein Beitrag zur Gesamtbitterkeit eines Kaffeegetränkes zugeschrieben (*Chen, 1979*).

OR³

Das Trigonellin variiert mit Gehalten von 0,3 - 1,2 % der Trockenmasse in der rohen Kaffeebohne (*Stennert und Maier, 1994*). Im Gegensatz zum Koffein wird Trigonellin während des Röstprozesses stark abgebaut und bildet eine große Anzahl an flüchtigen und nichtflüchtigen Reaktionsprodukten (*Viani und Horman, 1974*).

1.1.2 Stoffliche Veränderungen beim Rösten unter Bildung von Geruchs- und Geschmacksstoffen

Erst durch den Prozessschritt des Röstens wird aus den grünen Bohnen, welche ein erbsenartiges Aroma und einen heuartigen Geschmack aufweisen, das von vielen Konsumenten geliebte Genussmittel, welches ein ausgeglichenes Aromaprofil und einen angenehmen bitteren Geschmack zeigt. Die *Maillard*-Reaktion und der Strecker-Abbau sowie eine Vielzahl an chemischen Umwandlungen, wie zum Beispiel die Thermolyse von Polyphenolen und Alkaloiden, werden in der Literatur als Ursache der Aroma- und Bitterstoffbildung diskutiert.

1.1.2.1 Bildung flüchtiger Substanzen und Aromastoffe

Reichstein und Staudinger untersuchten schon vor 90 Jahren aromaaktive Substanzen in geröstetem Kaffee und identifizierten dabei 29 flüchtige Substanzen. Heute ist die Anzahl der bekannten Aromastoffe in Kaffee auf über 850 angestiegen (*Flament, 2002*), wobei gezeigt wurde, dass nur ca. 25 Odorantien benötigt werden, um das typische Aroma eines Kaffeegetränkes zu simulieren (*Semmelroch et al., 1995, 1996 und Mayer et al., 2000*). Zu diesen Schlüsselaromastoffen, deren Konzentrationen in Kaffee oberhalb der Geruchsschwellen vorliegen, gehören das 2,3-Butandion (**20**) (butterartig), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (**21**) (karamellartig) und Vanillin (**22**) (vanilleartig), verschiedene erdig riechende Pyrazine (**23** - **25**), das schweflig-röstartig riechende Furfurylthiol (**26**), das schwefelartig riechende Methional (**27**), sowie die rauchigen phenolischen Verbindungen Guajakol (**29**), (Abbildung 5).



Abbildung 5: Strukturen wichtiger Aromastoffe des Kaffees (*Grosch, 1996*). 2,3-Butandion (20), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (21), Vanillin (22), 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin (23), 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin (24), 2-Isobutyl-3-methoxypyrazin (25), Furfurylthiol (26), Methional (27), (E)-β-Damascenon (28), Guajakol (29), 4-Ethylguajakol (30) und 4-Vinylguajakol (31).

In einer Arbeit von *Moon und Shibamoto (2009)* wurden neben diesen oben genannten Schlüsselaromastoffen Furfurylalkohol (**32**), Furfural (**33**) und 5-Hydroxymethylfurfural (**34**) (**Abbildung 6**) als majore Verbindungen in der flüchtigen Fraktion von Kaffee identifiziert. Die Gehalte dieser Furanderivate hingen stark vom Röstgrad der untersuchten Proben ab. In schwach gerösteten Proben wurden relativ hohe Konzentrationen der Furane detektiert, welche mit zunehmendem Röstgrad abnahmen.



Abbildung 6: Struktur der Furanderivate Furfurylalkohol (32), Furfural (33) und 5-Hydroxymethylfurfural (34).

1.1.2.2 Thermischer Abbau von Chlorogensäuren und die Bildung von Bitterstoffen

Der Prozessschritt des Röstens reduziert den Chlorogensäuregehalt um bis zu 60 % in leicht gerösteten und bis zu 100 % in stark gerösteten Kaffeeproben (*Trugo und Macrae, 1984*). Hierbei gibt es Unterschiede in den Abbauraten der einzelnen Isomere. Die Gehalte an 5-*O*-Caffeoylchinasäure (**7**) nehmen stets stärker ab als die der 3- und 4-Isomere (**5**, **6**), welche sogar in ihren Konzentrationen leicht ansteigen können. Diese Zunahme kann abhängig vom Röstgrad durch den Abbau der Di-Caffeoylchinasäuren oder durch thermische Umlagerungen von 3-CQA (**5**) in 4-CQA (**6**) oder von 5-CQA (**7**) in 4- oder 3-CQA (**5**, **6**) erklärt werden (*Farah et al., 2005*).

Als Abbauprodukte der Chlorogensäuren wurden die Chlorogensäurelaktone identifiziert, die durch Dehydratation und intramolekulare Veresterung aus den Chlorogensäuren 3-CQA (5). 4-CQA (6) und 5-CQA (7) entstehen. Es bilden sich die korrespondierenden Laktone 5-O-Caffeoyl-*muco*- γ -chinid (**35**), 3-O-Caffeoyl- γ -chinid (**36**), 4-O-Caffeoyl-*muco*- γ -chinid (**37**), 5-O-Caffeoyl-epi- δ -chinid (38), 4-O-Caffeoyl- γ -chinid (39) und 3-O-Caffeoyl-epi- δ -chinid (40). In der gleichen Weise werden die Verbindungen 3,4-O-Dicaffeoyl-y-chinid (41), 3,5-O-Dicaffeoyl-*epi*-*δ*-chinid (42) und 4,5-O-Dicaffeoyl-muco-y-chinid (43) aus den O-di-Caffeoylchinasäuren gebildet (Bennat et al., 1994, Farah et al., 2005, Stadler et al., 1996) (Abbildung 7). Diesen Laktonen wurde von Frank et al. (2006 und 2008) eine Schlüsselrolle für den angenehmen bitteren Geschmack von Kaffee zugeordnet.



Abbildung 7: Chemische Strukturen der bitteren Caffeoylchinasäurelaktone 5-O-Caffeoylmuco- γ -chinid (35), 3-O-Caffeoyl- γ -chinid (36), 4-O-Caffeoyl-muco- γ -chinid (37), 5-O-Caffeoylepi- δ -chinid (38), 4-O-Caffeoyl- γ -chinid (39), 3-O-Caffeoyl-epi- γ -chinid (40), 3,4-O-Dicaffeoyl- γ chinid (41), 3,5-O-Dicaffeoyl-epi- δ -chinid (42) und 4,5-O-Dicaffeoyl-muco- γ -chinid (43).

Quantitative Studien ergaben, dass die Gehalte dieser bitteren Laktone nach Durchlaufen eines Maximums mit zunehmendem Röstgrad wieder abnehmen. Da trotz der Abnahme dieser Laktone die Bitterkeit des Kaffees mit zunehmendem Röstgrad zunimmt, sollten weitere Bitterstoffe das Geschmacksprofil stark gerösteten Kaffees prägen. Modellversuche an Chlorogensäurelaktonen (*Hofmann, persönliche Mitteilung*), 5-O-Caffeoylchinasäure (**7**) bzw. Kaffeesäure (**1**) (*Frank et al., 2007*) ergaben die Bildung bitterer Phenylindane als geschmacksaktive Folgeprodukte des aus dem Caffeoyl-Rest freigesetzten Intermediates 4-Vinylcatechol (**44**) (**Abbildung 8**). Folgestudien beschreiben eine Abhängigkeit der Bildung der Phenylindane im Kaffee vom Röstgrad der Bohnen (*Blumberg et al., 2010*). Sensorische Untersuchungen ergaben dabei eine weniger angenehme Bitterkeit, die auch als überröstet und harsch beschrieben wird, und charakteristisch für stark gerösteten Espresso ist.



Abbildung 8: Reaktionsmechanismus zur Bildung der Phenylindane aus 5-O-Caffeoylchinasäure (7) bzw. Kaffeesäure (1) über 4-Vinylcatechol (44) als Schlüsselintermediat (*Frank et al., 2007*). *Trans*-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (45), *cis*-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (46), *trans*-1,3-Bis(3´,4´-dihydroxyphenyl)-1-buten (47), 1,3-Bis(3´,4´-dihydroxyphenyl)butan (48), *trans*-4,5-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (49), *cis*-4,5-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (50), *trans*-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-[3´,4´-dihydroxy-5´-(1-(3´´,4´´-dihydroxyphenyl)-1-ethyl)phenyl] indan (51), *cis*-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-[3´,4´-dihydroxy-5´-(1-(3´´,4´´-dihydroxyphenyl)-1-ethyl)-phenyl]indan (52), 5,6-Dihydroxy-1-methyl-2-[1-(3´,4´-dihydroxyphenyl)-1-ethyl]-3-(3´´,4´´-dihydroxyphenyl)indan (53).

Einleitung

Während des Röstprozesses läuft neben einer Laktonisierung und einem Abbau unter Bildung von Phenylindanen auch eine thermische Zersetzung der Chlorogensäuren unter Formation diverser Mono-, Di- und Trihydroxybenzole ab (**Abbildung 9**) (*Högel, 1958, Tressl et al., 1978. Clifford, 1979, Lang et al., 2006*). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Hydroxybenzole Pyrogallol (**54**), Hydroxyhydrochinon (**55**) und Catechol (**56**) aus dem Chinasäure-Grundgerüst der 5-CQA (**7**) gebildet werden. Hingegen entstehen die ethylierten und methylierten Catechole (**57-59**) sowie das 4-Vinylcatechol (**44**) (*Hofmann, T., persönliche Mitteilung*) aus dem Kaffeesäuregerüst der 5-CQA (**7**) (*Müller et al., 2006 b*).



Abbildung 9: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Pyrogallol (54), Hydroxyhydrochinon (55), Catechol (56), 4-Vinylcatechol (44), 4-Ethylcatechol (57), 4-Methylcatechol (58) und 3-Methylcatechol (59) aus 5-*O*-Caffeoylchinasäure (7) über die Hydrolyseprodukte Chinasäure (4) und Kaffeesäure (1).

Müller et al. (2006a,b) wiesen nach, dass die thermisch generierten niedermolekularen Hydroxybenzole mit aromaaktiven schwefelhaltigen Substanzen wie 2-Furfurylthiol (**26**) kovalente Bindungen eingehen und somit essenziell zum Abflachen des Aromas während der ersten 30 Minuten nach Aufbrühen eines Kaffees beitragen (**Abbildung 10**). Für die gebildeten Thioether wurde ein bitterer Geschmack beschrieben (*Kreppenhofer et al., 2010*).



Abbildung 10: Reaktionsmechanismus zur Bildung von 3-((2-Furylmethyl)sulfanyl)-5ethylcatechol (60), 4-((2-Furylmethyl)sulfanyl)hydroxyhydrochinon (61) und 3,4-Bis((2furylmethyl)sulfanyl)hydroxyhydrochinon (62) aus Furfurylthiol (26) mit 4-Vinylcatechol (44) oder Hydroxyhydrochinon (55) während der ersten 30 min nach Aufbrühen eines Kaffeegetränkes.

1.1.2.3 Bisherige Erkenntnisse zu Bitterstoffen im Kaffeegetränk

Während der rohe Kaffee fast gar keine Bitterkeit aufweist, nimmt diese mit steigendem Röstgrad zu. Der bittere Geschmack eines Kaffeegetränkes stellt eines der Hauptqualitätsmerkmale eines Kaffees dar. Daher ist es entscheidend, die Bildung der Bitterstoffe während des Röstprozesses zu kontrollieren, um somit eine gleichbleibende Qualität eines Kaffees sicher zu stellen. Trotz einer Vielzahl an Untersuchungen bezüglich der Bitterkeit, gibt es bis heute keine zufriedenstellenden Daten, welche die Gesamtbitterkeit eines Kaffeegetränkes erklären.

In ersten Arbeiten zur Bitterkeit eines Kaffeegetränkes wurde für die Alkaloide Koffein und Trigonellin ein Beitrag zur Bitterkeit bestätigt (*Chen, 1979*). Mit einem Bitterschwellenwert von 60 – 200 mg/mL (**Tabelle 2**) übersteigt das Koffein fast 20-fach die Geschmacksschwellenwertkonzentration im Kaffeegetränk. Dennoch ist Koffein nur für 10-30 % der Bitterkeit verantwortlich.

Schon 1975 vermutete *Belitz*, dass die Röstkaffee-Bitterkeit durch die bei der Röstung entstehenden Substanzen erklärt werden kann. Somit wird den in Rohkaffee vorkommenden Bitterstoffen wie Trigonellin und den Chlorogensäuren, die während der Röstung stark abgebaut werden, eine untergeordnete Rolle bei der Gesamtbitterkeit zugeschrieben. Es wird vermutet, dass die thermischen Abbauprodukte des Trigonellins und der Chlorogensäure einen Beitrag zur Bitterkeit leisten. So wird für die Chinasäure, ein thermisch generiertes Spaltprodukt der Chlorogensäuren, ein bitterer aspirinähnlicher Geschmack beschrieben. Mit einem Geschmacksschwellenwert von 10 ppm wird die Schwellenwert-konzentration um ca. den Faktor 20 in einem Kaffeegetränk überschritten. (*Maga, 1978, McCamey et al., 1990*). Dennoch ist bis heute noch nicht bestätigt, ob die Chinasäure einen Beitrag zur Gesamtbitterkeit eines Kaffeegetränkes leistet.

Weitere Untersuchungen der Inhaltsstoffe des Kaffeegetränkes ergaben eine Abhängigkeit der Bitterkeit von den enthaltenen Pyridingehalten (*Liardon et al., 1984*); und nach *Shibamoto et al. (1981*) korreliert die Bitterkeit von Arabica Kaffee mit dem Gehalt an Furfurylalkohol. Weitere thermisch generierte Produkte, die einen bitteren Geschmack aufweisen, stellen die von *Ginz, 2000 und 2001a* veröffentlichten Diketopiperazine dar. Diese sind zyklische Dipeptide, welche thermisch induziert aus zwei Aminosäuren durch eine Zyklodehydrierung gebildet werden. Für diese Substanzen detektierte *Ginz, 2001b* Schwellenwertkonzentrationen im Bereich von 30-40 ppm (**Tabelle 2**). Einen Beitrag zur Bitterkeit eines Kaffeegetränkes wurde von *Ginz (2001b*) vermutet, konnte aber im Rahmen seiner Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

Weitere Substanzen, die in Kaffee infolge der Röstung entstehen sind die bitter schmeckenden Laktone (**Abbildung 7**), die von *Frank et al., 2006 und 2008* auf ihren bitteren Geschmack hin evaluiert wurden. Diese Studien zeigten, dass der bittere

Schwellenwert von der chemischen Struktur der Substanzen abhing. Die Caffeoyl-γ-chinide und Feruyl-γ-chinide zeigten sehr ähnliche Schwellenwerte im Bereich von 29 – 40 µmol/L, wohingegen das *epi-δ*-Chinid eine sechsfach höhere Schwellenwertkonzentration im Vergleich zu den γ-Chiniden aufzeigte. Die niedrigsten Schwellenwertkonzentrationen mit 10 µmol/L zeigten die disubstituierten γ-Chinide. In Übereinstimmung mit den Daten der mono-substituierten Chinide zeigte das disubstituierte 3,5-O-Dicaffeoyl-*epi-δ*-Chinid (42) einen fünffach höheren Schwellenwert im Vergleich zu den anderen Isomeren. Neben diesen Laktonen identifizierten *Frank et al. 2007* die Phenylindane als eine Gruppe bitterer Substanzen, die während des Röstprozesses aus Kaffeesäure (1) gebildet werden (Abbildung 8). Bei der Untersuchung der bitteren Geschmacksschwellen konnte gezeigt werden, dass die Phenylindane ebenfalls sehr niedrige Schwellenwertkonzentrationen im Bereich zwischen 23 und 178 µmol/L (Tabelle 2) aufweisen, und einen Geschmacksbeitrag zur Bitterkeit von Kaffee leisten können.

	Geschmacksschwelle bitter			
Substanz (Nr.)	[mg/L]	[µmol/L]		
Koffein	146	750 ^b		
Trigonellin	2500 [°]	18248		
<i>cis</i> -cyclo(Pro-Val)	40 ^d	204		
trans-cyclo(Pro-Val)	37 ^d	189		
<i>cis</i> -cyclo(Pro-IIe)	30 ^d	143		
<i>cis</i> -cyclo(Pro-Leu)	35 ^d	167		
trans-cyclo(Pro-Leu)	30 ^d	143		
<i>cis</i> -cyclo(Pro-Phe)	30 ^d	123		
trans-cyclo(Pro-Phe)	32 ^d	131		
<i>cis</i> -cyclo(Pro-Pro)	32 ^d	165		
Furfurylalkohol (32)	19 - 40 ^e	194 - 408		
5-Hydroxymethylfurfural (34)	200 ^f	1586		
3-((2-Furylmethyl)sulfanyl))-5-ethylcatechol (60)	88 ^h	350		
3,4-Bis((2-furylmethyl)sulfanyl))hydroxyhydrochinon (61)	32 ^h	135		
5-O-Caffeoyl- <i>muco-γ</i> -chinid (35)	10 ⁱ	29		
3- <i>O</i> -Caffeoyl-γ-chinid (36)	13 ⁱ	40		

Tabelle 2: Humane Geschmacksschwellen	[µmol/L] der in Kaffee vorkommenden Bitterstoffe.
---------------------------------------	---

Ei	nle	eitu	un	a
	inc			·У

Substanz (Nr.) ^a	Geschmacksschwelle bitter	
	[mg/L]	[µmol/L]
4-O-Caffeoyl- <i>muco</i> -γ-chinid (37)	11 ⁱ	30
5- <i>Ο</i> -Caffeoyl- <i>epi</i> -δ-chinid (38)	61 ⁱ	180
4- <i>O</i> -Caffeoyl-≁chinid (39)	12 ⁱ	36
3- <i>O</i> -Caffeoyl- <i>epi</i> -≁chinid (40)	20 ^j	58
3- <i>O</i> -Caffeoyl- <i>epi</i> -≁chinid (40)	20 ^j	58
3,4-O-Dicaffeoyl-γ-chinid (41)	5 ⁱ	10
3,5-O-Dicaffeoyl- <i>epi</i> -∂-chinid (42)	25 ⁱ	50
4,5-O-Dicaffeoyl- <i>muco-γ</i> -chinid (43)	5 ⁱ	10
trans-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (45)	48 ^k	178
cis-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (46)	40 ^k	148
trans-1,3-Bis(3´,4´-dihydroxyphenyl)-1-buten (47)	39 ^k	145
1,3-Bis(3´,4´-dihydroxyphenyl)butan (48)	6 ^k	23
trans-4,5-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (49)	12 ^k	45
<i>cis</i> -4,5-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´-dihydroxyphenyl)indan (50)	9 ^k	32
<i>tran</i> s-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-[3´,4´-dihydroxy-5´-(1-(3´´,4´´- dihydroxyphenyl)-1-ethyl)phenyl]indan (51)	27 ^k	67
<i>cis</i> -5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-[3´,4´-dihydroxy-5´-(1-(3´´,4´´- dihydroxyphenyl)-1-ethyl)phenyl]indan (52)	24 ^k	60
5,6-Dihydroxy-1-methyl-2-[1-(3´,4´-dihydroxyphenyl)-1-ethyl]-3-(3´´,4´´- dihydroxyphenyl)indan (53)	15 ^k	37

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4**, **6**, **7** und **8**. ^b *Stark, 2005b.* ^c *Ordynsky, 2006.* ^d *Ginz, 2001b.* ^e *Shibamoto et al., 1981.* ^f *McCamey et al., 1990.* ^g *Maga, 1978.* ^h *Kreppenhofer et al., 2010.* ⁱ *Frank et al., 2006.* ^j *Frank et al., 2008.* ^k *Frank et al., 2007.*

1.2 Ziel der Untersuchungen

Aufgrund der Multiplizität und Komplexizität der Fraktion nicht-flüchtiger Inhaltsstoffe sind die den Bittergeschmack von Kaffeegetränken prägenden Moleküle bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Obwohl in den letzten Jahren einige Schlüsselbitterstoffe von Kaffee als Polyphenol-Thermolyseprodukte identifiziert werden konnten, scheiterten weitere Versuche, aufgrund der Instabilität dieser Verbindungen, die Bitterstoffe aus Röstkaffee zu isolieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch geeignete Modellexperimente weitere Einblicke in die Bildung und in die Strukturchemie potentieller Bitterstoffe zu erhalten und deren Vorkommen in Röstkaffee anschließend massenspektrometrisch zu validieren. Als reaktive Kaffeeinhaltsstoffe und potentielle Bitterpräkursoren wurden zum einen diverse Furanderivate wie z.B. Furfurylalkohol (**32**), Furfural (**33**) und 5-Hydroxymethylfurfural (**34**) mit Chlorogensäureabbauprodukten wie z.B. Kaffeesäure (**1**), Pyrogallol (**54**), Catechol (**56**), Hydroxyhydrochinon (**55**), 4-Methylcatechol (**58**) und 3-Methylcatechol (**59**) zur Reaktion gebracht. Zum anderen sollte die Bildung von Bitterstoffen aus der *Maillard*-Reaktion von Kohlenhydraten und Aminosäuren in Gegenwart von Polyphenolen auf molekularer Ebene studiert werden. Nach Strukturaufklärung der Reaktionsprodukte mittels LC-MS und 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie sollten diese sensorisch charakterisiert und deren Vorkommen in Röstkaffeegetränken validiert und mittels Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse (SIVA) quantitativ bestimmt werden.

2 Ergebnisse

Bisherige Studien wiesen der Bildung von Polyphenolabbauprodukten eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des typischen Geschmacks im Zuge des Kaffeeröstens zu. Eine direkte Isolierung und Strukturaufklärung unbekannter Bitterstoffe aus Röstkaffee ist auf Grund der oxidativen und chemischen Instabilität vieler Kaffeeinhaltstoffe jedoch nicht zielführend. In der Vergangenheit wurden erfolgreich diverse lebensmittelverwandte Modellsysteme entwickelt. welche die Entdeckung bislang unbekannter Geschmacksstoffe und Geschmacksmodulatoren in unterschiedlichen Lebensmitteln ermöglichten. So wendeten Haseleu et al. (2009) und Intelmann et al. (2009, 2010) geeignete Modellsysteme zur Klärung bislang unbekannter geschmacksaktiver Substanzen in Bier an. Sonntag et al. (2010) beschrieben neuartige Substanzen in Fleischsaft und Ottinger et al. (2001 und 2003) gelang damit die Identifizierung geschmacksaktiver Maillard-Reaktionsproukte in dunklem Malz. Daher sollte im Folgenden ein Modellsystem der Kaffeeröstung entwickelt werden, das die Isolierung, die Strukturaufklärung sowie die sensorische Evaluierung von Polyphenol-Thermolyseprodukten ermöglichte.

2.1 Struktur und Bildung von Bitterstoffen aus Di- und Trihydroxybenzolen in Röstkaffee

Das Literaturstudium ergab, dass Di- und Trihydroxybenzole sowie die Furanderivate Furfurylalkohol (**32**), Furfural (**33**) und 5-Hydroxymethylfurfural (**34**) reaktive Inhaltsstoffe und potentielle Bitterstoffvorstufen in Kaffee darstellen (*Belitz, 1977, Tressl et al., 1978, Clifford, 1979, Shibamoto et al., 1981, Haffenden und Yaylayan, 2005, Lang et al., 2006, Moon und Shibamoto, 2009).*

Für Modellstudien wurden daher die Di- und Trihydroxybenzole Pyrogallol (54), Hydroxyhydrochinon (55), Catechol (56) sowie 4- und 3-Methylcatechol (58 und 59) gewählt. Außerdem wurde für die Reaktionen das Dihydroxybenzol Resorcin (63, Abbildung 11) eingesetzt. Zur Untersuchung der Bildung von potentiellen Bitterstoffen wurde eine Screeningmethode entwickelt, bei der binäre Mischungen von Di- und Trihydroxybenzolen (54, 55, 56, 58, 59, 63) und Furanderivaten (32, 33, 34) in Modellröstansätzen erhitzt und auf die Bildung potentieller Produkte hin untersucht wurden. Nach Isolierung majorer Reaktionsprodukte erfolgte deren Strukturaufklärung sowie die Bestimmung der Geschmacksqualität und Geschmacksschwellenkonzentrationen.

2.1.1 Reaktionen von Di- und Trihydroxybenzolen mit Furfurylalkohol

Um die Reaktionen zwischen Di- und Trihydroxybenzolen und Furfurylalkohol (**32**) zu untersuchen, wurden die Hydroxybenzole Catechol (**56**), Pyrogallol (**54**), Hydroxyhydrochinon (**55**), 3-Methylcatechol (**59**) und 4-Methylcatechol (**58**) jeweils mit Furfurylalkohol (**32**) erhitzt. Des Weiteren wurden Chlorogensäure (**7**) und Kaffeesäure (**1**) mit dem Alkohol (**32**) umgesetzt, da diese beiden Säuren als Präkursoren der Di- und Trihydroxybenzole im Kaffee bekannt sind. Zusätzlich zu den im Kaffee nachgewiesenen Di- und Trihydroxybenzolen wurde Resorcin (**63, Abbildung 11**) aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit verwendet, um systematische Reaktionsstudien durchzuführen.



63

Abbildung 11: Struktur des eingesetzten Dihydroxybenzols Resorcin (63).

Um die Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Ausbeute der Reaktionsprodukte zu optimieren, wurden unterschiedliche Parameter im Folgenden untersucht. Zum einen wurde die Verwendung des eingesetzten Lösungsmittels (wässriges oder wasserfreies System) auf die Bildung von Reaktionsprodukten untersucht. Zusätzlich wurde das Phenol/Furan Verhältnis ebenso wie die Reaktionszeit für die analytischen Ansätze optimiert.

2.1.1.1 Reaktion von Catechol mit Furfurylalkohol

Um das Bildungspotential von Reaktionsprodukten aus Catechol (**56**) und Furfurylalkohol (**32**) unter Kaffeeröstbedingungen zu studieren, wurde in einem ersten Reaktionsansatz eine äquimolare Mischung dieser Verbindungen in 1 %iger wässriger Essigsäure gelöst, mit Kieselgel als Röstmatrix gemischt und nach einer Trocknungsphase (2 h, 50 °C) für 10 min bei 180 °C geröstet. Zur Extraktion der möglichen Reaktionsprodukte wurde das Trägermaterial mit einer Aceton/Wasser-Mischung (7/3; v/v) extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und die wässrige Lösung mittels RP-HPLC-DAD analysiert.

Wie aus **Abbildung 12A** ersichtlich, ergab die HPLC-Analyse, dass ein Hauptprodukt bei der Reaktion gebildet wurde, welches nach 21 min von der Säule eluierte und ein Absorptionsmaximum bei 220 und 284 nm aufwies. Weiterhin waren in dem Chromatogramm noch große Mengen an Edukten detektierbar. Für eine schnelle Bestimmung des Molekulargewichtes des Reaktionsproduktes wurde die Reaktionslösung in einem analytischen HPLC-Lauf fraktioniert und direkt mittels LOOP-Injektion massenspektroskopisch analysiert. Die LC-MS Analyse des isolierten Peaks der Substanz **64** ergab ein Pseudomolekülion ([M-H]⁻) von m/z 198. Die hochauflösende Massenspektroskopie ergab eine elementare Zusammensetzung von C₁₁H₁₀O₃ für das Zielmolekül **64**. Dies wies auf eine Reaktion von einem Molekül Catechol (**56**) mit einem Molekül Furfurylalkohol (**32**) hin. Bei einer ersten sensorischen Analyse konnte ein bitterer Geschmack für das Reaktionsprodukt bestimmt werden.

Da die Ausbeuten der Reaktion für eine eindeutige Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie zu gering waren, wurden die Reaktionsbedingungen verändert und die Edukte bei 100 °C für 120 min in wässriger Lösung zur Reaktion gebracht. Durch den Vergleich der HPLC-Chromatogramme der trocken erhitzten Probe und der wässrigen Reaktionslösung wurde bestätigt, dass in beiden Reaktionssystemen ein vergleichbares Peakmuster mit dem Reaktionsprodukt 64 auftrat (Abbildung 12B). Durch Aufskalierung der Modellreaktion in wässrigem Medium wurde diese Reaktion im präparativen Maßstab angesetzt und der Reaktionsansatz mittels MPLC auf RP-18 Material aufgetrennt. Nach einer finalen Aufreinigung mittels präparativer RP-18-HPLC und anschließender Gefriertrocknung wurde die Zielsubstanz 64 als ein amorphes Pulver in einer Reinheit von 98 % (HPLC, NMR) erhalten.



Abbildung 12: RP-HPLC Chromatogramme (λ =220 nm) einer binären Mischung von Furfurylalkohol (32) und Catechol (56) nach Erhitzung auf Kieselgel für 10 min 180 °C (A) und in 1 %iger wässriger Essigsäure (120 min, 100 °C) (B). Das Reaktionsprodukt ist mit 64 markiert. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 6, 9 und 16.

Das ¹H-NMR-Spektrum (**Abbildung 13**) der Substanz **64** zeigte sieben Resonanzsignale, welche für acht Protonen integrierten. Die detektierten Signale der chemischen Verschiebung von 3,77, 5,96, 6,26 und 7,31 ppm wurden den Protonen H-C(7), H-C(9), H-C(10), H-C(11) der Furan-2-ylmethyl-Einheit zugeordnet. Die drei Signale bei 6,52, 6,64 und 6,68 ppm wurden als die aromatischen Protonen H-C(5), H-C(1) und H-C(4) der Catecholeinheit identifiziert. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen C(6) des Catecholrings und dem C(7) des Furan-2-ylmethylrestes wurde durch die große Kopplungskonstante von 8,0 Hz der Protonen H-C(4) und H-C(5) belegt.



Abbildung 13: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, d₄-MeOD) und chemische Struktur von 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64).

Diese Bindungsknüpfung wurde darüber hinaus auch durch die heteronuklearen Kopplungen, welche im HMBC Spektrum sichtbar waren, bestätigt. Das Kohlenstoffatom in Position C(7) der Furan-2-ylmethyl-Einheit koppelte mit den Protonen H-C(1) und H-C(5) der Catecholeinheit des Moleküls. Unter Berücksichtigung aller spektroskopischen Daten konnte das Reaktionsprodukt von Catechol (56) und Furfurylalkohol (32) eindeutig als 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64, Abbildung 16) identifiziert werden. Obwohl die Struktur der Substanz schon 1960 auf Basis von IR-Experimenten postuliert wurde (*Kenzo, 1960, 1961*), fehlten bis heute die Daten für eine eindeutige Strukturaufklärung mittels LC-MS und NMR-Experimenten.

2.1.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Reaktion weiterer Diund Trihydroxybenzole mit Furfurylalkohol

Um zu untersuchen, ob unter wässrigen oder wasserfreien Bedingungen höhere Ausbeuten an Reaktionsprodukten erzielt werden können, wurden jeweils äquimolare binäre Mischungen der vorher genannten Di- und Trihydroxybenzolen (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**, **63**) oder den jeweiligen Präkursoren (**1**, **7**) und Furfurylalkohol (**32**) in 1 %iger Essigsäure in Wasser (wässriges System) oder in trockenem Tetrahydrofuran mit 1 % Trifluoressigsäure (wasserfreies System) erhitzt. Die entsprechende Erhitzungstemperatur richtete sich nach dem Siedepunkt des jeweiligen Lösungsmittels. Das wässrige System wurde eine Stunde auf 100 °C erhitzt und das wasserfreie System eine Stunde auf 70 °C. Die Reaktionsansätze des wässrigen Systems wurden direkt nach Verdünnung und Membranfiltration analysiert, wohingegen die Ansätze des wasserfreien Systems erst nach Entfernung der organischen Phase unter reduziertem Druck und Aufnahme des Rückstandes in Wasser/Methanol (7/3; v/v) auf mögliche Reaktionsprodukte mittels HPLC-DAD gescreent wurden.

Die Analyse der Chromatogramme zeigte, dass nur in den wässrigen Systemen neue Reaktionsprodukte aus den Mischungen der Di- und Trihydroxybenzole und Furfurylalkohol entstanden sind (Daten nicht gezeigt). In den wasserfreien Systemen konnten nur die nicht abgebauten Ausgangssubstanzen nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden unter den Reaktionsbedingungen des wässrigen Systems auch nur Reaktionsprodukte aus den Diund Trihydroxybenzolen nachgewiesen, wohingegen Kaffeesäure (1) und Chlorogensäure (7) keine Reaktivität mit Furfurylalkohol (32) zeigten. Für alle weiteren Untersuchungen wurden die Reaktionsansätze in dem wässrigen System mit den Di- und Trihydroxybenzolen 54, 55, 56, 58, 59, 63 durchgeführt.

Zur Optimierung des pH-Wertes der Lösungen wurden die Reaktionsmischungen in 1 %iger Essigsäure in Wasser (pH 3) und außerdem noch in reinem Wasser (pH 7) erhitzt. Beim Erhitzen der binären Mischungen bei pH 7 konnte keine Produktbildung mittels HPLC-DAD evaluiert werden. In dem angesäuerten Lösungsmittel hingegen konnte für alle Reaktionslösungen eine Produktbildung detektiert werden. Hieraus lässt sich schließen, dass die Reaktion der Di- und Trihydroxybenzole mit Furfurylalkohol (**32**) unter sauer katalysierten Bedingungen abläuft.

Zur Optimierung der Reaktionszeit wurden binäre Mischungen für 10, 60, 120, 240 und 480 min auf 100 °C erhitzt und mittels HPLC-DAD analysiert. Durch Variation des Anteils an Furfurylalkohol (**32**) (1:1; 1:5; 1:10) wurde zudem der Einfluss des Phenol/Furan-Verhältnisses überprüft. Die erhaltenen Reaktionsansätze wurden nach Probenvorbereitung mittels RP-HPLC-DAD analysiert und jeweils das Verhältnis von Edukt zu Produkt bestimmt. In **Tabelle 3** sind die optimierten Reaktionsbedingungen für die Reaktionen der Di- und
Trihydroxybenzole (54, 55, 56, 58, 59, 63) mit Furfurylalkohol (32) in 1 % iger wässriger Essigsäure zusammengefasst.

Für die Reaktionspartner Catechol (**56**) und Resorcin (**63**) war eine Erhitzungsdauer von 120 min und das Phenol/Furan-Verhältnis von 1:5 optimal. Dieses Verhältnis war ebenfalls für Pyrogallol (**54**) und Hydroxyhydrochinon (**55**) am effektivsten, wobei in beiden Fällen eine kurze Erhitzungsdauer favorisiert wurde. Im Falle der methylierten Catechole **58** und **59** führte eine zweistündige Erhitzung bei einem äquimolaren Eduktverhältnis zur besten Ausbeute. Für die Kaffeeinhaltstoffe Kaffeesäure (**1**) und Chlorogensäure (**7**) konnte unter keiner der gewählten Bedingungen die Bildung von Reaktionsprodukten beobachtet werden.

Tabelle 3: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Bildung der Reaktionsprodukte 64 - 69 aus binären Modellsystemen von Di- und Trihydroxybenzolen (1, 7, 54 - 56, 58, 59, 63) und Furfurylalkohol (32).

Di- und Trihydroxybenzol ^a	optimale Reaktionszeit [min] ^b bei 100 °C	Phenol/Furan Verhältnis ^c	Ausbeute [%] ^d	Reaktionsprodukt
Catechol (56)	120	1:5	32	64
Resorcin (63)	120	1:5	27	65
Pyrogallol (54)	60	1:5	24	66
Hydroxyhydrochinon (55)	10	1:5	12	67
4-Methylcatechol (58)	120	1:1	17	68
3-Methylcatechol (59)	120	1:1	19	69
Kaffeesäure (1)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Chlorogensäure (7)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.

^a Binäre Mischungen der Di- und Trihydroxybenzole (0,04 mmol) und Furfurylalkohol (0,04 - 0,4 mmol) in wässriger Essigsäure (1 mL, 1 % in Wasser) wurden für unterschiedliche Zeiten (10 - 480 min) bei 100 °C erhitzt. ^b Die optimalen Erhitzungszeiten wurden in analytischen Modellsystemen bestimmt. ^c Die optimierten Eduktverhältnisse wurden in analytischen Modellsystemen bestimmt. ^d Ausbeuten der gebildeten Produkte, basierend auf Flächenverhältnissen im HPLC-UV-Chromatogramm bei 220 nm im Vergleich zum eingesetzten Di- und Trihydroxybenzol. n.d.: kein Reaktionsprodukt detektierbar. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4, 9, 11** und **16**.

Für die Strukturaufklärung der Zielkomponenten **64** - **69** wurden die einzelnen Modellreaktionen im präparativen Maßstab durchgeführt. Die erhaltenen Reaktionsmischungen wurden mittels MPLC zunächst vorgetrennt. Die finale Aufreinigung der Reaktionsprodukte erfolgte mittels präparativer RP-HPLC. Die synthetisierten Substanzen wurden in hoher Reinheit isoliert und zur Strukturaufklärung mittels UV/Vis-, LC-MS/MS-, HRMS-, 1D- und 2D-NMR-Experimenten herangezogen.

Reaktion von Resorcin mit Furfurylalkohol

Bei der Reaktion von Resorcin (63) und Furfurylalkohol (32) entstand das Reaktionsprodukt 65, welches ein Pseudomolekülion von m/z 189 ([M-H]⁻) aufzeigte. Dieses Ergebnis korrelierte mit den Daten der Substanz 64. Im Unterschied zum ¹H-NMR-Spektrum von 64 war das Proton Signal H-C(4) bei der Substanz 65 auf 6,22 ppm hochfeldverschoben. Die homonuklearen Kopplungen ³ $J_{4,5}$ mit 8 Hz und ⁴ $J_{2,4}$ mit 2,4 Hz deuteten darauf hin, dass die Furan-2-ylmethyl-Einheit mit dem Kohlenstoffatom in Position C(6) im Resorcinmolekül verknüpft war. Dieses Ergebnis wurde durch die heteronuklearen Kopplungen im HMBC bestätigt. Der Kohlenstoff an Position C(7) koppelte nur mit den beiden Protonen in Position H-C(5) und H-C(9) (Abbildung 14). Die Substanz 65 (Abbildung 16) wurde als 1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol identifiziert, welches von *Kenzo 1960* bereits beschrieben wurde.



Abbildung 14: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (400 MHZ, d₄-MeOD) und chemische Struktur von 1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (65).

Reaktion von Pyrogallol und Hydroxyhydrochinon mit Furfurylalkohol

Sowohl Pyrogallol (54) als auch Hydroxyhydrochinon (55) gehören zu der Gruppe der Trihydroxybenzole. Der Unterschied dieser beiden Konstitutionsisomere liegt in der Anordnung der Hydroxygruppen am Benzolring. Bei Pyrogallol (54) sind die drei Hydroxygruppen in den Positionen 1, 2 und 3 in direkter Nachbarstellung angeordnet, wohingegen im Hydroxyhydrochinon (55) die Hydroxygruppen in Position 1, 2 und 4 am Benzolring lokalisiert sind. LC-MS und LC-TOF-MS Experimente der Substanzen 66 und 67, welche aus den Reaktionsansätzen von Pyrogallol (54) bzw. Hydroxyhydrochinon (55) mit Furfurylalkohol (32) isoliert wurden, zeigten beide ein Pseudomolekülion von m/z 205 ([M-H]) und eine elementare Zusammensetzung von $C_{11}H_{10}O_4$ für beide Isomere. Die ¹H-NMR-Spektren der Substanzen 66 und 67 zeigten jeweils Protonensignale bei einer Verschiebung von 3,82, 5.90, 6.25 und 7.31 ppm, diese wurden den Protonen in den Positionen H-C(7), H-C(9), H-C(10) und H-C(11) der Furan-2-ylmethyl-Einheit zugeordnet (Abbildung 15). Zwei koppelnde, direkt benachbarte aromatische Protonen mit einer Kopplungskonstanten von ${}^{3}J = 8,3$ Hz für das Pyrogalloladdukt **66** deuteten darauf hin, dass die Verknüpfung der Furan-2-ylmethyl-Einheit mit dem Kohlenstoffatom C(6) des Pyrogallols stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu waren in dem ¹H-NMR-Spektrum des Hydroxyhydrochinon Produktes 67 zwei isolierte aromatische Protonen sichtbar. Dies deutete darauf hin, dass hier ebenfalls die Verknüpfung der Furan-2-ylmethyl-Einheit mit dem Kohlenstoffatom C(6) geschlossen wurde. Diese Verknüpfungen wurden mit den 2D-NMR-Spektren, insbesondere mit dem HMBC-Spektrum bestätigt. Im Fall des Pyrogalloladduktes 66 war eine Kopplung von dem Kohlenstoffatom C(7) zu den Protonen H-C(5) und H-C(9) sichtbar, wohingegen im Fall des Hydroxyhydrochinon Produktes nur eine Kopplung vom Kohlenstoffatom in Position C(7) zu dem Proton der Furan-2-ylmethyl-Einheit H-C(9) auftrat. Basierend auf der Auswertung aller spektroskopischer Daten wurden die isolierten Reaktionsprodukte als 1,2,3-Trihydroxy-4-(66) und 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (furan-2-ylmethyl)-benzol (67) (Abbildung 16) identifiziert, welche bislang nach bestem Wissen noch nicht in der Literatur beschrieben wurden.



Abbildung 15: Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, d₄-MeOD) und Strukturen von 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66) (A) und 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (67) (B).

Reaktion methylierter Dihydroxybenzole mit Furfurylalkohol

Die beiden Substanzen **68** und **69**, welche aus den Reaktionsansätzen von Furfurylalkohol (**32**) mit 4-Methylcatechol (**58**) oder 3-Methylcatechol (**59**) isoliert wurden, zeigten beide ein Molekulargewicht von 204 Da. Die elementare Zusammensetzung der beiden Moleküle wurde mittels HRMS mit $C_{12}H_{11}O_3$ bestimmt. Die ¹H-NMR-Spektren von **68** und **69** zeigten die Protonensignale der Protonen H-C(7), H-C(9), H-C(10) und H-C(11), die somit der Furan-2-ylmethyl-Einheit zugeordnet wurden. Außerdem zeigten beide Spektren die jeweiligen aromatischen Protonensignale, die den Protonen im aromatischen Ring des 3- und 4-Methylcatechols zugeordnet wurden. Im Fall des 4-Methylcatechols (**58**) waren die aromatischen Protonensignale bei einer Verschiebung von 6,55 und 6,57 ppm jeweils als ein Singulett sichtbar. Dies ließ darauf schließen, dass die Furfurylalkoholeinheit in Position C(6) an das 4-Methylcatechol (58) addiert wurde, da die beiden Protonensignale keine Kopplungen zu benachbarten Protonen aufwiesen. Im Falle der Reaktion von Furfurylalkohol (32) mit 3-Methylcatechol (59) erschienen die aromatischen Protonensignale bei einer Verschiebung von 6,48 und 6,57 ppm. Beide Signale waren zu einem Dublett aufgespalten, das eine Kopplungskonstante von 8 Hz aufwies. Daraus ließ sich ableiten, dass diese beiden Protonen im aromatischen System direkt nebeneinander liegen. Aufgrund der 2-dimensionalen HMBC Kopplungen des Kohlenstoffsignals C(12) zu den beiden aromatischen Protonen H-C(4) und H-C(5) konnte geschlossen werden, dass die Addition der Furan-2-ylmethyl-Einheit im Falle des 3-Methylcatechols ebenfalls in der Position C(6) stattgefunden hatte, da diese Kopplungen nur über vier Bindungen sichtbar waren und bei einer Addition an einem anderen Kohlenstoffatom nicht sichtbar wären. Die Zuordnung der Signale aus den NMR-Spektren der Reaktionsprodukte von 3- und 4-Methylcatechol mit Furfurylalkohol (32) führte zu der eindeutigen Bestätigung der Substanzen zu den bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen Verbindungen 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68) und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69) (Abbildung 16).



Abbildung 16: Chemische Strukturen der Reaktionsprodukte 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64), 1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (65), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66), 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (67), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68) und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methyl-benzol (69), die bei der Reaktion von Di- und Trihydroxybenzolen (54, 55, 56, 58, 59, 63) und Furfurylalkohol (32) gebildet werden.

2.1.2 Reaktionsprodukte aus Di- und Trihydroxybenzolen und Furfural

Um die Reaktionsprodukte, die bei einer Umsetzung von Di- und Trihydroxybenzolen (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**, **63**) mit Furfurylalkohol (**32**) entstanden, mit denen zu vergleichen, die bei der Reaktion mit Furfural (**33**) entstehen, wurden Ansätze unter analogen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Hierfür wurden binäre Mischungen aus den Di- und Trihydroxybenzolen Catechol (**56**), Resorcin (**63**), Pyrogallol (**54**), Hydroxyhydrochinon (**55**), 3-Methylcatechol (**59**) und 4-Methylcatechol (**58**) mit Furfural (**33**) in 1 %iger Essigsäure erhitzt. Auch hier wurden zudem die beiden Präkursoren der Di- und Trihydroxybenzole, Kaffeesäure (**1**) und Chlorogensäure (**7**) mit Furfural (**33**) versetzt. Analog zu dem Experimentdesign in Kapitel 2.1.1.2 wurden Phenol/Furan-Verhältnisse und Erhitzungsdauer variiert, um das Optimum der Reaktionen zu bestimmen.

Die HPLC-Analyse zeigte, dass die Bildung von Reaktionsprodukten ausschließlich in den Modellansätzen nachgewiesen wurde, die Resorcin (63) oder Pyrogallol (54) enthielten. Die ideale Erhitzungsdauer für die Reaktion von Resorcin (63) und Furfural (33) wurde auf 120 min bestimmt, wohingegen Pyrogallol (54) bereits nach einer Reaktionszeit von 60 min die besten Produktausbeuten lieferte. Weiterhin bestand ein Unterschied bei den eingesetzten Phenol/Furan-Verhältnissen. Für die Reaktion zwischen Resorcin (63) und Furfural (33) wurde die bestmögliche Ausbeute bei einem Einsatz von 1:5 erreicht und für die Reaktion zwischen Pyrogallol (54) und Furfural (33) erwies sich ein Verhältnis von 1:10 als optimal. Bei allen anderen Modellreaktionen konnten keine Produkte detektiert werden. Eine Zusammenfassung der optimierten Reaktionsbedingungen ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Für die Strukturaufklärung wurden die Pyrogallol (**54**) und Resorcin (**63**) enthaltenden Modellsysteme im präparativen Maßstab angesetzt. Die erhaltenen Reaktionslösungen wurden anschließend mittels MPLC aufgetrennt. Die finale Aufreinigung der Reaktionsprodukte **70** und **71** erfolgte mittels semipräparativer RP-HPLC. Nach Lyophilisation erfolgte die Identifizierung der Produkte mittels LC-MS/MS, LC-TOF-MS-Experimenten und 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie.

Di- und Trihydroxybenzol ^a	optimale Reaktionszeit [min] ^b bei 100 °C	Phenol/Furan Verhältnis ^c	Ausbeute [%] ^d	Reaktionsprodukt
Catechol (56)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Resorcin (63)	120	1:5	17	70
Pyrogallol (54)	60	1:10	23	71
Hydroxyhydrochinon (55)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
4-Methylcatechol (58)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
3-Methylcatechol (59)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Kaffeesäure (1)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Chlorogensäure (7)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.

Tabelle 4: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Bildung der Reaktionsprodukte aus binären Modellsystemen von Di- und Trihydroxybenzolen (1, 7, 54 - 56, 58, 59 und 63) und Furfural (33).

^a Binäre Mischungen der Di- und Trihydroxybenzole (0,04 mmol) und Furfural (0,04 - 0,4 mmol) in wässriger Essigsäure (1 mL, 1 % in Wasser) wurden für unterschiedliche Zeiten (10 - 480 min) bei 100 °C erhitzt. ^b Die optimalen Erhitzungszeiten wurden in analytischen Modellsystemen bestimmt. ^c Die optimierten Eduktverhältnisse wurden in analytischen Modellsystemen bestimmt. ^d Ausbeuten der gebildeten Produkte, basierend auf Flächenverhältnissen im HPLC-UV-Chromatogramm bei 220 nm im Vergleich zum eingesetzten Di- und Trihydroxybenzol. n.d.: kein Reaktionsprodukt detektierbar. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4, 9, 11** und **18**.

Reaktion von Resorcin mit Furfural

Die Analyse der Substanz **70** mittels LC-MS/MS und LC-TOF-MS, welche aus dem Reaktionsansatz von Resorcin (**63**) mit Furfural (**33**) isoliert wurde, zeigte ein Pseudomolekülion von *m/z* 297 ([M-H]⁻) und eine elementare Zusammensetzung von C₁₇H₁₄O₅. Die Summenformel war ein Indiz dafür, dass ein Molekül Furfural (**33**) mit zwei Molekülen Resorcin (**63**) reagiert hatte. Das ¹H-NMR-Spektrum (**Abbildung 17**) der Substanz **70** zeigte sieben Resonanzsignale, welche für neun Protonen integriert wurden. Die Protonensignale der Furan-2-ylmethyl-Einheit, welche bei der chemischen Verschiebung von 5,70 (H-C(9)), 5,84 (H-C(7)), 6,25 (H-C(10)) und 7,34 ppm (H-C(11)) detektiert wurden, zeigten Integrale von eins. Wohingegen die Resonanzsignale der Resorcineinheit, welche bei der chemischen Verschiebung von 6,18, 6,28 und 6,58 ppm detektiert wurden, jeweils ein Integral für zwei Protonen aufwiesen. Dies bestätigte das Vorhandensein von einer Furan-2-ylmethyl-Einheit und zwei Resorcineinheiten. Die Detektion von nur einem Protonensignal für die jeweiligen aromatischen Protonen im Resorcinmolekül ließ auf eine absolute Symmetrie des Moleküls **70** schließen. Die homonuklearen Kopplungskonstanten ³J_{4,5} = 8,0 Hz und ³J_{2,4} = 1,5 Hz und die heteronuklearen Kopplungen zwischen dem Kohlenstoffatom C(7) mit den Protonen H-C(5)/ H-C(5') im HMBC-Spektrum ließen darauf schließen, dass die Furan-2-ylmethyl-Einheit mit den beiden Resorcinmolekülen in Position C(6) verknüpft war. Durch die Analyse der spektroskopischen Daten konnte das Produkt **70**, welches aus Furfural (**33**) und Resorcin (**63**) gebildet wurde, eindeutig als das 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3dihydroxybenzol identifiziert werden (**70**, **Abbildung 18**).



Abbildung 17: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, d₄-MeOD) und chemische Struktur von 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3-dihydroxybenzol (70).

Reaktion von Pyrogallol mit Furfural

Die LC-MS-Analyse der Verbindung **71**, welche aus Pyrogallol (**54**) und Furfural (**33**) synthetisiert wurde, ergab ein molekulares Gewicht von 330 Da. Bei der Untersuchung der elementaren Zusammensetzung mittels HRMS wurde eine Summenformel von $C_{17}H_{14}O_7$ bestimmt. Diese beiden Ergebnisse deuteten darauf hin, dass wie bei der Reaktion von Resorcin (**63**) in dem Molekül **71** zwei Einheiten Pyrogallol (**54**) und eine Furfuraleinheit miteinander reagiert haben.

Beim Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der Substanzen **70** und **71** fielen nur marginale Unterschiede auf. Lediglich das Fehlen der aromatischen Protonen H-C(2) und H-C(2') im Spektrum von **71** ließ auf das Vorhandensein einer dritten Hydroxygruppe am Benzolring schließen. Dies führte zu der Identifizierung von 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3trihydroxybenzol (**71**, **Abbildung 18**). Die Verbindungen **70** und **71** wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.



Abbildung 18: Chemische Strukturen der aus Resorcin (63) bzw. Pyrogallol (54) in Gegenwart von Furfural (33) gebildeten Reaktionsprodukte 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3dihydroxybenzol (70) und 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-trihydroxybenzol (71).

2.1.3 Reaktionsprodukte aus Di- und Trihydroxybenzolen und 5-Hydroxymethylfurfural

Da im 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF, **34**) die reaktiven Gruppen von Furfurylalkohol (**32**) und Furfural (**33**) in einem Molekül vereint sind, stellte sich die Frage, ob bei der Umsetzung mit 5-HMF die jeweiligen monosubstituierten Reaktionsprodukte an der Hydroxyfunktion gebildet werden sowie zusätzlich die beiden disubstituierten Reaktionsprodukte an der Aldehydfunktion, oder ob nur Reaktionsprodukte entstehen, welche an allen reaktiven Gruppen vollsubstituiert auftreten.

Für die Untersuchung der potentiellen Reaktionsprodukte wurden wieder die Di- und Trihydroxybenzole Catechol (56), Resorcin (63), Pyrogallol (54), Hydroxyhydrochinon (55), 3-Methylcatechol (59) und 4-Methylcatechol (58) sowie Kaffeesäure (1) und Chlorogensäure (7) in einer binären Mischung mit 5-Hydroxymethylfurfural (34) bei 100 °C erhitzt. Im analytischen Maßstab wurde hier zunächst die Erhitzungsdauer sowie das Furan/Phenol-Verhältnis optimiert (Tabelle 5). Wie bereits bei den Reaktionsmischungen mit Furfural (33) konnten in den Ansätzen mit 5-HMF (34) ausschließlich Reaktionsprodukte bei den Ansätzen mit Resorcin (63) und Pyrogallol (54) mittels RP-HPLC-DAD detektiert werden. Für die beiden Reaktionsprodukte 72 und 73 wurden die besten Substanzausbeuten bei einem Phenol/Furan-Verhältnis von 1:5 bzw. 1:10 und einer Reaktionszeit von 120 min bei 100 °C erhalten.

Di- und Trihydroxybenzol ^a	optimale Reaktionszeit [min] ^b bei 100 °C	Phenol/Furan Verhältnis ^c	Ausbeute [%] ^d	Reaktionsprodukt
Catechol (56)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Resorcin (63)	120	1:5	7	72
Pyrogallol (54)	120	1:10	15	73
Hydroxyhydrochinon (55)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
4-Methylcatechol (58)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
3-Methylcatechol (59)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Kaffeesäure (1)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.
Chlorogensäure (7)	n.d.	1:1 – 1:10		n.d.

Tabelle 5: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Bildung der Reaktionsprodukte aus binären Modellsystemen von Di- und Trihydroxybenzolen (1, 7, 54 - 56, 58, 59 und 63) und 5-Hydroxymethylfurfural (34).

^a Binäre Mischungen der Di- und Trihydroxybenzole (0,04 mmol) und 5-HMF (0,04 - 0,4 mmol) in wässriger Essigsäure (1 mL, 1 % in Wasser) wurden für unterschiedliche Zeiten (10 - 480 min) bei 100 C° erhitzt. ^b Die optimalen Erhitzungszeiten wurden in analytischen Modellsystemen bestimmt. ^c Die optimierten Eduktverhältnisse wurden in analytischen Modellsystemen bestimmt. ^d Ausbeuten der gebildeten Produkte, basierend auf Flächenverhältnissen im HPLC-UV-Chromatogramm bei 220 nm im Vergleich zum eingesetzten Di- und Trihydroxybenzol. n.d.: kein Reaktionsprodukt detektierbar. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4, 9, 11** und **20**.

Nach einem präparativen Up-scaling der Reaktionsansätze mit Resorcin (**63**) und Pyrogallol (**54**) erfolgte die präparative Aufreinigung der Zielkomponenten **72** und **73** mittels MPLC und semipräparativer HPLC, gefolgt von einer strukturellen Aufklärung mittels LC-MS/MS, HRMS und 1D- und 2D-NMR-spektroskopischen Experimenten.

Reaktion von Resorcin mit 5-Hydroxymethylfurfural

Die LC-MS/MS und LC-TOF-MS Analyse der Verbindung **72**, die aus dem Reaktionsansatz von Resorcin (**63**) und 5-HMF (**34**) isoliert wurde, ergab ein Pseudomolekülion von *m/z* 419 ([M-H]⁻) und eine elementare Zusammensetzung von C₂₄H₂₀O₇. Die Summenformel war ein erster Indikator dafür, dass das Reaktionsprodukt **72** durch Reaktion dreier Resorcineinheiten mit einem Molekül 5-HMF entstand. Bei der Messung der ¹H-NMR-Daten wurden zehn Resonanzsignale erhalten (**Abbildung 19**), deren Integration 14 kohlenstoffgebundene Protonen ergab. Das Resonanzsignal bei 3,74 ppm, welches für zwei Protonen integriert wurde, wurde der Methylengruppe H-C(7) zugeordnet. Die drei Protonen, welche bei einer chemischen Verschiebung von 5,57, 5,74 und 5,80 ppm detektiert wurden und je

ein Integral von eins aufwiesen, wurden den Protonen H-C(10), H-C(9) und H-C(12) der früheren 5-HMF-Einheit zugeordnet. Die verbleibenden Protonensignale im ¹H-NMR-Spektrum entsprachen den aromatischen Protonen der drei Resorcineinheiten. Die drei Signale, welche bei einer chemischen Verschiebung von 6,19, 6,28 und 6,63 ppm detektiert wurden und jeweils ein Integral für zwei Protonen aufwiesen, zeigten die Kopplungskonstanten ${}^{3}J_{17,18} = 8,2$, ${}^{3}J_{17',18'} = 8,2$, ${}^{3}J_{17,15} = 2,3$ und ${}^{3}J_{17',15'} = 2,3$ Hz und wurden den Atomen H-C(17)/H-C(17'), H-C(15)/H-C(15') und H-C(18)/H-C(18') zugeordnet. Das dritte Resorcinmolekül zeigte ebenfalls drei Resonanzsignale bei 6,20, 6,28 und 6,81 ppm, welche mit den Protonen H-C(4), H-C(2) und H-C(5) der Verbindung **72** übereinstimmten. Durch das Heteronucleare Multiple Bond Coherence Experiment (HMBC) wurde die heteronukleare Korrelation zwischen dem Kohlenstoff C(7) und dem Proton H-C(5) detektiert, sowie die Korrelation zwischen dem Methin-Kohlenstoff C(12) und den aromatischen Protonen der Positionen H-C(18) und H-C(18'). Dies bestätigte die Struktur der Verbindung **72** als das bisher noch nicht beschriebene 4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]-bis-1,3-dihydroxybenzol (**Abbildung 20**).



Abbildung 19: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, d₄-MeOD) von 4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,3-dihydroxy-benzol (72).

Reaktion von Pyrogallol mit 5-Hydroxymethylfurfural

Die Verbindung **73**, welche aus dem Reaktionsansatz von Pyrogallol (**54**) und 5-HMF (**34**) unter Verwendung von MPLC und präparativer HPLC isoliert wurde, zeigte ein Pseudomolekülion von *m/z* 467 ([M-H]⁻) im LC-MS/MS-Spektrum, was auf eine Summenformel von C₂₄H₂₀O₁₀ hindeutete. Die ¹H-NMR-Daten der Verbindung **73** waren sehr ähnlich zu den ¹H-NMR-Daten der Verbindung **72** mit dem Unterschied, dass ein aromatisches Proton für jede Benzoleinheit fehlte. Durch die Auswertung aller spektroskopischer Daten wurde die Verbindung **73** eindeutig als das 4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,2,3-trihydroxybenzol (**73**, **Abbildung 20**) identifiziert, welches in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde.



Abbildung 20: Chemische Strukturen der aus Resorcin (63) bzw. Pyrogallol (54) in Gegenwart von 5-Hydroxymethylfurfural (34) gebildeten Reaktionsprodukte 4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,3-dihydroxybenzol (72) bzw. 4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,2,3-trihydroxybenzol (73).

2.1.4 Geschmacksschwellenwerte der Röstbitterstoffe

Zur sensorischen Evaluierung der synthetisierten Furan-2-ylmethyl-Produkte **64-73** wurden nach der Reinheitsüberprüfung (LC-MS, ¹H-NMR) die in Wasser gelösten Substanzen verkostet. Das geschulte Sensorikpanel von zwölf Personen beschrieb für alle untersuchten Substanzen ein adstringierendes Mundgefühl und einen bitteren Geschmack.

Die adstringierenden und bitteren Geschmacksschwellen aller Verbindungen wurden im Anschluss unter Verwendung des Half-Mouth Test bestimmt (*Frank et al., 2007, 2008, Scharbert et al., 2004, Stark et al., 2005a, Brock und Hofmann, 2008).* Abhängig von der chemischen Struktur lagen die Geschmacksschwellen zwischen 16 und 900 µmol/L für das adstringierende Mundgefühl und zwischen 100 und 1800 µmol/L für den bitteren Geschmack (**Tabelle 6**). Um eine Veränderung in der Geschmacksaktivität der Reaktionsprodukte im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangssubstanzen festzustellen, wurden außerdem die Geschmacksschwellenwerte der Ausgangssubstanzen evaluiert.

Die ermittelten Geschmacksschwellenwerte der Reaktionsprodukte 64 - 73 und der Di- und Trihydroxybenzole (54, 55, 56, 58, 59, 63) sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Für jede Verbindungsklasse hatte die strukturelle Modifikation der Di- und Trihydroxybenzole mit unterschiedlichen Furanderivaten einen signifikanten Unterschied in ihren Geschmacksschwellenwerten zur Folge. Mit Ausnahme der Pyrogallolderivate (66, 71, 73) wiesen die Reaktionsprodukte einen niedrigeren bitteren Geschmacksschwellenwert auf als das zur Reaktion eingesetzte Di- und Trihydroxybenzole. Zum Beispiel reduzierte sich der Bitterschwellenwert von Resorcin (63) um den Faktor 2,2 (65), 10,2 (70) und 5,3 (73) durch die Reaktion mit Furfurylalkohol (32), Furfural (33) und 5-Hydroxymethylfurfural (34) (Tabelle 6). Die Änderungen der Geschmacksschwellenwerte durch die Reaktion mit Furfurylalkohol lagen zwischen Faktor 1,9 für das Reaktionsprodukt aus 4-Methylcatechol (68) und Faktor 4 für das Hydroxyhydrochinon-Reaktionsprodukt (67). Die Reaktionen von Pyrogallol (54) mit den Furanderivaten zeigten keinen signifikanten Einfluss. Die detektierten bitteren Geschmacksschwellen lagen bei 300 µmol/L für das reine Pyrogallol (54), bei 330 µmol/L für das Furfurylalkoholprodukt (66) und bei 460 µmol/L für das Furfuralprodukt (71) und das 5-HMF-Produkt (73).

Bei der Betrachtung der Schwellenwerte zur Wahrnehmung des adstringierenden Mundgefühls fiel wiederum auf, dass die Änderungen der Pyrogallolprodukte mit Faktor 1,3 für das Reaktionsprodukt mit Furfurylalkohol (**66**) und Faktor 1,8 für das Furfuralprodukt (**71**) niedriger lagen als die Änderungen bei den anderen Di- und Trihydroxybenzolen. Durch die Reaktion von Catechol (**56**) mit Furfurylalkohol (**32**) reduzierte sich die Wahrnehmungsschwelle des adstringierenden Mundgefühls der Substanz (**64**) im Vergleich zum reinen Catechol (**56**) von 679 µmol/L auf 134 µmol/L. Die größte Verringerung der adstringierenden Wahrnehmung wurde durch die Reaktion von Resorcin mit Furfural hervorgerufen. Hier zeigte das Reaktionsprodukt (**70**) eine um Faktor 15 geringere Wahrnehmungsschwelle im Vergleich zum reinen Resorcin (**63**).

	Geschmacksschwelle [µmol/L] ^b			
Substanz (Nr.) ⁻	bitter	adstringierend		
1,2-Dihydroxybenzol (Catechol) (56)	1313	671		
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64)	537	134		
1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin) (63)	1800	900		
1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (65)	812	333		
4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3-dihydroxybenzol (70)	177	66		
4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,3- dihydroxybenzol (72)	340	110		
1,2,3-Trihydroxybenzol (Pyrogallol) (54)	297	78		
1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66)	328	62		
4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-trihydroxybenzol (71)	457	42		
4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,2,3- trihydroxybenzol (73)	455	16		
1,2,4-Trihydroxybenzol (Hydroxyhydrochinon) (55)	1336	74		
1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (67)	317	20		
1,2-Dihydroxy-4-methylbenzol (4-Methylcatechol) (58)	540	363		
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68)	279	60		
1,2-Dihydroxy-3-methylbenzol (3-Methylcatechol) (59)	371	131		
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69)	100	79		

Tabelle 6: Humane Geschmacksschwellen [µmol/L] der Di- und Trihydroxybenzole (54 - 56, 58 - 59, 63) und der isolierten Reaktionsprodukte (64 - 73).

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 9**, **11**, **16**, **18** und **20**. ^b Geschmacksschwellen wurden im Half-Mouth Test in Trinkwasser (pH 6,0) aufgenommen.

2.1.5 Identifizierung und Quantifizierung bitterer Polyphenol-Thermolyseprodukte in Röstkaffee

Um ein natürliches Vorkommen der bitteren und adstringierenden Reaktionsprodukte aus den Reaktionen der Di- und Trihydroxybenzolen mit den Furanderivaten in Kaffeegetränken nachzuweisen, wurde ein frisch bereitetes Kaffeegetränk auf ein Vorhandensein der Verbindungen **64** - **73** mittels HPLC-MS/MS (ESI⁻) untersucht. Das Massenspektrometer wurde im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus betrieben. Dieser basierte auf der Selektion von Ionen eines bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses am ersten Quadrupol (Q1),

der anschließenden Fragmentierung der Ionen in der Stoßzelle (Q2) und der darauffolgenden Selektion der Fragmentionen eines definierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses am dritten Quadrupol (Q3). Durch die Verwendung der zweifachen Ionenselektion konnte eine besonders große Selektivität und damit auch ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt werden. Vor der Analyse wurden charakteristische Massenübergänge und optimierte Instrumenteinstellungen für jede Verbindung individuell in Tuningläufen bestimmt. Durch den Vergleich der Retentionszeiten ebenso wie durch die charakteristischen Massenübergänge der detektierten Verbindungen in Kaffee mit denen der entsprechenden synthetisierten Verbindungen, wurden die bitteren Geschmacksstoffe 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68) und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69) in dem Kaffeegetränk zweifelsfrei nachgewiesen (Abbildung 21). Eine weitere Absicherung dieser identifizierten Substanzen erfolgte durch Co-Chromatografie mit den synthetisierten Referenzsubstanzen. Interessanterweise wurden ausschließlich die Reaktonsprodukte des Furfurylalkohols (32) im Kaffee nachgewiesen (64, 66, 68 und 69), während die Reaktionsprodukte des Furfurals (70 und 71) und des 5-HMF (72 und 73) nicht im Kaffeegetränk detektiert werden konnten. Die Identität der Bitterstoffe 64, 66, 68 und 69 in Röstkaffee wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.



Abbildung 21: LC-MS/MS Chromatogramme (MRM-Mode) der Analyse der Furan-2ylmethylierten Di- und Trihydroxybenzole 64 - 73 in einem Kaffeegetränk. Die Bezifferung der bitteren Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 16, 18 und 20.

Um einen genaueren Einblick über die Gehalte der Konjugate, genauso wie für ihre potentiellen Präkursoren, in einem Kaffeegetränk zu erhalten, wurden die Di- und Trihydroxybenzole (**54 - 56, 58 - 59, 63**) und Furfurylalkohol (**32**) mittels LC-MS/MS und externer Kalibration, sowie die synthetisierten Verbindungen (**64, 66, 68** und **69**) ebenfalls mittels LC-MS/MS und interner Kalibration quantitativ in unterschiedlich bereiteten Kaffeegetränken analysiert. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Bildung der Substanzen **64**, **66, 68** und **69** von den Röstbedingungen wurden unterschiedlich stark geröstete Arabicaund Robusta- Kaffeeproben analysiert. Neben den unterschiedlichen Arabica- und Robusta-Proben (**Tabelle 14**) wurden zusätzlich 8 unterschiedliche Kommerziell erhältliche Espresso-Proben (**Tabelle 13**) untersucht. Diesen wurden vom Hersteller Intensitäten zwischen 3 und 10 zugeordnet.

2.1.5.1 Analytische Bestimmung von Bitterstoffen und deren Vorstufen

Für die LC-MS/MS Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen **64**, **66**, **68** und **69** wurde eine Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse (SIVA) entwickelt. Zur LC-MS/MS Analyse wurden hierbei interne stabilisotopenmarkierte Standards eingesetzt, die nach Möglichkeit mit dem Analyten coeluieren, um matrixbedingte Diskriminierungen bei der chromatographischen Trennung und der Ionisierung zu umgehen (*Zimmer, 2003*).

Für die Entwicklung einer SIVA wurde sowohl das 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)benzol (**64**), als auch das 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**66**) durch den Einsatz von deuteriertem Furfurylalkohol isotopenmarkiert synthetisiert.

Die Synthese von deuteriertem Furfurylalkohol ([²H₂]-32) wurde nach der Methode der Reduktion mit komplexen Metallhydriden durchgeführt. Bei dieser Reaktion wurden von dem reaktionsfreudigen Metallhydrid LiAID₄ Deuterid-Ionen auf das elektrophile Zentrum des Carbonyl-C-Atoms übertragen. Das entsprechende Additionsprodukt lieferte beim Zersetzen mit Wasser, in Gegenwart einer Säure, den entsprechenden Alkohol. Zur Synthese von deuteriertem Furfurylalkohol ([²H₂]-32) wurde das Säurechlorid Furoylchlorid eingesetzt, welches unter Verwendung des Metallhydrids Lithiumaluminiumdeuterid zum deuterierten Furfurylalkohol reduziert wurde (Abbildung 22).



Abbildung 22: Synthese von zweifach deuteriertem Furfurylalkohol ([²H₂]-32) aus Furoylchlorid.

Zur Synthese deuterierter Furyl-2-ylmethylbenzole wurde der deuterierte Furfurylalkohol ($[^{2}H_{2}]$ -32) unter den optimierten Bedingungen (**Tabelle 3**) mit Catechol (56) bzw. Pyrogallol (54) in wässriger Essigsäure (1 % in Wasser) für zwei Stunden bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurden die Reaktionsansätze mittels MPLC und semipräparativer HPLC auf gereinigt. Die synthetisierten Standards wurden mittels LC-MS/MS und NMR-Experimenten auf ihre Reinheit und auf die Inkorperation des Deuteriums untersucht. Die LC-MS-Spektren (ESI⁻) der beiden isotopenmarkierten Standards wiesen beide einen Zuwachs des Pseudomolekülions von zwei Masseneinheiten auf (*m*/*z* 189) für das unmarkierte 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64) und *m*/*z* 191 für das zweifach deuterierte $[^{2}H_{2}]$ -64; *m*/*z* 205 für das unmarkierte 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66) und *m*/*z* 207 für das zweifach deuterierte $[^{2}H_{2}]$ -66. Dies bestätigte die Inkorperation von zwei Deuterium-Atomen in das jeweilige Molekül (Abbildung 24).

Der Einbau der beiden Deuterium Atome in die beiden Moleküle wurde außerdem durch ¹H-NMR-Experimente bestätigt. In **Abbildung 23** ist exemplarisch das ¹H-NMR-Spektrum des Geschmackstoffes 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66) und des synthetisierten internen Standards [²H₂]-66 dargestellt. Das unmarkierte Pyrogallolprodukt wies sechs Resonanzsignale auf, die durch sieben Protonen hervorgerufen wurden (Abbildung 23A). Im Vergleich dazu fehlte im ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 23B) des deuterierten Pyrogallolproduktes das Signal bei 3,83 ppm welches für zwei Protonen integriert werden würde. Dies bestätigt dass in der deuterierten Probe an dieser Stelle des Moleküls keine koppelnden Protonen mehr vorhanden waren, da Deuterium-Atome eingebaut wurden. Alle weiteren Signale waren identisch mit denen des 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2ylmethyl)-benzol (66).



Abbildung 23: Ausschnitte aus den ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, d_4 -MeOH) und chemische Strukturen von 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66) (A) und 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-yl[²H₂]methyl)-benzol ([²H₂]-66) (B).

Für die Quantifizierung der Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate wurde eine LC-MS/MS Methode entwickelt. Hierbei wurde die zweifache Ionenselektion von "Mutter-" und "Tochterionen" im Q1 und Q3 eines Quadrupolgerätes für alle synthetisierten Verbindungen zur Detektion herangezogen. Die Bildung des Tochterions m/z 67 wurde bei allen im Kaffeegetränk nachgewiesenen Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivaten als "Quantifier" verwendet. Das zweite substanzspezifische Tochterion der jeweiligen Substanzen wurde als "Qualifier" eingesetzt. Die Intensitäten beider analysierten Tochterionen wurden durch die Optimierung der Ionisierungsparameter maximiert, so dass die Furan-2-ylmethylbenzole im MRM Modus über den Massenübergang von $[M-H] \rightarrow 67$ selektiv detektiert werden konnten. Die isotopenmarkierten internen Standards lieferten aufgrund der typischen Fragmentierung ebenfalls das analoge Tochterion von $[M-H]^- \rightarrow 67$ (Abbildung 24). Da nur das Catecholsowie das Pyrogalloladdukt isotopenmarkiert synthetisiert wurden, wurden die beiden Methylcatecholderivate 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (**68**) und das 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (**69**) aufgrund der kleineren Differenzen der Retentionszeiten über den internen Standard 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-yl[²H₂]methyl)-benzol ($[^{2}H_{2}]$ -**64**) quantifiziert.



Abbildung 24: Tochterionen-Spektren von 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64) (A) und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-yl[$^{2}H_{2}$]methyl)-benzol ([$^{2}H_{2}$]-64) (B). Mit der typischen Fragmentierung unter Abspaltung des Furans (ESI').

Die isotopenmarkierten internen Standards (IS) wurden mit den unmarkierten Standards in Verhältnissen von 0,01 bis 7 gemischt und mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Kalibrationsgeraden wurden durch Auftragen der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt / Fläche IS) gegen die Konzentration in mg/mL der Standardlösungen erhalten. Dies war möglich, da immer dieselben Gehalte an internem Standard für die Proben und Kalibrierlösungen verwendet wurden. In **Abbildung 25** ist die Kalibrationsgerade zur Auswertung des 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**64**) exemplarisch dargestellt.



Abbildung 25: Kalibrationsgerade zur Auswertung von 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)benzol (64) über den internen Standard 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-yl[${}^{2}H_{2}$]methyl)-benzol ([${}^{2}H_{2}$]-64).

Neben den synthetisierten Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivaten (64, 66, 68 und 69) wurden auch die Ausgangsverbindungen in den Kaffeegetränken quantitativ analysiert. In der Literatur sind unterschiedliche Messmethoden zur Analyse der Hydroxybenzole beschrieben, unter anderem die Untersuchung mittels GC-MS (*Tressl et al., 1978a, b, König und Sturm, 1982, Heinrich und Baltes, 1987, Boyd, 1994*), HPLC-UV (*Gerstenberg und Speck, 1986*) und die LC-MS/MS mittels SIVA (*Lang et al., 2006*). Die Bestimmung der Hydroxybenzole wurde in Anlehnung an die von *Lang et al. (2006*) beschriebene Methode durchgeführt. Da keine Absolutwerte bestimmt, sondern lediglich Tendenzen zwischen Kaffeeproben abgeschätzt werden sollten, wurde auf die Synthese isotopenmarkierter Standards verzichtet und die Hydroxybenzole mittels externer Kalibration per HPLC-MS/MS (ESI⁻, MRM-Mode) bestimmt. Mit dieser Methode sollten die Präkursoren der Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate (Catechol (56), Pyrogallol (54), 4-Methylcatechol (58) und 3-Methylcatechol (59)) bestimmt werden. Außerdem wurde noch der Hydroxybenzol-präkursor Kaffeesäure (1) in den Proben analysiert.

Zur Analyse der Di- und Trihydroxybenzole (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**) wurde wieder die selektive Bildung von Fragmentionen in der Kollisionszelle des Massenspektrometers eingesetzt. Die entsprechenden Hydroxybenzole lieferten reproduzierbare Tochterionen. Catechol (**56**) eliminierte Wasser (-18 amu) aus dem Molekül. Die beiden Methylcatechole spalteten selektiv die Methylgruppe (-15 amu) ab. Pyrogallol (**54**) hingegen bildete eine Vielzahl an Tochterionen. Hier wurde das Tochterion m/z 69 zur Quantifizierung verwendet. Die Kaffeesäure (1) fragmentierte unter Abspaltung der Säuregruppe zu einem Tochterion von m/z 135 (Abbildung 26).



Abbildung 26: Tochterionen-Spektren von Catechol (56) (A) und Kaffeesäure (1) (B) im ESI⁻ Modus.

Für die Kalibration der Di- und Trihydroxybenzole (54, 55, 56, 58, 59) und der Kaffeesäure (1) wurden die fünf zu untersuchenden Substanzen gemischt und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Kalibriergeraden wurden durch Auftragen der Flächen gegen die Konzentration in mg/mL der Standardlösungen erhalten. In Abbildung 27 ist die Kalibrationsgerade zur Auswertung des Dihydroxybenzols Catechol (56) exemplarisch dargestellt.



Abbildung 27: Kalibrationsgerade zur Auswertung von Catechol (56).

Neben den Di- und Trihydroxybenzolen stellte der Furfurylalkohol (32) den zweiten Reaktionspartner in den Modellreaktionen dar. Um die Konzentrationen dieser Verbindung in Kaffee zu analysieren, wurde auch hier eine LC-MS/MS-Methode mit externer Standardkalibrierung entwickelt. Zusätzlich zu dem Furanmolekül Furfurylalkohol (32) wurde das ebenfalls in hohen Konzentrationen vorkommende 5-Hydroxymethylfurfural (34) bestimmt. In Anlehnung an die Literatur (Teixidó et al., 2008) wurden die beiden Furanderivate mittels Atmospheric Pressure Ionisation (APCI) im positiven Modus mittels Multiple Reaction Monitoring (MRM-Mode) analysiert, da es hier zu einer besseren Fragmentierung der "Mutterionen" kam. Der Furfurylalkohol (32) lieferte hierbei das Tochterion von m/z 58 Quantifizierung eingesetzt wurde. Zur quantitativen welches zur Analyse des 5-Hydroxymethylfurfurals (34) wurde das Tochterion m/z 109 verwendet, welches durch eine Abspaltung von Wasser (18 amu) gebildet wurde (Abbildung 28).



Abbildung 28: Tochterionen-Spektrum von 5-Hydroxymethylfurfural (34) im APCI⁺ Modus.

Für die Kalibration der Furanderivate wurden die zwei zu untersuchenden Substanzen **32** und **34** gemischt und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Kalibriergeraden wurden durch Auftragen der Flächen gegen die Konzentrationen in mg/mL der Standardlösungen erhalten. In **Abbildung 29** ist die Kalibrationsgerade zur Auswertung des Furfurylalkohols (**32**) exemplarisch dargestellt.



Abbildung 29: Kalibrationsgerade zur Auswertung von Furfurylalkohol (32).

Zur quantitativen Bestimmung der Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate und deren Vorstufen wurden unterschiedlich aufgebrühte Kaffeegetränke untersucht. Zum einen wurden Standardkaffeegetränke (54 g/L) von definiert geröstetem Arabica- und Robusta-Kaffee (Röstbedingungen siehe **Tabelle 14**) bereitet. Zum anderen wurden kommerziell erhältliche Espresso-Mischungen (5-6 g Kaffeepulver je Kapsel) mit einer Espresso-Kaffeemaschine mit 19 bar Druck auf ein Endvolumen von 40 mL aufgebrüht (**Tabelle 13**). Standardmäßig wurde 1 mL jedes Kaffeegetränkes mit internem Standard versetzt und nach einer Equilibrierungszeit von 30 min wurden die Proben membranfiltriert. Die Lösung wurde direkt mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Die Analyse der quantitativen Daten für die Arabica-Standardkaffeegetränke zeigte, dass die vier synthetisierten Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68) und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methyl-benzol (69) in allen gerösteten Proben nachweisbar waren (Abbildung 30). In den ungerösteten Proben konnte keine der genannten Verbindungen mittels HPLC-MS/MS-Analyse nachgewiesen werden. Durch die Messungen der unterschiedlich gerösteten Proben konnte gezeigt werden, dass die Gehalte der Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate vom Röstgrad der Kaffeeproben abhängen. Die größte Abhängigkeit vom Röstgrad zeigte das 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64) (Abbildung 30A, B). In einem schwach gerösteten Arabica-Kaffee (230 °C, 180 s, 113 SKT) wurde das 1,2-Dihydroxy-4-

(furan-2-ylmethyl)-benzol (**64**) mit 110 μg/L bestimmt. Wohingegen in einem stark gerösteten Kaffee (263 °C, 180s, 41 SKT) die Konzentration der Verbindung **64** mit 1300 μg/L zehnfach höher war als in dem schwach gerösteten Arabica-Kaffee.

Es zeigten sich keine Unterschiede in den unterschiedlich durchgeführten Röstexperimenten. Die Konzentrationsgehalte verhielten sich in den Proben, die bei 265 °C für unterschiedliche Zeiten geröstet wurden, genauso wie die Proben, die für 180 s bei unterschiedlichen Temperaturen erhitzt wurden. Ausschlaggebend für die nachgewiesenen Konzentrationen ist somit die Röstfarbe der Kaffeebohnen.

Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchung der Di- und Trihydroxybenzole stimmten mit den Daten der Literatur (Lang et al., 2006) überein. In den Proben, die aus ungerösteten Kaffeebohnen aufgebrüht wurden, konnte nur Kaffeesäure nachgewiesen werden. Keines der untersuchten Di- und Trihydroxybenzole war in detektierbaren Mengen enthalten. Erst durch den Prozessschritt des Röstens wurden die Di- und Trihydroxybenzole in den Kaffeebohnen gebildet. Die Konzentrationen von Catechol (56), 4-Methylcatechol (58) und 3-Methylcatechol (59) zeigten eine Abhängigkeit vom Röstgrad (Abbildung 30C, D). Während in schwach geröstetem Arabica-Kaffee mit 113 SKT ein Catecholgehalt (56) von 742 µg/L detektiert wurde, stieg dieser im Verlauf einer stärkeren Röstung mit 67 SKT auf 1938 µg/L an. Diese Tendenz konnte durch einen weiteren noch stärker gerösteten Kaffee mit 41 SKT bestätigt werden. Hier wurde der Catecholgehalt auf 5176 µg/L bestimmt. Je stärker eine Probe geröstet wurde, desto höher waren die nachgewiesenen Gehalte. Der Pyrogallolgehalt (54) der Proben war sowohl bei leicht (113 SKT mit 2034 µg/L) als auch bei stark (41 SKT mit 2331 µg/L) gerösteten Kaffee auf demselben Level. Während die Kaffeesäuregehalte (1) mit steigendem Röstgrad zurückgingen (359 µg/L in einem schwach gerösteten Robusta-Kaffee mit 113 SKT auf 146 µg/L in einem stark gerösteten Arabica-Kaffee mit 41 SKT).

Bei der Untersuchung der Furanderivate in der Röstreihe von definiert gerösteten Arabica-Kaffeeproben war eine deutliche Zunahme des Furfurylalkoholgehaltes (**32**) in Abhängigkeit von der Röstung festzustellen. Die 5-Hydroxymethylfurfuralgehalte (**34**) gingen mit steigendem Röstgrad von 10 mg/L in schwach geröstetem Arabica-Kaffee (113 SKT) auf 2,8 mg/L in stark geröstetem Arabica-Kaffee (41 SKT) zurück (**Abbildung 30E, F)**.



Abbildung 30: Abhängigkeit der Konzentrationen an 1, 32, 34, 54, 56, 58, 59, 64, 66, 68 und 69 in unterschiedlich gerösteten Arabica-Kaffeeproben (die Angabe der Röstparameter erfolgt in SKT). Rösttemperatur 265 °C und unterschiedliche Röstdauer (A, C, E) bzw. Röstdauer 180 s und unterschiedliche Rösttemperaturen (B, D, F). (Die Daten sind in den Tabellen im Anhang 1, 2 und 3 aufgelistet. Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in Tabelle 14 aufgelistet). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf Abbildung 4, 6, 9 und 16.

Für die Robusta-Kaffeeproben wurden dieselben Abhängigkeiten vom Röstgrad nachgewiesen wie für die Arabica-Kaffeeproben. Die Gehalte der 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2ylmethyl)-benzol (**64**) Konzentrationen stiegen von einem leicht gerösteten Robusta-Kaffee mit 111 SKT von 67 μg/L auf 1412 μg/L in einem stark gerösteten Robusta-Kaffee mit 51 SKT. Der Unterschied im Vergleich zu den Arabica-Proben lag darin, dass das 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**66**) in keiner Robusta-Probe nachgewiesen werden konnte. Die beiden methylierten Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate (**68** und **69**) zeigten die ähnlichen Konzentrationsbereiche wie in den Arabica-Kaffeeproben (**Abbildung 31A, B**).

Die ebenfalls als Standardkaffeegetränk zubereiteten Robusta-Kaffeeproben zeigten dieselben Konzentrationsbereiche und Abhängigkeiten für die untersuchten Di- und Trihydroxybenzole (**56**, **58**, **59**, **54** und **1**) wie die Arabica-Kaffeeproben. Während die Catecholgehalte (**56**) sowie die 3- und 4-Methylcatechol (**58**, **59**) Konzentrationen in den Robusta-Kaffeeproben anstiegen, gingen die Kaffeesäuregehalte (**1**) mit steigendem Röstgrad von 412 µg/L auf 177 µg/L zurück (**Abbildung 31C**, **D**).

Die Furanderivate Furfurylalkohol (**32**) und 5-Hydroxymethylfurfural (**34**) zeigten in den Robusta-Kaffeeproben analoge Abhängigkeiten vom Röstgrad wie in den Arabica-Kaffeeproben (**Abbildung 31E**, **F**). In einem leicht gerösteten Robusta-Kaffee (111 SKT, 245 °C, 180 s) wurde der Gehalt von Furfurylalkohol auf 24 mg/L bestimmt, welcher mit steigendem Röstgrad auf 43 mg/L anstieg (51 SKT, 169 °C, 180 s). Die Gehalte an 5-Hydroxymethylfurural nahmen von 3,3 mg/L in einem leicht gerösteten Kaffee (111 SKT) auf 1 mg/L in einer stark gerösteten Kaffeeprobe (51 SKT) ab.

Ebenso wie bei den Arabica-Proben hatte auch bei den Robusta-Proben die Art des Röstens keinen Einfluss auf die analysierten Konzentrationsgehalte. Für die Proben, die bei 265 °C geröstet wurden, wurden dieselben Konzentrationsbereiche detektiert, wie bei den Proben die für 180 s bei unterschiedlichen Temperaturen erhitzt wurden. Somit spielt lediglich der finale Bräunungsgrad der Proben eine Rolle.



Abbildung 31: Abhängigkeit der Konzentrationen an 1, 32, 34, 54, 56, 58, 59, 64, 68 und 69 in unterschiedlich gerösteten Robusta-Kaffeeproben (die Angabe der Röstparameter erfolgt in SKT). Rösttemperatur 265 °C und unterschiedliche Röstdauer (A, C, E) bzw. Röstdauer 180 s und unterschiedliche Rösttemperaturen (B, D, F). (Die Daten sind in den Tabellen im Anhang 1, 2 und 3 aufgelistet. Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in Tabelle 14 aufgelistet). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf Abbildung 4, 6, 9 und 16.

In den untersuchten Espresso-Proben lagen die nachgewiesenen Gehalte der Furan-2ylmethylhydroxybenzol-Derivate über denen der zuvor untersuchten Standardkaffeegetränke (**Tabelle 7**). Am ausgeprägtesten war dies für die Catechol- und Pyrogallolderivate sichtbar. Die Gehalte lagen ca. Faktor 2 - 3 oberhalb der Werte der Standardkaffeegetränke. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass für die Zubereitung der Espresso-Kaffeegetränke mehr als die doppelte Menge an Kaffeepulver eingesetzt wurde (12,5 g/100 mL). Bei den Espresso-Proben war wiederum eine Abhängigkeit des Analytgehaltes vom Röstgrad sichtbar. Die heller gerösteten Espresso-Kaffeeproben 1 - 5 wiesen niedrigere Gehalte der Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate auf als die Espresso-Proben 6 - 8. Aufgrund der fehlenden Informationen zu den genauen Röstbedingungen der kommerziell erhaltenen Proben, konnte die Einteilung des Röstgrades dieser Proben lediglich über einen visuellen Farbvergleich der einzelnen Kaffeepulver durchgeführt werden. Eventuelle Schwankungen innerhalb einer Probenreihe konnten daher nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Einfluss auf die unterschiedlichen Gehalte zwischen den Espresso-Kaffeeproben und den Standardkaffeegetränken konnte auf die unterschiedliche Aufbrühmethoden zurückgeführt werden. Unter Druck wurden höhere Gehalte an Inhaltsstoffen herausgelöst als bei der herkömmlichen Variante zur Herstellung eines Standardkaffeegetränkes.

Tabelle 7: Gehalte [µg/L] der Furan-2-ylmethylhydroxybenzole 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66) in Espresso-Kaffeegetränken.

	Konzentration [μg/L] ^a			
Espresso-Probe	68 ^b	69 ^b	64 ^b	66 ^b
1	72 ± 0,7	76 ± 0,2	770 ± 3,9	1010 ± 19,0
2	72 ± 0,2	78 ± 6,2	853 ± 42,3	1015 ± 26,0
3	81 ± 2,0	94 ± 2,7	1284 ± 33,0	1269 ± 39,0
4	89 ± 1,2	104 ± 4,1	1528 ± 99,7	1314 ± 19,0
5	79 ± 2,0	87 ± 1,9	1287 ± 32,0	1292 ± 104,0
6	89 ± 1,2	99 ± 13,5	1849 ± 184,7	1652 ± 69,0
7	105 ± 0,3	116 ± 10,1	2035 ± 104,4	2008 ± 12,0
8	92 ± 0,3	103 ± 2,0	2477 ± 110,0	1633 ± 37,0

^a Mittelwert ± Standardabweichung (μ g/L) aus n = 3 (einzelne Getränke), ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 16**. Die Intensität der Espresso-Getränke ist in **Tabelle 13** aufgeführt.

Die unterschiedliche Perkolation der Espresso-Proben zeigte in Bezug auf die Di- und Trihydroxybenzole nicht denselben Effekt wie bei der Analyse der Furan-2ylmethylhydroxybenzol-Derivate. Im Falle der Di- und Trihydroxybenzole lagen die Konzentrationsbereiche, die in den Kaffeegetränken analysiert wurden, etwa bei den doppelten Gehalten im Vergleich zu den Proben, die als Standardkaffeegetränk aufgegossen wurden (**Tabelle 8**). Dies konnte durch die höheren Konzentrationen des eingesetzten Kaffeepulvers erklärt werden.

Tabelle 8: Gehalte [µg/L] der Di- und Trihydroxybenzole Catechol (56), 4-Methylcatechol (58), 3-Methylcatechol (59), Pyrogallol (54) und Kaffeesäure (1) in Espresso-Kaffeegetränken.

	Konzentration [µg/L] ^a				
Espresso-Probe	56 ^b	58 ^b	59 ^b	54 ^b	1 ^b
1	4351 ± 118,7	652 ± 18,8	164 ± 59,6	3871 ± 110,0	296 ± 39,0
2	4582 ± 0.0	588 ± 12,5	185 ± 18,3	4401 ± 60,0	163 ± 81,5
3	5519 ± 25,0	660 ± 15,0	191 ± 25,3	4401 ± 100,0	272 ± 23,0
4	5901 ± 31,3	665 ± 0,0	187 ± 2,0	3991 ± 50,0	$309 \pm 36,0$
5	5307 ± 12,5	579 ± 11,3	200 ± 9,2	4501 ± 40,0	307 ± 12,0
6	7351 ± 418,7	673 ± 15,0	223 ± 22,5	4441 ± 60,0	213 ± 0,0
7	6882 ± 37,5	773 ± 15,0	177 ± 8,5	4311 ± 90,0	254 ± 5,0
8	7401 ± 18,7	669 ± 3,8	190 ± 19,5	1911 ± 90,7	314 ± 5,0

^a Mittelwert ± Standardabweichung (μ g/L) aus n = 3 (einzelne Getränke), ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4** und **9**. Die Intensität der Espresso-Getränke ist in **Tabelle 13** aufgeführt.

Bei der Analyse der quantitativen Daten der Furanderivate fiel besonders auf, dass bei den Espresso-Kaffeeproben um Faktor 2 - 3 höhere Furfurylalkoholgehalte nachgewiesen wurden als in den Standardkaffeegetränken (**Tabelle 9**). Die 5-Hydroxymethylfurfuralgehalte (**34**) wurden in den in denselben Konzentrationsbereichen von 1,5 – 11,8 mg/L Kaffeegetränk in den drei unterschiedlichen Kaffeesorten nachgewiesen.

Für die untersuchten Espresso-Mischungen konnte keine einheitliche Tendenz der Furfurylalkoholaddukte in Abhängigkeit von der Farbe der Kaffeeproben festgestellt werden. Da die Zuordnung der Stärke der Espresso-Mischungen rein visuell durchgeführt wurde, kann die Zuordnung mit Fehlern behaftet sein.

	Konzentration [mg/L] ^a		
Espresso-Probe	32 ^b	34 ^b	
1	137 ± 0,26	9,7 ± 0,011	
2	128 ± 0,20	11,1 ± 0,060	
3	$168 \pm 2,00$	$9,7 \pm 0,001$	
4	153 ± 0,26	$6,5 \pm 0,033$	
5	161 ± 1,80	$6,3 \pm 0,035$	
6	$173 \pm 0,94$	$5,3 \pm 0,031$	
7	141 ± 0,31	$6,7 \pm 0,000$	
8	152 ± 1,07	6,9 ± 0,010	

Tabelle 9: Gehalte [mg/L] an Furfurylalkohol (32) und 5-Hydroxymethylfurfural (34) in Espresso-Kaffeegetränken.

^a Mittelwert ± Standardabweichung (mg/L) aus n = 3 (einzelne Getränke). ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 6.** Die Intensität der Espresso-Getränke ist in **Tabelle 13** aufgeführt.

2.1.6 Diskussion

Zur Generierung von bisher noch nicht in Kaffee nachgewiesenen, geschmacksaktiven Substanzen wurde ein vereinfachtes Röstsystem entwickelt. Bei diesem wurden binäre Mischungen aus reaktiven Kaffeeinhaltsstoffen auf ein Trägermaterial aufgetragen und im Anschluss bei hohen Temperaturen erhitzt. Für erste Untersuchungen wurde mit Catechol (56) begonnen, welches mit Furfurylalkohol (32) umgesetzt wurde. Im Anschluss an den Röstprozess konnte bei der Untersuchung mittels spektroskopischer Methoden das Reaktionsprodukt 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64) in der Reaktionsmischung nachgewiesen werden. Es konnte anschließend gezeigt werden, dass das Reaktionsprodukt 64 auch in wässrigen Laborsystemen generiert werden konnte, wodurch die Verwendung eines wässrigen Systems als geeignet und effektiver erschien als die Röstansätze. Dieses Modellsystem wurde zur Generierung weiterer geschmacksaktiver Substanzen aus den im Kaffee enthaltenen Di- und Trihydroxybenzolen Pyrogallol (54), Hydroxyhydrochinon (55), 3-Methylcatechol (59), 4-Methylcatechol (58) und den jeweiligen Präkursoren Chlorogensäure (7) und Kaffeesäure (1) verwendet. Außerdem wurde noch das Dihydroxybenzol Resorcin (63) untersucht. Für alle eingesetzten Di- und Trihydroxybenzole (54 - 56, 59, 58, 63) konnte eine Produktbildung mit Furfurylalkohol (32) nachgewiesen werden. Bei den Reaktionsmischungen, die Chlorogensäure (7) und Kaffeesäure (1) enthielten, konnten keine Reaktionsprodukte detektiert werden. Um das Laborsystem auf ein Optimum an Ausbeute der Produkte zu untersuchen, wurden diverse Parameter, wie pH-Wert, Reaktionsmedium, Erhitzungsdauer und das Phenol/Furan Verhältnis variiert.

Ergebnisse

Aufgrund der Tatsache, dass die Reaktionsprodukte lediglich unter sauren Bedingungen entstehen, wurde ein säurekatalysierter Reaktionsmechanismus postuliert (**Abbildung 32**). Bei diesem reagierte der Furfurylalkohol (**32**) mit einem Proton der Säure zum reaktiven Furfurylkation (<u>1</u>, <u>2</u>), welches im Anschluss in einer elektrophilen Substitution mit den Di- und Trihydroxybenzolen (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**, **63**) zu den bitteren und adstringierenden Furan-2ylmethyliertenbenzolen reagierte. So konnten bei diesen Reaktionen mit diversen Di- und Trihydroxybenzolen die sechs Reaktionsprodukte 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**64**), 1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**65**), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)benzol (**66**), 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**67**), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)benzol (**68**) und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (**69**) isoliert werden.



64, 65, 66, 67, 68, 69

Abbildung 32: Postulierter Reaktionsmechanismus zur Bildung von 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2ylmethyl)-benzol (64), 1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (65), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66), 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (67), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69) aus den Di- und Trihydroxybenzolen (54, 55, 56, 58, 59, 63) und Furfurylalkohol (32). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 4, 6, 9, 11 und 16.

Analog zu den Modellansätzen mit Furfurylalkohol (32) wurden dieselben Reaktionen unter Verwendung von Furfural (33) und 5-Hydroxymethylfurfural (34) mit denselben Di- und Trihydroxybenzolen 54, 55, 56, 58, 59, 63 und mit Chlorogensäure (7) sowie Kaffeesäure (1) im wässrigen Medium durchgeführt. Bei der Analyse der aufgenommenen RP-HPLC-DAD Chromatogramme zeigte sich, dass bei beiden eingesetzten Furanderivaten lediglich Produkte mit den Hydroxybenzolen Resorcin (63) und Pyrogallol (54) entstanden sind. Diese beiden Substanzen trugen Hydroxygruppen in meta-Position am aromatischen Ring (Abbildung 33). Bei der Reaktionen mit Furfural (33) entstanden die disubstituierten Reaktionsprodukte 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3-dihydroxybenzol (70) und 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-trihydroxybenzol (71), welche aufgrund einer Spiegelachse im Molekül identische und somit doppelte Signalintensitäten im ¹H-NMR-Spektrum für die Protonen im aromatischen Ringsystem hervorriefen. Im Falle der Reaktionen mit 5-HMF (34), welches ein struktureller Hybrid aus Furfurylalkohol (32) und Furfural (33) in der Anordnung der reaktiven Gruppen darstellt, reagierten jeweils drei Moleküle der Hydroxybenzole (63 und **54**) unter Bildung von 4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2furanyl]methylen]bis-1,3-dihydroxybenzol (72) und 4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,2,3-trihydroxybenzol (73). Es konnten weder einfach noch disubstituierte Reaktionsprodukte in den Reaktionsmischungen nachgewiesen werden.

Da alle Reaktionsprodukte bis auf 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64) nur unter wässrigen Bedingungen generiert wurden, wurden im Anschluss an die Strukturaufklärung alle Reaktionsmischungen unter Röstbedingungen erhitzt, um die Bildung im Röstsystem zu verifizieren. Bei den Ansätzen, die Furfurylalkohol (32) und Furfural (33) enthielten, konnten dieselben Reaktionsprodukte unter Modellröstbedingungen generiert werden, wie in den wässrigen Systemen. Für die untersuchten Reaktionsmischungen, die 5-HMF (34) enthielten, konnten allerdings unter Röstbedingungen keine Produkte generiert werden.



Abbildung 33: Postulierter Reaktionsmechanismus zur Bildung von 4,4'-(Furan-2ylmethandiyl)bis-1,3-dihydroxybenzol (70), 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-trihydroxybenzol (71), 4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,3-dihydroxybenzol (72), 4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,2,3-trihydroxy-benzol (73) aus den Di- und Trihydroxybenzolen Resorcin (63) und Pyrogallol (54) mit Furfural (33) bzw. 5-HMF (34). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 9, 18 und 20.

Neben der Strukturaufklärung der Röstprodukte lag der Fokus auf einer sensorischen Evaluierung. Dabei war vor allem der direkte Vergleich zu den Präkursoren interessant. Mit Hilfe dieser Studie sollte der etwaige Beitrag der einzelnen Geschmackstoffe zum Kaffeegeschmack ermittelt werden. Alle generierten Substanzen besaßen ebenso wie die zur Reaktion eingesetzten Di- und Trihydroxybenzole (**54 - 56, 58, 59 und 63**) ein ausgeprägtes

56

Ergebnisse

adstringierendes Mundgefühl und einen bitteren Geschmack. Die niedrigste Geschmacksschwelle wurde für die Bitterkeit von 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3methylbenzol (69) mit 100 µmol/L detektiert. Die niedrigste Geschmacksschwelle für das adstringierende Mundgefühl zeigte 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (67) mit 20 µmol/L. Jede Reaktion eines Di- und Trihydroxybenzols (54, 55, 56, 58, 59, 63) mit einem Furanderivat äußerte sich in einer Änderung der Geschmacksschwellenwerte. Bei der Reaktion mit Furfurylalkohol (32) erniedrigte sich für alle eingesetzten Di- und Trihydroxybenzole (54, 55, 56, 58, 59, 63) sowohl der Geschmacksschwellenwert für die Adstringenz als auch für die Bitterkeit. Die größten Unterschiede in der bitteren Erkennungsschwelle zeigte dabei das Hydroxyhydrochinon (55), bei dessen Reaktionsprodukt 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (67) erniedrigte sich die Erkennungsschwelle durch die Substitution von Furfurylalkohol (32) von 1300 µmol/L auf 300 µmol/L. Bei der Betrachtung der Schwellenwerte für die Adstringenz wies das 4-Methylcatecholderivat (68) die größte Verringerung im Vergleich zum 4-Methylcatechol (58) auf. Hier verringerte sich der Schwellenwert um den Faktor 6 durch die Reaktion mit Furfurylalkohol (32). Als einzige Ausnahme ist das Pyrogallolderivat (66) zu nennen, denn in diesem Fall änderten sich die Schwellenwerte durch eine Substitution von Furfurylalkohol (32) nicht. Der Geschmacksschwellenwert für die Bitterkeit lag sowohl beim Pyrogallol (54) als auch beim 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (54) bei 300 µmol/L und für die Adstringenz bei ca. 70 µmol/L.

Ein uneinheitliches Bild in der sensorischen Evaluierung zeigten die Reaktionen mit Furfural (33) und 5-HMF (34). Während sich bei der Betrachtung der Resorcinprodukte 70 und 72 sowohl für die Bitterkeit als auch für die Adstringenz zeigte, dass die Substitution eines Furanderivates in jedem Fall zu einer Absenkung der Geschmacksschwellen führte, ergab es bei den Pyrogallolderivaten 71 und 73 einen Anstieg in der Erkennungsschwelle für die Bitterdetektion im Vergleich zum unsubstituierten Pyrogallol (54). Die Geschmacksschwellen werte für die Adstringenz verringerten sich wie bei der Reaktion von Resorcin (63) mit Furfural (33) oder 5-HMF (34). Trotz der Erniedrigung der Geschmacksschwellen durch die Substitution mit Furanderivaten waren die generierten Substanzen vergleichsweise weniger potente Bitterstoffe als die von *Frank et al. (2006 und 2008)* evaluierten Laktone, deren Geschmacksschwellen zwischen 9,8 und 180 µmol/L lagen, oder als die Phenylindane mit Bitterschwellen zwischen 23 und 178 µmol/L (*Frank et al., 2007*).

Zur Identifizierung der generierten Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate im Kaffeegetränk wurde ein frisch aufgebrühter Kaffee direkt mittels HPLC-MS/MS-Analyse untersucht. Es konnten die aus Furfurylalkohol und den Di- und Trihydroxybenzolen generierten Substanzen 64, 66, 68 und 69 nachgewiesen werden, während die Reaktionsprodukte des Furfurals 70 und 71 und des 5-HMF 72 und 73 nicht im Kaffeegetränk detektiert werden konnten. Im Falle

des Furfurals stellte sich die Frage, ob es nicht möglich sei, dass mehrere identische Hydroxybenzole während des Röstprozesses in ausreichender Menge mit einem Molekül Furfural reagieren konnten, und somit keine nennenswerten Mengen an disubstituierten Produkten generiert wurden. Das Ergebnis, dass kein 5-HMF (**34**) substituiertes Produkt im Kaffeegetränk nachgewiesen wurde, bestätigte die Ergebnisse der vorherigen Röstexperimente mit dieser Substanz. Denn auch hier konnten die im wässrigen Medium generierten Substanzen nicht nachgewiesen werden.

Um die Entwicklung der Geschmacksstoffe während des Röstprozesses quantitativ zu überprüfen, wurden Kaffeeproben unterschiedlichen Röstgrades mit Hilfe einer SIVA untersucht. Zusätzlich zu den Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivaten wurden außerdem die Di- und Trihydroxybenzole (54, 55, 56, 58, 59, 63) sowie die Furanderivate Furfurylalkohol (32) und 5-HMF (34) analysiert.

Alle im Kaffeegetränk nachgewiesenen Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate (64, 66, 68 und 69) zeigten bei der quantitativen Analyse eine Zunahme in Abhängigkeit vom Röstgrad. In den ungeröstetem Kaffeeproben konnte keines der Produkte nachgewiesen werden. Wohingegen in den stark gerösteten Arabica-Kaffeeproben Gehalte bis hin zu 1200 µg/L vom Reaktionsprodukt 64 nachgewiesen werden konnten. Bei der Analyse der Di- und Trihydroxybenzole (54, 55, 56, 58, 59, 63) fiel auf, dass die Gehalte von Catechol (56) und auch von Pyrogallol (54) im Vergleich zu den Methylcatecholen (58 und 59) um den Faktor 10 höher lagen. Lediglich Catechol (56) zeigte eine Abhängigkeit der Konzentration vom Röstgrad. Je stärker eine Probe geröstet wurde, desto höher waren die Catecholgehalte. Hingegen wies die Kaffeesäure (1) in rohen Kaffeebohnen höhere Gehalte auf als in gerösteten Proben. Mit steigendem Röstgrad erniedrigten sich die Gehalte an Kaffeesäure (1) im Kaffeegetränk.

Die analysierten Konzentrationen von Furfurylalkohol (**32**) lagen in Bereichen zwischen 20 und 50 mg/L Standardkaffeegetränk. Die Gehalte von 5-HMF (**34**) lagen etwa um den Faktor 10 unterhalb dieser Werte. Für den Furfurylalkoholgehalt (**32**) konnte eine Abhängigkeit vom Röstgrad detektiert werden. Es zeigte sich, dass in ungeröstetem Kaffee kein Furfurylalkohol (**32**) enthalten war und mit steigendem Röstgrad die Gehalte zunahmen. Auch wenn in einem Extrakt aus rohen Kaffeebohnen kein 5-HMF (**34**) nachgewiesen werden konnte, zeigten die schwach gerösteten Kaffeeproben die höchsten Gehalte an 5-HMF (**34**), welche mit stärkerer Röstung wieder abnahmen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von *Moon und Shibamoto (2009).*
2.2 Struktur und Bildung von Bitterstoffen aus Polyphenol/ Kohlenhydrat-Reaktionen

2.2.1 Identifizierung von Polyphenol/Kohlenhydrat-Reaktionsprodukten

Bisherige Modellstudien (siehe Kapitel 2.1) fokussierten sich auf die Bitterstoffbildung aus dem Polyphenolabbau. Um zu untersuchen, welche Bitterstoffe aus der Reaktion von Polyphenolen mit Kohlenhydraten unter *Maillard*-Bedingungen hervorgehen, wurden im Folgenden Modellröstexperimente mit Saccharose (majores Saccharid in Kaffee), der mengenmäßig dominierenden Aminosäure L-Asparagin sowie der Kaffeesäure (1) (dem Polyphenol-Strukturelement der Chlorogensäure) durchgeführt.

Um in der Reaktionsmischung Produkte zu identifizieren, welche unter *Maillard*-Bedingungen gebildet werden, wurden eine ternäre Mischung aus Saccharose, L-Asparagin und Kaffeesäure (1) im molaren Verhältnis von 5:1:1 bzw. binären Mischungen aus Saccharose und Kaffeesäure (1) (5:1) sowie L-Asparagin und Kaffeesäure (1) (1:1) unter Modellröstbedingungen erhitzt und mittels HPLC-DAD Analyse analysiert.

Dazu wurden alle drei Reaktionsansätze in angefeuchtetem Quarzsand homogenisiert und für 15 min auf 200 °C erhitzt. Um die Verbindungen vom Trägermaterial zu trennen, erfolgte eine Extraktion mit Methanol. Das Lösungsmittel wurde filtriert und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Nach Lösen des Rückstandes in Wasser erfolgte eine Extraktion mit Ethylacetat. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und unter reduziertem Druck entfernt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden in Wasser/Methanol (7/3; v/v) gelöst, membranfiltriert und mittels RP-HPLC in Verbindung mit einem Diodenarraydetektor analysiert.

Abbildung 34 zeigt den analytischen Vergleich der drei erhitzten Proben. Alle drei Proben enthielten noch hohe Konzentrationen an Kaffeesäure (1). Außerdem konnten die in der Literatur beschriebenen Phenylindane *trans*- und *cis*-5,6-Dihydroxy-1-methyl-3-(3´,4´dihydroxyphenyl)indan (**45** und **46**) (*Frank et al., 2006 und 2008, Blumberg et al., 2010*), sowie hohe Konzentrationen an 4-Vinylcatechol (**44**), welches durch die Zersetzung von Kaffeesäure (1) gebildet wird, identifiziert werden (*Frank et al., 2006*). In den Mischungen, in denen Saccharose beinhaltet war (**Abbildung 34B** und **C**), waren außerdem hohe Konzentrationen an 5-Hydroxymethylfurfural (**34**) detektierbar. Die Identifizierung der gebildeten Verbindungen wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten, durch die charakteristischen UV-Spektren und durch Co-Chromatographie mit den entsprechenden Referenzsubstanzen durchgeführt. Bei der Betrachtung des HPLC Chromatogramms der ternären Mischung (Abbildung 34C) konnten zwei Reaktionsprodukte (74 und 75) bei Retentionszeiten von 20,5 und 21,8 min detektiert werden, welche in den beiden binären Mischungen nicht auftraten. Das Reaktionsprodukt 74 wies UV-Maxima bei 224 und 284 nm auf. Das Umsetzungsprodukt 75 zeigte Maxima bei 236 und 284 nm. Bei ersten sensorischen Untersuchungen dieser Reaktionsprodukte wurde ein Bittergeschmack identifiziert.



Abbildung 34: RP-HPLC Chromatogramme (λ =280 nm) der Modellreaktion von L-Asparagin und Kaffeesäure (1) (A); Saccharose und Kaffeesäure (1) (B) und einer ternären Mischung aus Saccharose, L-Asparagin und Kaffeesäure (1) (C). Die Reaktionsprodukte sind mit 74 und 75 markiert. Die Bezifferung der Strukturen bezieht sich auf Abbildung 4, 6, 8, 9 und 36.

Zur Isolierung der in der ternären Mischung generierten Produkte **74** und **75** wurde der Modellröstansatz in einer größeren Dimension wiederholt. In einem ersten Schritt erfolgte die Isolierung der Produkte **74** und **75** mittels MPLC auf RP-18 Material. Die finale Aufreinigung folgte im Anschluss mittels semipräparativer RP-18-HPLC. Nach Gefriertrocknung wurden die beiden Reaktionsprodukte, die beide ein Molekulargewicht von 262 Da zeigten, als weiße amorphe Pulver mit einer Reinheit von 98 % (HPLC, NMR) erhalten. Die LC-MS-TOF Analyse der beiden Produkte ergab ein Molekülion von *m/z* 261,0768 (**74**, **75**), welches für beide Moleküle auf eine elementare Zusammensetzung von C₁₄H₁₄O₅ hindeutete.

Bei Betrachtung der ¹H-NMR-Daten (**Abbildung 35**) wurden elf Resonanzsignale erhalten, deren Integration elf Protonen ergab. Für Produkt **74** zeigten die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstanten der zwei aromatischen Protonen H-C(3'), H-C(4') mit 8,1 Hz das typische Kopplungsmuster von zwei Protonen, die im aromatischen System direkt nebeneinander lagen. Das dritte Proton H-C(6') koppelte über eine long-range Kopplung von 1,8 Hz mit dem Proton H-C(4'). Somit wurde hier die intakte Dihydroxyphenoleinheit der Kaffeesäure (**1**)bestätigt. In dem HMBC-Spektrum konnte eine Kopplung zwischen den beiden Protonen H-C(4') und H-C(6') mit dem Kohlenstoff in Position C(5) identifiziert werden. Dies war ein Indiz dafür, dass die Position C(5') des Phenolrings mit dem Kohlenstoff C(5) verknüpft war. Mit den COSY-Korrelationen der Protonen H-C(5) zu H-C(6α) (1,92 ppm) und H-C(6β) (2,89 ppm) wurde die Position des diastereotropen Kohlenstoffatoms C(6) identifiziert. Der zweite direkte Nachbar der Position C(6) wurde ebenfalls über das COSY-Spektrum identifiziert. Hier war eine Kopplung der Protonen H-C(6) zu dem Proton in Position H-C(7) sichtbar. Über die HMBC-Korrelationen des Protons in Position H-C(7) und dem olefinischen Proton H-C(2) zu dem selben Carbonylkohlenstoffatom C(1) bei 199,23 ppm, wurde die Verknüpfung der Positionen C(7), C(1), C(2) und C(3) bestätigt. Das HMBC zeigte ebenfalls, dass die Protonen H-C(5), H-C(8) und H-C(3) mit demselben quartären Kohlenstoff in Position C(4) koppelten. Aufgrund der HMBC-Kopplung von C(4) zu dem Proton in Position H-C(7) und aufgrund der Tieffeldverschiebung der Protonen H-C(7) und H-C(8) war eine Verknüpfung der Kohlenstoffatome C(4) und C(7) über ein Heteroatom anzunehmen.





Das Reaktionsprodukt **75** zeigte ein nahezu identisches ¹H-NMR-Spektrum wie Verbindung **74**. Mit dem Unterschied, dass die beiden Signale der Protonen H-C(6α) und H-C(6β) bei 2,32 und 2,48 ppm näher beieinander lagen und die beiden Protonen der Positionen H-C(8α) und H-C(8β) bei 3,19 und 3,43 ppm im *exo*-konfigurierten Produkt **75** zum einen hochfeld verschoben waren und weiter auseinander lagen als die Protonen H-C(8α) und H-C(8β) (3,72 und 3,84 ppm) im *endo*-konfigurierten Produkt **74**. Die Differenzierung der beiden isolierten Reaktionsprodukte **74** und **75** mit derselben molekularen Masse von 262 Da erfolgte aufgrund der vicinalen Kopplung zwischen H-C(5) und H-C(6α) mit 7,0 Hz und zwischen H-C(5) und H-C(6β) mit 10,0 Hz. Durch den Vergleich der Spektrendaten mit denen, die in der Literatur von Descurimin (*Snider, 2006*) veröffentlich sind, wurden diese Kopplungskonstanten dem *endo*-Isomer (**74**) zugeordnet. Die Kopplungskonstanten in dem *exo*-Isomer (**75**) veränderten sich aufgrund der strukturellen Unterschiede. Bei der Verbindung in der *exo*-Konformation vergrößert sich die Kopplungskonstante der Protonen H-C(5) und H-C(6α) auf 9,0 Hz und die Kopplungskonstante zwischen den Protonen H-C(5) und H-C(6β) verkleinerte sich auf 3,2 Hz. Unter Berücksichtigung aller spektroskopischer Daten konnten die beiden Reaktionsprodukte aus der Reaktion von Saccharose, L-Asparagin und Kaffeesäure (**1**) als das *endo*-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74**) und das *exo*-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]-



Abbildung 36: Chemische Strukturen der Reaktionsprodukte *endo-*6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74) und *exo-*6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75), welche unter den Bedingungen der Hydroxyzimtsäure-*Maillard*-Reaktionen gebildet werden.

2.2.2 Studien zur Bildung der 8-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on-Reaktionsprodukte

Um einen tieferen Einblick in die Bildung der 8-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on-Reaktionsprodukte zu erhalten, wurden unterschiedliche Reaktionskonditionen optimiert. Neben der Untersuchung der Abhängigkeit von der Temperatur wurden auch verschiedene Aminosäuren als Edukte eingesetzt. Zusätzlich wurde noch die Verwendung diverser Phenolkomponenten evaluiert. Zur Untersuchung der optimalen Rösttemperatur für eine maximale Ausbeute an Reaktionsprodukten (**74**, **75**) wurden Modellröstansätze, die Saccharose, L-Asparagin und Kaffeesäure (**1**) enthielten, für 15 min bei unterschiedlichen Temperaturen (120 °C - 220 °C) geröstet. Die Ausbeuten der Reaktionsprodukte wurden quantitativ mittels HPLC-MS/MS im MRM-Mode bestimmt. Die generierten Gehalte der erhitzen Proben sind in **Abbildung 37** graphisch dargestellt. Beide Reaktionsprodukte **74** und **75** wurden erst ab einer Reaktionstemperatur von 140 °C gebildet. Bei niedrigeren Temperaturen konnte weder das *endo-* (**74**) noch das *exo*-Produkt (**75**) nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Temperatur führte zu höheren Ausbeuten beider Reaktionsprodukte. Die Gehalte bei 140 °C lagen für das *endo-*Produkt (**74**) bei 8 µmol/mmol Kaffeesäure und für das *exo-*Produkt (**75**) bei 1 µmol/mmol Kaffeesäure. Die höchsten Gehalte wurden mit 11 µmol/mmol Kaffeesäure für das *endo-*Produkt (**74**) und 3,5 µmol/mmol Kaffeesäure für das *exo-*Produkt (**75**) bei einer Reaktionstemperatur von 200 °C erhalten. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 220 °C führte zu keiner signifikanten Steigerung der Ausbeuten der 8-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on-Produkte.



Abbildung 37: Temperaturabhängigkeit der Bildung der Reaktionsprodukte 74 und 75 bei der Reaktion unter Modellröstbedingungen (t: 15 min) von Saccharose, L-Asparagin und Kaffeesäure. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Um die Rolle von unterschiedlichen Präkursoren auf die Bildung der Reaktionsprodukte zu untersuchen, wurde Chlorogensäure (7), welche der Kaffeesäurepräkursor in Kaffee ist, und 4-Vinylcatechol (44) als Schlüsselintermediat in dem Reaktionsmechanismus in Abbildung 42 bei 200 °C für 15 min in Gegenwart von Saccharose und L-Asparagin in einem Modellröstansatz erhitzt. Die Chlorogensäure (7) und ebenso das 4-Vinylcatechol (44) waren potentielle Präkursoren für die Generierung von *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-

(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74** und **75**). Die quantitativen Daten, die mittels HPLC-MS/MS bestimmt wurden, sind in **Abbildung 38** zusammengefasst.

Verglichen mit den Ausbeuten aus der Reaktion mit Kaffeesäure (1) waren die Bildungsraten der *endo-* (74) und *exo-*Produkte (75) bei der Reaktion mit Chlorogensäure viel geringer. Anscheinend waren die gewählten Reaktionsbedingungen (200 °C für 15 min) nicht optimal um Chlorogensäure (7) in Kaffeesäure zu spalten. Außerdem entstanden bei dieser Temperatur aus der Chlorogensäure auch viele Nebenprodukte, wie die bereits beschriebenen Laktone und Phenylindane (*Frank et al., 2006 und 2007, Blumberg et al., 2010*).

Die sehr geringen Ausbeuten während der Reaktion mit 4-Vinylcatechol (**44**) von 0,02 µmol/mmol Kaffeesäure für das *endo*-Produkt (**74**) und von 0,01 µmol/mmol Kaffeesäure für *exo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**75**) konnten durch die Bildung von 4-Vinylcatechololigomeren erklärt werden.



Abbildung 38: Ausbeuten der Reaktionsprodukte 74 und 75 beim Einsatz von Chlorogensäure (7) und 4-Vinylcatechol (44) im Vergleich mit Kaffeesäure (1) in der Reaktion mit Saccharose und L-Asparagin (T: 200 °C, t: 15 min). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss unterschiedliche Kohlenhydrate auf die Ausbeuten der Reaktionsprodukte **74** und **75** haben, wurden die Monosaccharide Fruktose und Glukose und das Disaccharid Saccharose unter Modellröstbedingungen (200 °C, 15 min) in Gegenwart von Glycin und Kaffeesäure (1) erhitzt. Für jeden Ansatz wurden äquimolare Gehalte an Kohlenhydrat eingesetzt. Während für die Monosaccharidansätze 10 mmol eingesetzt wurden, wurde für den Disaccharidansatz 5 mmol Saccharose zur Reaktion verwendet. Nach der Extraktion der Proben wurden die gebildeten Gehalte des *endo-* (**74**) und *exo-*Produktes (**75**) mittels HPLC-MS/MS untersucht (**Abbildung 39**). Bei den Reaktionen mit den beiden

Monosacchariden wurden sowohl das *endo-* als auch das *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74**, **75**) zu selben Gehalten mit 19 µmol/mmol Kaffeesäure für das *endo-*Produkt (**74**) und mit 9,5 µmol/mmol Kaffeesäure für das *exo-*Produkt (**75**) nachgewiesen. Mit 15 µmol/mmol Kaffeesäure für das *endo-* (**74**) und 5 µmol/mmol Kaffeesäure für das *exo-*Produkt (**75**) lagen die Gehalte in den Saccharoseansätzen niedriger im Vergleich zu den Gehalten aus den Reaktionen mit den Monosacchariden.



Abbildung 39: Einfluss von Kohlenhydraten auf die Ausbeuten von *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74 und 75) bei der Reaktion mit Glycin und Kaffeesäure (1) unter Modellröstbedingungen (T: 200 °C, t: 15 min). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Um den Einfluss der Aminosäure-Komponente auf die Bildung der Geschmackstoffe zu untersuchen, wurde Glukose und Kaffeesäure in ternären Mischungen mit Glycin, L-Phenylalanin, L-Asparagin, L-Cystein, L-Lysin bzw. L-Asparaginsäure zur Reaktion gebracht. Die Gehalte der generierten *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74**, **75**) wurden im Anschluss mittels HPLC-MS/MS quantifiziert (**Abbildung 40**).

Die Bildung der beiden Geschmackstoffe **74** und **75** wurden signifikant von der Struktur der Aminosäure beeinflusst. Der Einsatz einer geladenen Aminosäure (L-Lysin oder L-Asparaginsäure) lieferte niedrigere Gehalte an **74** und **75** als die Verwendung einer ungeladenen Aminosäure mit einer nichtpolaren Seitenkette. Außerdem wurden weitere Abhängigkeiten in der Produktgenerierung von der Struktur der eingesetzten Aminosäure detektiert. Die Gruppe der ungeladenen Aminosäuren mit einer polaren Seitenkette (L-Asparagin) führte zu denselben Gehalten wie eine ungeladene Aminosäure mit einer nicht polaren Seitenkette. Die andere untersuchte ungeladene Aminosäure mit einer polaren Seitenkette, das L-Cystein, ergab lediglich die Hälfte an Ausbeute an **74** und **75** verglichen mit L-Asparagin.



Abbildung 40: Einfluss unterschiedlicher Aminosäuren auf die Ausbeuten von *endo-* und *exo-*6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74 und 75) bei der Reaktion von Glukose, Aminosäure und Kaffeesäure (1) unter Modellröstbedingungen (T: 200 °C, t: 15 min). Gly = Glycin, Phe = L-Phenylalanin, Asp = L-Asparaginsäure, Cys = L-Cystein, Lys = L-Lysin, Asn = L-Asparagin. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Unter Betrachtung aller erhaltenen quantitativen Daten konnte zusammengefasst werden, dass das *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74** und **75**) in den größten Gehalten während der Reaktion von Monosacchariden mit einer ungeladenen Aminosäure wie L-Asparagin oder Glycin unter Modellröstbedingungen über 180 °C mit einer Hydroxyzimtsäure als Reaktionspartner gebildet wurden.

Im Folgenden sollte nun der Bildungsmechanismus der Verbindungen **74** und **75** näher untersucht werden. *Jiang et al.* gelang es *2009* durch den Einsatz einer MS basierten Isotopenanalyse zu zeigen, dass ein intaktes C₆-Zuckerfragment in die beiden strukturanalogen 6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on **77** und **78** (**Abbildung 43**) eingebaut wurde. Dennoch konnte die exakte Position der Kohlenstoffatome mit dieser Technik nicht visualisiert werden. Im Kontrast dazu kann mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie eine direkte Nachbarschaft von markierten ¹³C-Atomen detektiert werden, besonders im Falle von sehr gering ¹³C angereicherten Raten. Die "Bond Labeling" Technik ermöglichte es, durch die Messung der ¹³C/¹³C Kopplungskonstanten, intakte Kohlenstoffbindungen in ¹³C-NMR-Spektren sichtbar zu machen (*Frank und Hofmann, 2002*).

Diese Technik wurde bisher erfolgreich zur Aufklärung von biosynthetischen Stoffwechselvorgängen und metabolischen Flussmodellen eingesetzt (*Bacher et al., 1999*).

Um den Bildungsmechanismus von endound exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74 und 75) aufzuklären, wurde eine "Bond Labeling"-Methode entwickelt, bei der Glukose mit 5 % [¹³C₆]-Glukose vermischt und in Gegenwart von Kaffeesäure (1) und Glycin unter Modellröstbedingungen erhitzt wurde. Nach der Extraktion mit Methanol wurde der Rückstand mit Ethylacetat extrahiert. Die beiden Zielmoleküle wurden unter Verwendung von MPLC und semipräparativer HPLC isoliert und mittels ¹H breitbandentkoppelter ¹³C-NMR-Spektroskopie analysiert. Die chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten der Kohlenstoffatome ebenso wie die ¹³C/¹³C Kopplungskonstanten der endound exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74 und 75) sind in Tabelle 10 zusammengefasst. In Abbildung 41 sind die ¹³C/¹³C Kopplungsmuster der ¹³C markierten Kohlenstoffatome des endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74) dargestellt.

Aufgrund ihres natürlichen ¹³C-Isotopenverhältnisses wurden bei der Substanz (74) die acht Kohlenstoffatome C(1')-C(6') sowie C(5) und C(6) als Singulett detektiert. Dies bestätigte, dass diese Kohlenstoffatome zu der Kaffeesäureeinheit gehörten. Im Gegensatz dazu zeigte das Kohlenstoffatom C(2), welches bei 128,8 ppm eine Resonanz aufwies, intensive ¹³C-Satelliten mit einer Aufspaltung zu einem Dublett vom Dublett vom Dublett (ddd) mit Kopplungskonstanten von 61,2, 50,3 und 10,9 Hz, welche durch die ¹J-Kopplung mit dem Kohlenstoff in Position C(3), der ¹J-Kopplung mit C(1) und der ²J-Kopplung mit C(7) entstanden. Für das Nachbarkohlenstoffatom C(1) wurde eine stark koppelnde Signalaufspaltung bei 199,2 ppm detektiert. Die Kopplungskonstanten von 50,3, 45,3 und 2,7 Hz wurden durch die Kopplungen mit den Kohlenstoffatomen C(2), C(7) und C(3) hervorgerufen. Wie in **Tabelle 10** dargestellt, zeigte das Kohlenstoffatom in Position C(7) ¹³C-Satelliten, die zu einem Dublett vom Dublett vom Dublett (ddd) mit Kopplungskonstanten von ${}^{1}J_{C(7)/C(1)} = 45,3$ Hz, ${}^{2}J_{C(7)/C(2)} = 10,9$ Hz und ${}^{3}J_{C(7)/C(3)} = 2,7$ Hz aufgespalten waren, aber es war keine weitere Kopplung zum Nachbar C(6) sichtbar. Dies bestätigte, dass C(6) nicht mit ¹³C angereichert wurde. Das quartäre Kohlenstoffatom C(4), welches eine Resonanz bei 87,2 ppm aufwies, zeigte eine Aufspaltung zu einem Pseudotriplett mit einer Kopplungskonstanten von 45 Hz, welche den ¹J-Kopplungen zu C(3) und C(8) entsprachen. Außerdem wurden dem Kohlenstoffatom C(3), welches ein Signal bei 155,4 ppm lieferte, die Kopplungskonstanten ${}^{1}J_{C(3)/C(2)} = 61,2 \text{ Hz}, {}^{1}J_{C(3)/C(4)} = 45,0 \text{ Hz}, {}^{2}J_{C(3)/C(1)} = 2,7 \text{ Hz}, {}^{2}J_{C(3)/C(8)} = 2,7 \text{ Hz}$ und ${}^{3}J_{C(3)/C(7)} = 2,7$ Hz zugeordnet. Das hochfeldverschobene Kohlenstoffatom C(8), welches bei 64,0 ppm eine Resonanz zeigte, koppelte über eine ¹J-Kopplung zu dem Kohlenstoffatom C(4) mit einer Kopplungskonstante von 45.3 Hz und über eine ²J-Kopplung zu dem Kohlenstoffatom C(3) mit nur 2,7 Hz. Um die Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen von C(8), C(1) und C(7) mit dem Kohlenstoffatom in Position C(3) zu bestätigen, wurde ein zweidimensionales ¹³C/¹³C-INADEQUATE (incredible natural abundance double-quantum transfer experiment) aufgenommen. In dem INADEQUATE-Spektrum wurde die Abfolge der zugeordneten Kohlenstoffatome bestätigt. Auf der Basis aller Daten konnte die Struktur des *endo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74**) bestätigt werden.

Tabelle 10: Zuordnung der ¹³ C-NMR-Signale (125 MHz, <i>d</i> ₄-MeOD) der mit 5 % ¹³ C angereicherten
endo- und exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74
und 75).

- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	$\delta \left[ppm ight]^{b}$		mult ^c	homonukleare ¹³ C, ¹³ C Kopplungen via ^{1,2,3} <i>J</i> _{C, C} [Hz] ^d					
C-Atom"	74	75		(74)	(75)				
C (6)	34,8	37,3	S						
C(5)	48,3	48,9	S						
C(8)	64,0	65,1	dd	C(4) [45,3], C(3) [2,7]	C(4) [45,0], C(3) [3,0]				
C(7)	81,9	82,4	ddd	C(1) [45,3], C(2) [10,9],	C(1) [45,7], C(2) [11,3],				
C(4)	87,2	88,0	pt	C(3) [45,0], C(8) [45,0]	C(3) [45,0], C(8) [45,0]				
C(3´)	116,3	116,1	S						
C(6´)	116,7	116,5	S						
C(4´)	121,4	121,2	S						
C(2)	128,8	126,2	ddd	C(1) [50,3], C(3) [61,2], C(7) [10 9]	C(1) [50,0], C(3) [61,2], C(7) [11,3]				
C(5´)	129,7	133,3	S	0(1)[10,0]	0(1)[11,0]				
C(2´)	145,8	145,5	S						
C(1´)	146,3	146,8	S						
C(3)	155,4	157,6	ddd	C(1) [2,7], C(7) [2,7], C(8) [2,7],	C(1) [3,0], C(2) [61,2],				
C(1)	199,2	199,4	ddd	C(2) [61,2], C(4) [45,0] C(2) [50,3], C(3) [2,7], C(7) [45,3]	C(4) [45,0] C(2) [50,0], C(3) [3,0], C(7) [45,7]				

^a Die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die Strukturen **74** und **75** in **Abbildung 36**, ^b die ¹³C Verschiebungen sind auf TMS referenziert angegeben, ^c die Multiplizität wurde aus dem ¹³C-Spektrum herausgelesen, ^d die Zuordnung basiert auf einem ¹³C (^{1,2,3}J)-Experiment.



Abbildung 41: ¹³C-NMR-Spektrum des Carbon Bond Labeling Experimentes der Substanz 74. Kopplungen zwischen den ¹³C-markierten Kohlenstoffatomen (A); vergrößerte Regionen der Signale der ¹³C-markierten Kohlenstoffsignale (B) und das ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz, $d_{4^{-}}$ MeOD) (C).

Die Zuordnung der ¹³C/¹³C-Korrelationen der ¹³C-angereicherten Verbindung exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75) zeigte große Übereinstimmung in den chemischen Verschiebungen und $J_{C/C}$ -Kopplungskonstanten mit denen der endo-Konformation (74) (Tabelle 10). Bei einem Vergleich der Literaturdaten mit den erhaltenen ¹³C-NMR-Spektren konnte der in der Literatur von Jiang et al. (2009) vorgeschlagene Reaktionsmechanismus bestätigt werden. Abbildung 42 zeigt die Reaktionskaskade, welche in zwei Hauptteile aufgespalten ist. Auf der einen Seite steht die typische *Maillard*-Reaktion der markierten [¹³C₆]-Glukose über 3-Desoxy-2-Hexo-sulose (I), welche über das Amadori-Zwischenprodukt gebildet wurde. Eine Dehydrierung und Cyclisierung führte zum Oxopyrylium Zwitterion (II). Auf der anderen Seite reagierte die Kaffeesäure (1) durch eine Decarboxylierung zum 4-Vinylcatechol (44). Diese beiden Zwischenprodukte reagierten in einer 5,2-Cycloaddition zu den Reaktionsprodukten endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74) und exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75) (Cohen, 1959, Snider, 2006, Jiang et al., 2009).



Abbildung 42: ¹³C-markierter Reaktionsmechanismus zur Bildung der Reaktionsprodukte 74 und 75 aus Glukose und einer Aminosäure in der *Maillard*-Reaktion. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 4, 8 und 36.

Um zu untersuchen, ob die Reaktionsprodukte nicht nur aus C₆-Kohlenhydratfragmenten gebildet werden können, wurde im folgenden Modellexperiment Saccharose durch ein C₅-Kohlenhydrat ersetzt. Die Reaktion wurde unter Verwendung von Ribose, L-Asparagin und Kaffeesäure (1) mit denselben Reaktionsbedingungen wie für die Reaktionsansätze mit Saccharose durchgeführt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde eine Analyse mittels RP-18-HPLC durchgeführt und ein Reaktionsprodukt (76) detektiert. Zur Isolierung wurde eine Separation mittels MPLC auf RP-18 Material, gefolgt von einer finalen Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC angewendet. Das Zielmolekül 76 zeigte ein Pseudomolekülion von m/z 231 ([M-H]⁻) und die HRMS-Analyse ergab eine Summenformel von C₁₃H₁₂O₄. ¹H-NMR-Spektrum war ähnlich zu dem von *endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-*Das (hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74), mit dem Unterschied dass die beiden Signale der diastereotropen Methylengruppen der Position H-C(8) bei 3,71 und 3,84 ppm fehlten. Dafür war ein neues Signal bei 4,89 ppm, welches für ein Proton integriert wurde, nachweisbar. Dieses Signal konnte als Resonanzsignal des Protons in Position H-C(4) identifiziert werden. Zusammenfassend konnte das Reaktionsprodukt, welches aus dem Reaktionsansatz von Ribose, L-Asparagin und Kaffeesäure (1) isoliert wurde als endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (76, Abbildung 43) identifiziert

werden. Bei der Reaktion mit Ribose, konnte nur das *endo*-Produkt isoliert werden. Auch durch die massenspektroskopische Analyse des gesamten Reaktionsansatzes konnte das analoge *exo*-konfigurierte Produkt nicht nachgewiesen werden.

Für eine systematische sensorische Untersuchung und um Struktur/Aktivitäts-Zusammenhänge zu erforschen, wurde außerdem noch das Ferulasäure-Reaktionsprodukt, wie in der Literatur beschrieben, synthetisiert (Jiang et al., 2009). Die Reaktion wurde durch Einsatz von Glukose, Glycin und Ferulasäure durchgeführt. Die Aufreinigung der Substanzen erfolgte wie für die Reaktionsprodukte 74 und 75 mittels MPLC und semipräparativer HPLC. Die LC-MS und LC-TOF-MS Analysen ergaben für die Substanzen 77 und 78 (Abbildung **43**) ein Pseudomolekülion von m/z 275 ([M-H]) und eine elementare Zusammensetzung von $C_{15}H_{16}O_5$ für beide Isomere. Diese Ergebnisse, wie auch die NMR-Daten, stimmten mit denen in der Literatur beschriebenen Daten überein (Jiang et al., 2009, Snider, 2006). Somit wurden die beiden Substanzen als das endo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (77) und exo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (78) (Abbildung 43) identifiziert.



Abbildung 43: Chemische Strukturen der Reaktionsprodukte *endo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-8oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (76), *endo-6-*(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (77) und *exo-6-*(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (78).

2.2.3 Sensorische Evaluierung der 8-Oxabicyclo[3.2.1]-oct-3-en-2-on-Derivate

Die sensorische Analyse der synthetisierten 8-Oxabicyclo[3.2.1]-oct-3-en-2-on-Derivate wurde nach der Reinheitsüberprüfung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und HPLC-MS wie unter Kapitel 2.1.4 beschrieben im Half-Mouth Test durchgeführt. Das trainierte Sensorikpanel beschrieb für die Substanzen **74** - **78** ein adstringierendes Mundgefühl und einen klaren bitteren Geschmackseindruck. Abhängig von der chemischen Struktur wurden die Geschmacksschwellen in einem Bereich von 18 und 92 μ mol/L für die Adstringenz und zwischen 112 und 736 μ mol/L für den bitteren Geschmackseindruck detektiert (**Tabelle 11**). Interessanterweise zeigten von den beiden C₆-Kohlenhydrat Produkten die *exo*-Isomere (**75** und **78**) einen signifikant niedrigeren Geschmacksschwellenwert für die Adstringenz und die Bitterkeit als die entsprechenden *endo*-Isomere (**74** und **77**). Der Bereich für die *exo*-Produkte lag bei ca. 20 μ mol/L für den adstringierenden Eindruck und bei ca. 115 μ mol/L für den bitteren Geschmack. Für die *endo*-Produkte ergaben sich Geschmacksschwellen von ca. 90 μ mol/L für die Adstringenz und für die Bitterkeit von ca. 700 μ mol/L.

Die Schwellenwerte des *endo*-Isomers des C₅-Kohlenhydrat-Produktes (**76**) lagen mit 60 μ mol/L für die Adstringenz und 290 μ mol/L für den bitteren Geschmackseindruck zwischen den Geschmacksschwellenwerten der *endo*- und *exo*-Isomeren der C₆-Kohlenhydratprodukte, (**74**, **77** und **75**, **78**).

Tabelle 11: Humane Geschmacksschwellen [µmol/L] der *endo-* und *exo-*8-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on-Derivate 74 - 78.

Substant (Nr.) ^a	Geschmacksschwelle [µmol/L] ^b			
	bitter	adstringierend		
<i>endo-6</i> -(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1] oct-3-en-2-on (74)	736	92		
exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1] oct-3-en-2-on (75)	112	27		
endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (76)	288	59		
endo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo [3.2.1]oct-3-en-2-on (77)	655	89		
exo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo- [3.2.1]oct-3-en-2-on (78)	120	18		

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36** und **43**. ^b Geschmacksschwellen wurden im Half-Mouth Test in Trinkwasser (pH 6,0) aufgenommen.

2.2.4 Identifizierung und Quantifizierung bitterer 8-Oxabicyclo[3.2.1]-oct-3-en-2-on-Derivate in Röstkaffee

Um ein natürliches Vorkommen der bitter und adstringierend schmeckenden Reaktionsprodukte **74** - **78** aus Kohlenhydraten, Aminosäuren und Hydroxyzimtsäuren in Kaffeegetränken zu untersuchen, wurde ein frisch aufgebrühtes Standardkaffeegetränk mittleren Röstgrades auf eine mit Wasser konditionierte C18 Kartusche aufgegeben. Nach einem Waschschritt mit Wasser wurde der Kaffee mit Wasser/Methanol (7/3; v/v) eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und in 2 mL Wasser aufgenommen. Die aufkonzentrierte Kaffeefraktion wurde nach Membranfiltration mittels HPLC-MS/MS (ESI⁻, MRM Modus) auf die Geschmacksstoffe **74** - **78** untersucht. Um eine maximale Ionenausbeute zu erreichen, wurden die substanzspezifischen Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter mit den synthetisierten Referenzsubstanzen im Rahmen der Methodenentwicklung optimiert.

Der Vergleich der Retentionszeiten und der charakteristischen Massenübergänge jeder Substanz, die im Kaffeegetränk nachgewiesen wurde, mit denen der korrespondierenden Referenzsubstanzen, führte zu der eindeutigen Identifizierung der bitteren Geschmackstoffe *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on **74** und **75** in dem Kaffeegetränk (**Abbildung 44B**).

Um die Identität der nachgewiesenen Produkte in Kaffee zu bestätigen, wurden Untersuchungen mittels Spiking-Experimenten mit den entsprechenden Referenzsubstanzen durchgeführt.

Entsprechend der Zusammensetzung von Kaffee wurden in dem Kaffeegetränk nur die Substanzen **74** und **75** nachgewiesen, die aus der Reaktion von C₆-Kohlenhydraten, einer Aminosäure und Kaffeesäure (**1**), der dominierenden Hydroxyzimtsäure in Kaffee, hervorgingen. Wohingegen die Substanz **76**, die aus einem C₅-Kohlenhydrat entstand, und die beiden Substanzen **77** und **78**, die Ferulasäure als Hydroxyzimtsäureeinheit eingebaut hatten, nicht in dem Kaffeegetränk nachgewiesen werden konnten. Dies kann auf die geringen Gehalte ihrer Präkursoren in Kaffee zurückgeführt werden.



Abbildung 44: HPLC-MS/MS Chromatogramme (MRM-Mode) der Analyse von 74 - 78. Endo und exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74 und 75), Standardlösung (A); Kaffeegetränk (B). Endo 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3en-2-on (76) Standardlösung (C); Kaffeegetränk (D). Endo und exo-6-(4-Hydroxy-3methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (77 und 78), Standardlösung (E); Kaffeegetränk (F). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36 und 43.

Zur quantitativen Analyse von *endo-* (**74**) und *exo-* (**75**) 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5- (hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on in Kaffeegetränken wurde die Methode der SIVA eingesetzt.

Um einen markierten internen Standard für die Quantifizierung in unterschiedlichen Kaffeegetränken zu synthetisieren, wurde [$^{13}C_6$]-Glukose in den Modellröstansätzen mit Glycin und Kaffeesäure zur Synthese von markiertem *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1][$^{13}C_6$]oct-3-en-2-on (**74**, **75**) eingesetzt. Die so synthetisierten internen Standards zeigten ein Pseudomolekülion von *m/z* 267 ([M-H]⁻) im Vergleich zu dem nicht markierten Pseudomolekülion von *m/z* 261 ([M-H]⁻) (**Abbildung 45**).



Abbildung 45: MS-Spektren von *endo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74) (A) und ${}^{13}C_6$ -markiertem *endo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1][${}^{13}C_6$]oct-3-en-2-on ([${}^{13}C_6$]-74) (B).

Es wurden Kalibriergeraden für die quantitative Analytik von *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74** und **75**) in Kaffeegetränken erstellt. Hierfür wurde der isotopenmarkierte Standard (IS) von *endo-*[¹³C₆]-**74** mit den unmarkierten Standards in Verhältnissen von 0,03 bis 14 gemischt und mittels HPLC-MS/MS analysiert. Durch Auftragung der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt / Fläche IS) gegen die Konzentration der Standardlösungen ergaben sich die Regressionsgeraden mit einem Korrelationskoeffizienten R > 0,99 (**Abbildung 46**).



Abbildung 46: Kalibrationsgeraden zur Auswertung von *endo-* (74) und *exo-* (75) 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36.

Die Genauigkeit der analytischen Methode wurde durch Wiederfindungsexperimente verifiziert. Hierfür wurde vor der Aufarbeitung synthetisch hergestelltes Referenzmaterial *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74** und **75**) zu Standardkaffeegetränken in zwei unterschiedlichen Konzentrationen zu dotiert. Die quantitativ ermittelten Gehalte wurden im Anschluss mit denen im aufgearbeiteten Kontrollkaffee verglichen. Die Wiederfindungsraten lagen nach der Aufarbeitung zwischen 86 und 105 % für das *endo-*Isomer **74** und zwischen 90 und 106 % für das *exo-*Isomer **75**. Diese Daten zeigten, dass die entwickelte SIVA für die quantitative Bestimmung dieser Bitterstoffe in Kaffee geeignet war.

Es wurde wie unter Kapitel 2.1.5.1 beschrieben verschieden aufgebrühte Kaffeegetränke quantitativ auf *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxy)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-en-2-on (**74** und **75**) untersucht. Zum einen wurden Standardkaffeegetränke (54 g/L) von definiert gerösteten Arabica- und Robusta-Kaffees bereitet. Zum anderen wurden kommerziell erhältliche Espresso-Mischungen (5 - 6 g Kaffeepulver je Kapsel /40 mL) mit einer speziell dafür vorgesehenen Kaffeemaschine aufgebrüht. Zu definierten Volumen der Kaffeegetränke (30 mL Standardkaffeegetränk, 5 mL Espresso-Kaffeegetränk) wurden definierte Volumen des [¹³C₆]-74 internen Standards zugegeben und es erfolgte eine Homogenisierung und Equilibrierung für 30 min bei Raumtemperatur. Die so präparierten Proben wurden auf eine mit Wasser konditionierte C18 Kartusche aufgegeben und nach einem Waschschritt mit Wasser erfolgte die Elution der Analyten mit einer Mischung von Wasser/Methanol (7/3; v/v). Die Proben wurden zur Trockene eingeengt und in Wasser für Messuna mittels HPLC-MS/MS aufgenommen. In Abbildung die 47 ist ein chromatographischer Lauf eines Kaffeegetränkes mit dem internen Standard dargestellt.



Abbildung 47: HPLC-MS/MS Chromatogramme (MRM-Mode) der Analyse von *endo-* und *exo-*6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74 und 75) in einem Kaffeegetränk. Internen Standard (A) und die nachgewiesene Substanzen (B). Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36.

Bei der Analyse der Gehalte von *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74** und **75**) in definiert gerösteten Standardkaffeegetränken konnten Unterschiede zwischen den Varietäten der Kaffeesorten festgestellt werden. Die Gehalte in den Robusta-Kaffeeproben lagen niedriger als die Gehalte in den Arabica-Kaffeeproben (**Abbildung 48**). Dies lässt sich eventuell durch den geringeren Kohlenhydratanteil in den Robusta-Bohnen im Vergleich zu den Arabica-Bohnen erklären (*Snider, 2006, Murkovic und Derler, 2006).* Beide Kaffeevarietäten zeigten eine Abhängigkeit der Formation von **74** und **75** vom Röstgrad der Bohnen. Die Gehalte von *endo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**75**) nahmen mit höherem Röstgrad ab (35 μg/L Kaffeegetränk bei dem Arabica-Kaffee mit 113 SKT Röstbedingungen: T: 230 °C, t: 180 s und 12 μg/L Kaffeegetränk bei dem Arabica-Kaffee mit 41 SKT Röstbedingungen T: 263 °C, t: 180 s), wohingegen die Gehalte von *exo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**75**) mit steigendem Röstgrad zunahmen (34 μg/L Kaffeegetränk bei dem Arabica-Kaffee mit 113 SKT und 94 μg/L bei dem Arabica-Kaffee mit 41 SKT). Dieselbe Abhängigkeit der Gehalte vom Röstgrad wurde auch bei den Robusta-Kaffeeproben nachgewiesen.

Durch die Untersuchung von Arabica-Rohkaffee konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hydroxyzimtsäure-*Maillard*-Reaktionsprodukte **74** und **75** durch den Prozessschritt der Röstung gebildet wurden, da diese im Rohkaffee nicht nachweisbar waren (**Anhang 4**).



Abbildung 48: Abhängigkeit der Konzentrationen von *endo-* und *exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-*5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74, 75) in unterschiedlich stark gerösteten Robusta-Kaffeeproben. Rösttemperatur 265 °C und unterschiedliche Röstdauer (A) bzw. Röstdauer 180 s und unterschiedlichen Rösttemperaturen (B). Sowie von Arabica-Kaffeeproben Rösttemperatur 265 °C und unterschiedliche Röstdauer (C) und Röstdauer 180 s und unterschiedliche Rösttemperaturen (D). Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 36.

Bei der Untersuchung der unterschiedlich bereiteten Kaffeegetränke zeigte sich, dass bei den unter hohem Druck aufgebrühten Espresso-Proben die Gehalte von *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74** und **75**) von $100 - 300 \mu g/L$ Kaffeegetränk sehr viel höher waren als die Gehalte der unter Normaldruck aufgebrühten Standardkaffeegetränke der Arabica- und Robusta-Proben ($20 - 100 \mu g/L$ Kaffeegetränk) (**Tabelle 12**). Dies kann nicht alleine durch die erhöhte Menge an Kaffeepulver erklärt werden, sondern die Art des Aufbrühens scheint ebenfalls die Gehalte an **74** und **75** im Kaffeegetränk zu beeinflussen.

Tabelle 12: Gehalte [µg/L] von *endo-* und *exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8- oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74, 75) in Espresso-Kaffeegetränken.

	Konzentration [µg/L] ^a					
Espresso-Probe	74 ^b 75 ^b					
1	112 ± 6,5	$329 \pm 3,4$				
2	105 ± 8,2	252 ± 10,7				
3	103 ± 5,8	294 ± 0.4				
4	101 ± 0,6	333 ± 0,1				
5	92 ± 14,4	$307 \pm 12,4$				
6	89 ± 4,6	$333 \pm 8,3$				
7	96 ± 5,3	$343 \pm 31,4$				
8	99 ± 1,9	373 ± 15,5				

^a Mittelwert ± Standardabweichung (μg/L) aus n = 3 (einzelne Getränke), ^b Die Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36**. Die Intensität der Espresso-Getränke ist in **Tabelle 13** aufgeführt.

2.2.5 Diskussion

Die *Maillard*-Reaktion, eine thermische Reaktionskaskade zwischen reduzierenden Zuckern und Aminokomponenten, ist ein Hauptbildungsweg zur Generierung von Kaffeearomakomponenten (*Osterveld et al., 2003, Hofmann et al., 2001*). Der Einfluss von Hydroxyzimtsäuren auf die Aromastoffbildung im Kaffeemodellsystem wurde 2000 von *Wang* untersucht. Er studierte dabei *Maillard*-Systeme, die Glukose und Leucin, Lysin oder Cystein enthielten. Dabei wurde eine inhibierende Wirkung der Hydroxyzimtsäuren auf die Aromagenerierung festgestellt. Ähnliche Ergebnisse erhielten *Noda und Peterson* (2007), die im wässrigen System Glukose und Glycin erhitzten. Im Gegensatz dazu generierten *Jang et al.* (2009) in einem wasserarmen *Maillard*-System, welches Hydroxyzimtsäuren enthielt, zahlreiche Reaktionsprodukte, von denen zwei als *endo*- und *exo-6*-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1.]oct-3-en-2-on (**77**, **78**, **Abbildung 43**) identifiziert wurden.

Basierend auf den Daten von *Jiang et al. (2009)* wurden kaffeeähnliche Modellsysteme entwickelt, welche Saccharose, das primäre Kohlenhydrat in Kaffee, und die Aminosäure L-Asparagin enthielten. Diese *Maillard*-Reaktionsansätze wurden in Gegenwart von diversen Hydroxyzimtsäuren erhitzt und auf die Bildung von potentiellen bitteren Geschmacksstoffen untersucht. Bei der chromatographischen Analyse konnten zwei Reaktionsprodukte in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, *endo-* (**74**) und *exo-* (**75**) 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on welche sich als Strukturanaloga zu denen von *Jiang et al. (2009)* identifizierten Produkte erwiesen. Um eine Strukturwirkungsbeziehung für diese Substanzklasse aufstellen zu können, wurde der Kohlenhydratanteil bei dieser Reaktion durch Ribose, einem C₅-Kohlenhydrat, ersetzt. Nach Aufreinigung wurde das *endo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**76**) identifiziert, während das entsprechende *exo*-Produkt in dem Ansatz nicht identifiziert werden konnte. Zusätzlich zu den noch nicht veröffentlichten Reaktionsprodukten **74**, **75** und **76** wurden zur sensorischen Evaluierung die beiden in der Literatur beschriebenen Produkte **77** und **78** in Reaktionsansätzen, die Glukose, Glycin und Ferulasäure enthielten, synthetisiert.

Um die von Jiang et al. (2009) beschriebenen Strukturen und den postulierten Reaktionsmechanismus abzusichern, wurde unter Verwendung von ¹³C-markierter Glukose ein "Carbon Bond Labeling" Modell entwickelt, bei dem durch den Einbau von ¹³C-markierten Kohlenstoffatomen die direkte Nachbarschaft von ¹³C-markierten Kohlenstoffatomen im ¹³C-NMR-Spektrum visualisiert werden konnte. Mit diesem Experiment konnte über die ¹³C-Kopplungskonstanten bestätigt werden, dass die postulierte Reaktion über das Oxopyrylium Zwitterion in einer anschließenden 5,2-Cycloaddition mit dem aus der Ferulasäure gebildeten 2-Methoxy-4-vinylphenol zu endo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on exo-6-(4-Hydroxy-3-(77) und methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (78) oder im Falle der eingesetzten Kaffeesäure über das 4-Vinylcatechol zu den Reaktionsprodukten endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74) und exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75) führten.

Bei einer Optimierung des Reaktionssystems wurden unterschiedliche Parameter, wie der Einfluss des Kohlenhydrates, der Aminosäure sowie der Erhitzungstemperatur evaluiert. Zusätzlich zu diesen Bedingungen wurde untersucht, welchen Einfluss das eingesetzte Phenol hat. Hierfür wurden zum einen Chlorogensäure (7) die kaffeeeigene Vorstufe der Kaffeesäure (1), die ebenso wie das Reaktionszwischenprodukt 4-Vinylcatechol (44) im Modellröstansatz erhitzt. Bei den eingesetzten Substanzen wurde die Verwendung von Monosacchariden mit einer ungeladenen Aminosäure wie L-Asparagin als optimaler

Ausgangspunkt für eine hohe Produktausbeute evaluiert. Bei der eingesetzten Temperatur wurden Werte zwischen 180 und 220 °C als optimal festgestellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl der Einsatz von Chlorogensäure (7) als auch von 4-Vinylcatechol (44) im Verhältnis zu Kaffeesäure (1) sehr viel schlechtere Ausbeuten lieferten (0,8 % beziehungsweise 0,08 %).

Bei der sensorischen Untersuchung wurde für alle Substanzen ein bitterer und adstringierender Geschmack festgestellt. Bei der Bestimmung der Geschmacksschwellenwerte im Half-Mouth Test zeigten sich für die vier C₆-Kohlenhydratprodukte unabhängig von der eingesetzten Hydroxyzimtsäure für die *endo*-Produkte **74** und **77** weitaus höhere Geschmacksschwellen sowohl für die Bitterkeit (700 µmol/L) als auch für die Adstringenz (90 µmol/L) als bei den *exo*-Produkten **75** und **78** (100 µmol/L für die Bitterkeit, 20 µmol/L für die Adstringenz). Wohingegen das *endo*-konfigurierte C₅ Kohlenhydratprodukt **76** mit 290 µmol/L für die Bitterkeit und 60 µmol/L für die Adstringenz im mittleren Bereich zwischen den *endo*- und *exo*-konfigurierten C₆-Kohlehydratprodukten lag.

Um das Vorkommen der 8-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on Reaktionsprodukte **74** - **78** im Kaffeegetränk nachzuweisen, wurde eine Kaffeeprobe nach adäquater Anreicherung mittels HPLC-MS/MS im MRM-Mode untersucht. Lediglich die beiden im kaffeeähnlichen Modellsystem generierten Substanzen *endo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo-[3.2.1]oct-3-en-2-on (**74**) und *exo-6*-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo-[3.2.1]oct-3-en-2-on (**75**) konnten nachgewiesen werden.

Zur Abschätzung eines eventuellen Geschmacksbeitrags dieser Substanzen erfolgte zunächst eine Quantifizierung mittels SIVA. Die Gehalte der beiden Substanzen lagen mit 11 – 112 µg/L für das *endo*-Produkt (**74**) und zwischen 21 und 333 µg/L für das exo-Produkt (**75**) unterhalb der Konzentration der zuvor identifizierten Furan-2-ylmethylbenzol-Konjugate. Im Falle der Abhängigkeit der Bildung der beiden Substanzen vom Röstgrad war eine gegenläufige Tendenz zu beobachten. So kamen beide Substanzen im Rohkaffee nicht vor. Für das *endo*-Produkt (**74**) zeigte sich, dass durch eine leichte Röstung eine Produkt-bildung einhergeht, die Konzentrationen gingen bei einer stärker werdenden Röstung wieder zurück. Wohingegen die Konzentrationen des *exo*-Produktes (**75**) mit steigendem Röstgrad konstant zunahmen.

3 Experimenteller Teil

3.1 Reagenzien und Materialien

L-Asparagin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland L-Asparaginsäure, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland L-Cystein, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland L-Lysin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland L-Phenylalanin, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland ¹³C₆-Glukose, Euriso Top, Gif sur Yvette, Frankreich 3-Methylcatechol, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland 4-Methylcatechol, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland 5-Hydroxymethylfurfural, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Aceton, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Ameisensäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Catechol, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Chlorogensäure, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Dichlormethan, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Diethylether, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Essigsäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Ethanol abs., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Ethylacetat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Ferulasäure, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Fruktose, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Furfural, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Furfurylalkohol, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Furoylchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Glukose, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Glycin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Hydroxyhydrochinon, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kaffeesäure, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kaliumcarbonat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Koffein, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Lithiumaluminiumdeuterid, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Methanol, HPLC grade, JT Barker, Deventer, Niederlande Methanol-d₄, Euriso Top, Gif Sur Yvette, Frankreich Milchsäure, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Natriumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Natriumformiat, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Natriumglutamat, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Natriumsulfat, wasserfrei, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Pyrogallol, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosid, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Resorcin, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Ribose, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Saccharose, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Schwefelsäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Salzsäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Tannin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Tetrahydrofuran, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Trifluoressigsäure, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Wasser für die HPLC-Messungen wird mittels einer Millipore-Station (Gradient A System, Millipore, Billerica, United States) aufbereitet. Für sensorische Experimente wird kommerziell erhältliches Mineralwasser (Evian[®]) verwendet. Für alle anderen Verwendungszwecke wird destilliertes Wasser verwendet.

Strata C18-E (55 µm, 70 A), 5 g/30 mL Giga Tubes, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland LiChroprep[®] RP18, 25 - 40 µm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland 0,45 µm Membranfilter, Satorius AG, Göttingen, Deutschland Seesand, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Kieselgel, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Faltenfilter, Macherey Nagel, Düren, Deutschland Kaffeefilter, Melitta Größe 4

3.2 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen werden zwei unterschiedliche Arten von Kaffeegetränken verwendet. Zum einen werden kommerziell erhältliche Espresso-Kaffeemischungen in Kapseln untersucht. Zur Herstellung des Kaffeegetränkes werden ca. 6 g des Kaffeepulvers unter hohem Druck (19 bar) mit 40 mL heißem Wasser aufgebrüht. Es werden acht verschiedene Mischungen an Espresso-Kaffee verwendet, die vom Hersteller in unterschiedliche Stärken mit Intensitäten von 3 - 10 eingestuft werden (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Übersicht über die für die massenspektroskopische Analyse verwendeten unterschiedlichen Espresso-Mischungen und deren vom Hersteller angegebene Intensitäten des Kaffees.

Espresso-Probe	vom Hersteller angegebene Intensität des Kaffees
1	3
2	5
3	4
4	6
5	8
6	9
7	7
8	10

Zum anderen werden speziell geröstete Proben von Arabica-Brazil und Robusta-Vietnam Kaffee untersucht (**Tabelle 14**). Für diese Kaffeeproben wird ein Standardkaffeegetränk bereitet. Röstkaffeepulver (54 g) wird in einen Kaffeefilter (Melitta, Größe 4) eingewogen und mit kochendem Wasser portionsweise überbrüht und bis zum Erreichen der Eichmarke in einen Messkolben (1 L) filtriert. Im Eisbad wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Für analytische Untersuchungen werden Kaffeegetränke im Mikromaßstab (5,40 g/100 mL) unter Einsatz von Faltenfiltern hergestellt.

	Arabica-Brazil	_	Robusta-Vietnam				
Temperatur Röstdauer		Farbeinteilung	Temperatur	Röstdauer	Farbeinteilung		
[°C]	[s]	[SKT] ^ª	[°C]	[s]	[SKT] ^ª		
230	180	113	245	180	111		
243	180	76	251	180	94		
248	180	67	257	180	78		
256	180	50	261	180	71		
263	180	41	269	180	51		
265	106	101	265	120	114		
265	116	88	265	135	92		
265	123	64	265	145	81		
265	129	55	265	159	69		
265	153	51	265	177	60		

Tabelle 14: Übersicht über die Röstbedingungen der für die massenspektroskopische Analyse verwendeten Kaffeeproben.

^a Skaltenteile: Einheit zur Angabe der Farbe oder Helligkeit von gerösteten Kaffeebohnen.

3.3 Reaktionen von Hydroxybenzolen mit Furanmolekülen

3.3.1 Röstexperimente der binären Mischungen von Catechol und Furfurylalkohol

Um mögliche Reaktionsprodukte, die während des Röstens von Kaffee aus den Kaffeeinhaltsstoffen Catechol (**56**) und Furfurylalkohol (**32**) entstehen können, zu identifizieren, werden diese beiden Substanzen unter Modellröstbedingungen erhitzt. Hierfür wird eine Mischung aus Catechol (0,04 mmol), Furfurylalkohol (0,2 mmol), 900 mg Kieselgel und 500 µL Essigsäure (1 % in Wasser) hergestellt. Nach einer Trocknung bei 50 °C für 120 min im Trockenschrank, wird die Temperatur auf 180 °C erhöht und die Probe für 10 min geröstet. Nach dem Abkühlen wird der Reaktionsansatz zweimal mit Aceton/Wasser (7/3; v/v, 5 mL) extrahiert. Anschließend wird die organische Phase unter reduziertem Druck entfernt, und es erfolgt eine Analyse auf mögliche Reaktionsprodukte mittels RP-HPLC/DAD unter den unten gegebenen Bedingungen.

HPLC System: 1

Säule:	Luna Phenyl Hexyl, 250 x 4,6 mm i.d., 5 $\mu m,$ (Phenomenex,
	Aschaffenburg, Deutschland)
Fluss:	0,8 mL/min
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser
	B: Methanol
Gradient:	A/B (100/0; v/v) für 5 min halten, in 40 min auf (0/100; v/v), 10 min
	halten
Detektion:	DAD-Detektor

3.3.2 Modellreaktionen mit binären Mischungen aus Di- und Trihydroxybenzolen und Furanderivaten

Zur Identifizierung weiterer Reaktionsprodukte aus binären Mischungen von Di- und Trihydroxybenzolen (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**, **63**) und Furanmolekülen (**32** - **34**) werden Ansätze in Lösung optimiert. Dabei wird der Einfluss des Lösungsmittels, des pH-Wertes, der Erhitzungsdauer und unterschiedlicher molarer Verhältnisse der Eduktzusammensetzungen auf die Bildung von Reaktionsprodukten untersucht.

Zur Herstellung der Reaktionsansätze werden binäre Mischungen aus den Di- und Trihydroxybenzolen (Resorcin (63), Catechol (56), Pyrogallol (54), Hydroxyhydrochinon (55), 3-Methylcatechol (59), 4-Methylcatechol (58), Kaffeesäure (1) und Chlorogensäure (7)) (0.04 µmol) mit den Furanderivaten (Furfurylalkohol (32), Furfural (33) und 5-Hydroxymethylfurfural (34) (0,04 mmol)) in 1 mL Lösungsmittel hergestellt. Als Reaktionsgefäße dienen Sovirell Probengläser (10 mL) mit Schraubdeckel. Die Proben werden für eine Stunde in einem Aluminiumblock auf 70 °C (wasserfreie Lösungsmittel) und auf 100 °C (wässriges Milieu) erhitzt. Nach Abkühlen werden die so erhaltenen Proben membranfiltriert und mittels RP-HPLC/DAD unter unten gegebenen Bedingungen untersucht.

HPLC System: 1

Säule:	Luna Phenyl Hexyl, 250 x 4,6 mm i.d., 5 $\mu m,$ (Phenomenex,
	Aschaffenburg Deutschland)
Fluss:	0,8 mL/min
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser
	B: Methanol
Gradient:	A/B (100/0; v/v) für 5 min halten, in 40 min auf (0/100; v/v), 10 min
	halten
Detektion:	DAD Detektor

3.3.2.1 Einfluss des Lösungsmittels auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Zur Untersuchung des geeigneten Lösungsmittels werden binäre Mischungen der zuvor genannten Di- und Trihydroxybenzole (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**, **63**) und Furanderivate (**32** - **34**) in wässrigem Milieu in 1 %iger essigsaurer Lösung auf 100 °C erhitzt und nach Abkühlen und Membranfiltration direkt mittels HPLC-DAD analysiert. Zum anderen werden die binären Mischungen in Tetrahydrofuran mit 1 % Trifluoressigsäure angesetzt und bei 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Proben werden in Wasser/Methanol (7/3; v/v; 1 mL) gelöst und nach Membranfiltration mittels HPLC-DAD mit System 1 analysiert.

3.3.2.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit auf die Bildung von Reaktionsprodukten werden die binären Mischungen bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 3,0 bis 7,0 überprüft. Die Einstellung des sauren pH-Wertes erfolgt durch die Herstellung einer 1%igen essigsauren Lösung in Wasser. Zur Untersuchung des neutralen pH-Wertes wird deionisiertes Wasser direkt verwendet. Die Probelösungen werden für eine Stunde auf 100 °C erhitzt und nach Abkühlen und Membranfiltration per HPLC-DAD (System 1) analysiert.

3.3.2.3 Einfluss der Erhitzungsdauer auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Zur Untersuchung des Einflusses der Erhitzungsdauer auf die Bildung der Reaktionsprodukte in den binären Mischungen, werden die Di- und Trihydroxybenzole (**54**, **55**, **56**, **58**, **59**, **63**) mit den Furanmolekülen in 1 %iger essigsaurer Lösung in Wasser gelöst und bei 100 °C für 10 bis 480 Minuten erhitzt. Die so erhaltenen Lösungen werden membranfiltriert und mittels HPLC-DAD mit System 1 überprüft.

3.3.2.4 Einfluss des molaren Verhältnisses der binären Mischungen auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Um das molare Verhältnis für ablaufende Reaktionen zu optimieren, wird die Abhängigkeit der Gehalte an Furanderivaten (**32-34**) für die Reaktionen untersucht. Hierfür werden 0,04 bis 0,4 mmol der jeweiligen Furanderivate (Furfurylalkohol (**32**), Furfural (**33**) und 5-Hydroxymethylfurfural (**34**)) mit den Di- und Trihydroxybenzolen (0,04 mmol) in 1 %iger

essigsaurer Lösung in Wasser für 1 Stunde auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen werden die Lösungen membranfiltriert und per HPLC-DAD mit System 1 untersucht.

3.3.3 Präparative Ansätze zur Isolierung der generierten Reaktionsprodukte

Zur Isolierung der im analytischen Modellsystem generierten Substanzen (64 - 73) werden binäre Mischungen von Resorcin (63), Catechol (56), Pyrogallol (54), Hydroxyhydrochinon (55), 3-Methylcatechol (59), 4-Methylcatechol (58) (2,0 mmol) mit Furfurylalkohol (32), Furfural (33) oder 5-Hydroxymethylfurfural (34) (2,0 - 10 mmol) in wässriger essigsaurer Lösung (15 mL, 1 % in Wasser) bei 100 °C unter den optimierten Reaktionszeiten in einem verschlossenen Sovirell Glas (60 mL) erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsansätze erfolgt eine Verdünnung mit 10 mL Methanol. Die Auftrennung des Reaktionsansatzes wird mittels MPLC mit dem Büchi Sepacore System durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgt unter Verwendung eines automatischen Fraktionssammlers. Die Fraktionen, die eine UV-Absorption bei 220 nm aufweisen, werden individuell gesammelt. Die Fraktionen, die die Zielverbindungen enthalten, werden vereinigt, vom Lösungsmittel befreit und im Anschluss, falls nötig, mittels semipräparativer HPLC (System 3) aufgereinigt. Die vereinigten Eluate werden vom Lösungsmittel befreit und die Rückstände lyophilisiert. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht, der erhaltenen Reaktionsprodukte (64 - 73) inklusive der verwendeten Edukte. Mittels UV/Vis-, LC-MS-, HRMS- und 1D- und 2D-NMR-Experimenten werden die erhaltenen Verbindungen untersucht und ihre Struktur aufgeklärt.

MPLC System:

Säule:	selbst gepackte 150 x 40 mm i.d. Polypropylen Kartusche gefüllt
	mit LiChroprep, 25 - 40 $\mu m,~RP18$ Material (Merck KGaA,
	Darmstadt, Deutschland)
Fluss:	40 mL/min
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser
	B: Methanol
Gradient:	A/B (100/0; v/v) für 8 min halten, in 25 min auf (20/80; v/v), in
	2 min auf (0/100; v/v), 10 min halten
Wellenlänge:	220 nm

HPLC System: 3

Säule:	Microsorb	100-5	C18,	250 x 21,2	mm i.	d.,	5 µm	(Varian,
	Darmstadt,	Deutsch	land)					
Fluss:	18 mL/min							
Fließmittel:	A: 0,1 % Ar	neisensä	äure in V	Wasser				
	B: Methano	I						
Gradient:	A/B (75/25	; v/v) fü	r 5 min	halten, in	20 min	auf	(40/60;	v/v), in
	5 min auf (0)/100; v/v	v), 5 mi	n halten				
Wellenlänge:	220 und 28	0 nm						

Tabelle 15: Übersicht über die eingesetzten Edukte und daraus gebildete Produkte bei der Reaktion von Di- und Trihydroxybenzolen (54 - 56, 58 - 59, 63) und deren Vorläufern (1, 7) mit Furanderivaten (32 - 34).

Di- und Trihydroxybenzol Furanderivat	Catechol (56)	Resorcin (63)	Pyrogallol (54)	Hydroxyhydrochinon (55)	4-Methylcatechol (58)	3-Methylcatechol (59)	Kaffeesäure (1)	Chlorogensäure (7)
Furfurylalkohol (32)	64	65	66	67	68	69	n.d.	n.d.
Furfural (33)	n.d.	70	71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-Hydroxymethylfurfural (34)	n.d.	72	73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: kein Reaktionsprodukt detektierbar. Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 4, 6, 9, 11, 16, 18 und 20.

Spektroskopische Daten der Verbindungen (die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 220, 284$ nm; LC-TOF-MS: gemessen: *m/z* 189,05457, berechnet für [C₁₁H₉O₃]⁻: 189,05572; MS-ESI⁻: *m/z* (%) 189 (100, [M-H]⁻); MS/MS (-54 V): *m/z* (%) 161 (100), 67 (65), 49 (35), 41 (20); ¹H-NMR (400 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 3,77 [s, 2H, H-C(7)], 5,96 [d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-C(9)], 6,27 [pt, 1H, *J* = 1,8 Hz, H-C(10)], 6,52 [dd, 1H, *J* = 1,9, 8,0 Hz, H-C(5)], 6,64 [d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-C(1)], 6,68 [d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-C(4)], 7,33 [d, 1H, *J* = 1,8 Hz, H-C(11)]; ¹³C-NMR (100 MHz, *d*₄-MeOD, 135DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 34,6 [CH₂, C(7)], 106,8 [CH, C(9)], 111,3 [CH, C(10)], 116,4 [CH, C(4)], 117,0 [CH, C(1)], 121,1 [CH, C(5)], 131,4 [C, C(6)], 142,5 [CH, C(11)], 144,9 [C, C(2)], 146,3 [C, C(3)], 156,8 [C, C(8)].

*1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (***65***)*: **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{max} = 212$, 272 nm; **LC-TOF-MS**: gemessen: *m/z* 189,05555, berechnet für $[C_{11}H_9O_3]^-$:

189,05572; **MS-ESI**: m/z (%) 189 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): m/z (%) 161 (80), 67 (100), 49 (55), 41 (40); ¹H-NMR (400 MHz, d_{4} -MeOD, COSY): δ [ppm] 3,80 [s, 2H, H-C(7)], 5,80

[dd, 1H, J = 0.9, 3,0 Hz, H-C(9)], 6,22 [dd, 1H, J = 2.4, 8,0 Hz, H-C(4)], 6,25 [dd, 1H, J = 1.8, 3,0 Hz, H-C(10)], 6,30 [d, 1H, J = 2.4 Hz, H-C(2)], 6,80 [d, 1H, J = 8.0 Hz, H-C(5)], 7,32 [s, 1H, J = 1.8 Hz, H-C(11)]; ¹³**C-NMR** (100 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 28,6 [CH₂, C(7)], 103,5 [CH, C(2)], 106,7 [CH, C(9)], 107,6 [CH, C(4)], 111,3 [CH, C(10)], 117,4 [C, C(6)], 131,8 [CH, C(5)], 142,1 [CH, C(11)], 156,9 [C, C(8)], 157,1 [C, C(1)], 158,1 [C, C(3)].

1,2,3-*Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol* (66): **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{max} = 220$, 280 nm; **LC-TOF-MS**: gemessen: *m/z* 205,05123, berechnet für [C₁₁H₉O₄]⁻:

HO

HO

HO

205,05063; **MS-ESI**: m/z (%) 205 (100, [M-H]); **MS/MS** (-54 V): m/z (%) 161 (100), 67 (65), 49 (35), 41 (20); ¹H-NMR (400 MHz, d_{4} -MeOD, COSY): δ [ppm] 3,83 [s, 2H, H-C(7)], 5,90 [dd, 1H, J = 0.9, 3,2 Hz, H-C(9)], 6,24 [dd, 1H, J = 1.8, 3,1 Hz,

H-C(10)], 6,27 [d, 1H, J = 8,3 Hz, H-C(4)], 6,37 [d, 1H, J = 8,3 Hz, H-C(5)], 7,31 [dd, 1H, J = 0,9, 1,8 Hz, H-C(11)]; ¹³**C-NMR** (100 MHz, d_{4} -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 28,8 [CH₂, C(7)], 106,6 [CH, C(9)], 107,7 [CH, C(4)], 111,1 [CH, C(10)], 118,2 [C, C(6)], 121,1 [CH, C(5)], 134,2 [C, C(2)], 142,0 [CH, C(11)], 145,3 [C, C(1)], 145,7 [C, C(3)], 156,7 [C, C(8)].

1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-benzol (**67**): **UV/Vis** (MeOH): $\lambda_{max} = 204$, 296 nm; **LC-TOF-MS**: gemessen: *m/z* 205,05123, berechnet für [C₁₁H₉O₄]⁻:

205,05063; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 205 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): *m/z* (%) 137 (100), 124 (50), 67 (15), 41 (20); ¹H-NMR (400 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 3,77 [s, 2H, H-C(7)], 5,93





OH

OH

ÓН

C(10)], 115,3 [C, C(6)], 116,6 [CH, C(5)], 137,5 [C, C(1)], 140,7 [CH, C(11)], 143,9 [C, C(3)], 147,5 [C, C(4)], 155,2 [C, C(8)].

1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol (68): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 220, 282 \text{ nm};$

LC-TOF-MS: gemessen: m/z 203,07151, berechnet für HO. $[C_{12}H_{11}O_3]$: 203,07137; **MS-ESI**: m/z (%) 203 (100, [M-H]); **MS/MS** (-64 V): *m/z* (%) 159 (70), 67 (100), 49 (50), 41 (40); ¹**H-NMR** (400 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 2,11 [s, 3H, H-



C(12)], 3,76 [s, 2H, C-H(7)], 5,85 [d, 1H, J = 3,0 Hz, H-C(9)], 6,26 [t, 1H, J = 2,0, 3,0 Hz, H-C(10)], 6,55 [s, 1H, H-C(5)], 6,57 [s, 1H, H-C(2)], 7,33 [s, 1H, J = 2,0 Hz, H-C(11)]; ¹³**C-NMR** (100 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 18,7 [CH₃, C(12)], 32,3 [CH₂, C(7)], 106,7 [CH, C(9)], 111,2 [CH, C(10)], 118,0 [CH, C(5)], 118,3 [CH, C(2)], 128,5 [C, C(6)], 128,8 [C, C(1)], 142,3 [CH, C(11)], 144,1 [C, C(3)], 144,7 [C, C(4)], 156,4 [C, C(8)].

1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69): UV/Vis (MeOH): λ_{max} = 220, 280 nm; LC-TOF-MS: gemessen: m/z 203,07084, berechnet für [C₁₂H₁₁O₃]⁻: 203,07137; **MS-ESI**⁻: *m*/*z* (%) 203 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-56 V): *m/z* (%) 175 (90), 67 (100), 49 (45), 41 (25); HO CH₃ ¹**H-NMR** (400 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 2,11 [s, 3H, ÓН H-C(12)], 3,82 [s, 2H, H-C(7)], 5,80 [dd, 1H, J = 0.8, 3,1 Hz,

H-C(9)], 6,25 [dd, 1H, J = 1,8, 3,1 Hz, H-C(10)], 6,48 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(5)], 6,57 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(4)], 7,32 [d, 1H, J = 1,8 Hz, H-C(11)]; ¹³C-NMR (100 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 12,0 [CH₃, C(12)], 33,0 [CH₂, C(7)], 106,7 [CH, C(9)], 111,3 [CH, C(10)], 113,1 [CH, C(4)], 121,8 [CH, C(5)], 124,7 [C, C(6)], 129,7 [C, C(3)], 142,2 [CH, C(11)], 144,7 [C, C(1)], 144,8 [C, C(2)], 156,8 [C, C(8)].

4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3-dihydroxybenzol (70): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 224$, 280 nm; LC-TOF-MS: gemessen: m/z 297,07715, berechnet für [C₁₇H₁₃O₅]⁻: 297,07685; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 297 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-56 V): *m/z* (%) 253 (55), 187 (60), 109 (45), 41 (20); ¹**H-NMR** (400 MHz, d_{4} -MeOD, COSY): δ [ppm] 5,70 [d, 1H, J = 3,1 Hz, H-C(9)], 5,84 [s, 1H, H-C(7)], 6,18 [dd, 2H, J = 2,4, 8,0 Hz, H-C(4, 4')], 6,25 [dd, 1H, J = 1,8, 3,1 Hz, H-C(10)], 6,28 [d, 2H, J = 2,4 Hz, H-C(2, 2')], 6,60 [d, 2H, J = 8,0 Hz, H-C(5, HO 5')], 7,34 [d, 1H, J = 1,8 Hz, H-C(11)]; ¹³C-NMR (100 MHz,





*d*₄-MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): *δ* [ppm] 36,1 [CH, C(7)], 102,1 [CH, C(4, 4')], 105,6 [CH, C(5, 5')], 106,8 [CH, C(9)], 109,4 [CH, C(10)], 120,1 [C, C(6, 6')], 129,1 [CH, C(2, 2')], 140,7 [CH, C(11)], 155,3 [C, C(1, 1')], 156,3 [C, C(3, 3')], 158,2 [C, C(8)].

4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-trihydroxybenzol (71): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 220$, 272 nm; LC-TOF-MS: gemessen: m/z 329,06726, berechnet OH für [C₁₇H₁₃O₇]⁻: 329,06668; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 329 (100, [M-H]⁻); OH **MS/MS** (-64 V): *m/z* (%) 283 (25), 203 (35), 125 (100), 41 (10); ¹**H-NMR** (400 MHz, d_{4} -MeOD, COSY): δ [ppm] 5,72 [d, 1H, OH J = 3,5 Hz, H-C(9)], 5,88 [s, 1H, H-C(7)], 6,17 [d, 2H, J = 8,5 Hz, H-C(5, 5')], 6,21-6,26 [m, 3H, H-C(4, 4', 10)], 7,33 [d, 1H, J = 1.8 Hz, H-C(11)]; ¹³C-NMR (100 MHz, d_4 -MeOD, OH HO 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 38,2 [CH, C(7)], 107,4 ÒΗ [CH, C(4, 4')], 108,4 [CH, C(9)], 110,8 [CH, C(10)], 120,6 [CH, C(5,5')], 122,3 [C, C(6, 6')], 134,2 [C, C(2, 2')], 142,1 [CH, C(11)], 144,9 [C, C(1, 1')], 145,6 [C, C(3, 3')], 159,3 [C, C(8)].

4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,3-dihydroxybenzol (72):

UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 216$, 280 nm; **LC-TOF-MS**: gemessen: *m/z* 419,11625, berechnet für [C₂₄H₁₉O₇]⁻: 419,11363; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 419 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): *m/z* (%) 309 (100), 253 (25), 159 (75), 149 (40), 109 (50), 41 (20); ¹**H-NMR** (400 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 3,75 [s, 2H, H-C(7)], 5,57 [d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-C(10)], 5,74 [d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-C(9)], 5,80 [s, HO 1H, H-C(12)], 6,19 [dd, 2H, *J* = 2,3, 8,2 Hz, H-C(17, 17')], 6,20 [dd, 1H, *J* = 2,3, 8,0 Hz, H-C(4)],



6,28 [m, 3H, H-C(2, 15, 15')], 6,63 [d, 2H, J = 8,2 Hz, H-C(18, 18')], 6,81 [d, 1H, J = 8,2 Hz, H-C(5)]; ¹³**C-NMR** (100 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 28,6 [CH₂, C(7)], 37,6 [CH, C(12)], 103,4 [CH, C(2)], 103,5 [CH, C(15, 15')], 107,0 [CH, C(9)], 107,1 [CH, C(17, 17')], 107,5 [CH, C(4)], 109,0 [CH, C(10)], 117,7 [C, C(6)], 121,9 [C, C(13, 13')], 131,1 [CH, C(18, 18')], 131,7 [CH, C(5)], 155,1 [C, C(1)], 156,6 [C, C(14, 14')], 156,9 [C, C(16, 16')], 157,6 [C, C(8)], 157,6 [C, C(11)], 157,8 [C, C(3)].

4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]bis-1,2,3-trihydroxybenzol (73):

UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 216$, 272 nm; **LC**-**TOF-MS**: gemessen: *m/z* 467,09972, berechnet für [C₂₄H₁₉O₁₀]⁻: 467,09836; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 467 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-66 V): *m/z* (%) 341 (100), 175 (65), 125 (40), 109 (15), 41 (5); ¹**H-NMR** (400 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 3,77 [s, 2H, H-C(7)], 5,59 [dd, 1H, *J* = 0,9, 3,1 Hz, H-C(9)], 5,73 [d, 1H, HO *J* = 3,1 Hz, H-C(10)], 5,82 [s, 1H, H-C(12)], 6,21 [d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H-C(17, 17')], 6,24 [d,



2H, J = 8,0 Hz, H-C(18, 18')], 6,36 [d, 1H, J = 8,3 Hz, H-C(4)], 6,39 [d, 1H, J = 8,3 Hz; H-C(5)]; ¹³C-NMR (100 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 28,9 [CH₂, C(7)], 38,9 [CH, C(12)], 107,0 [CH, C(17, 17')], 107,4 [CH, C(9)], 107,8 [CH, C(4)], 109,2 [CH, C(10)], 118,5 [C, C(6)], 120,7 [CH, C(18, 18')], 121,2 [CH, C(5)], 122,6 [C, C(13, 13')], 134,2 [C, C(15, 15')], 134,3 [C, C(2)], 144,8 [CH, C(14, 14')], 145,1 [C, C(1)], 145,5 [C, C(16, 16')], 145,6 [C, C(3)], 155,1 [C, C(8)], 157,3 [C, C(11)].

3.3.4 Synthese von isotopenmarkierten Standards aus Catechol und Pyrogallol mit Furfurylalkohol

3.3.4.1 [²H₂]-Furfurylalkohol

10 mmol 2-Furoylchlorid werden in 10 mL trockenem Diethylether gelöst. Diese Lösung wird Argonatmosphäre auf 0°C abgekühlt und tropfweise werden 12 mmol unter Lithiumaluminiumdeuterid in 25 mL Diethylether hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wird 15 min gerührt. Anschließend wird der Ansatz 3 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach der Erhitzung wird der Reaktionsansatz mit 50 mL Eiswasser hydrolysiert. Durch Zugabe von 2 mol/L Schwefelsäure wird der pH Wert auf 2 eingestellt. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck verbleibt der deuterierte Furfurylalkohol ([²H₂]-32) als ölige Flüssigkeit. Der deuterierte Furfurylalkohol ([²H₂]-32) wird mittels MS/MS und NMR-Experimenten analysiert.

Spektroskopische Daten der Verbindung (die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf die nebenstehende Struktur):

[²H₂]-*Furfurylalkohol* (**[**²H₂**]-32**): ¹H-NMR (500 MHz, *d*₄-MeOD): δ [ppm] 6,28 [d, 1H, J = 3,1 Hz, C-H(3)], 6,35 [dd, 1H, J = 2,0, 3,3 Hz, H-C(4)], 7,43 [d, 1H, J = 1,8 Hz, H-C(5)]; ¹³C-NMR: (125 MHz, MeOD): δ [ppm] 56,8 [q, CD₂, C(1)], 108,4 [CH, C(3)], 111,3 [CH, C(4)], 143,5 [CH, C(5)], 155,9 [C, $\sqrt[5]{//}$ OH C(2)].

3.3.4.2 Synthese der isotopenmarkierten Furan-2-ylmethylhydroxybenzol-Derivate

Zur Synthese der isotopenmarkierten Standards werden binäre Mischungen von Catechol (**56**) und Pyrogallol (**54**) (1 mmol) mit [²H₂]-Furfurylalkohol (5 mmol) in wässriger essigsaurer Lösung (7,5 mL, 1 % in Wasser) bei 100 °C für zwei Stunden in einem verschlossenen Sovirell Glas (60 mL) erhitzt. Nach Abkühlen der Verbindungen erfolgt eine Verdünnung mit 2,5 mL Methanol. Die Auftrennung der Reaktionsansätze wird mittels MPLC und anschließender semipräparativer HPLC, wie zuvor für die unmarkierten Produkte beschrieben durchgeführt (Kapitel 3.3.3). Die Fraktionen, welche die Zielverbindungen enthalten, werden gesammelt, vom Lösungsmittel befreit und die Rückstände lyophilisiert. Mittels UV/Vis-, LC-MS-, HRMS und 1D- und 2D-NMR-Experimenten werden die erhaltenen Verbindungen untersucht und ihre Struktur aufgeklärt.

Spektroskopische Daten der Verbindungen (die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-y/[$^{2}H_{2}$]methyl)-benzol ([$^{2}H_{2}$]-64): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 220$, 284 nm; MS-ESI: *m/z* (%) 191 (100, [M-H]⁻); MS/MS (-54 V): *m/z* (%) 163 (15), 68 (20), 49 (20), 41 (20); ¹H-NMR (500 MHz, *d_{4*-MeOD): δ [ppm] 5,97 [d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H-C(9)], 6,25 [dd, 1H, *J* = 1,9, 3,1 Hz, H-C(10)], 6,54 [dd, 1H, *J* = 1,9, 8,0 Hz, H-C(5)], 6,66 [d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-C(1)], 6,69 [d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-C(4)], 7,35 [s, 1H, H-C(11)]; ¹³C-NMR (125 MHz, MeOD): δ [ppm] 106,7 [CH, C(9)], 111,2 [CH, C(10)], 116,4 [C, C(3)], 116,9 [C, C(6)], 122,0 [CH,

δ [ppm] 106,7 [CH, C(9)], 111,2 [CH, C(10)], 116,4 [C, C(3)], 116,9 [C, C(6)], 122,0 [CH, C(4)], 131,3 [CH, C(5)], 142,4 [CH, C(11)], 144,9 [CH, C(1)], 146,3 [C, C(2)], 156,8 [C, C(8)].
1,2,3-*Trihydroxy-4-(furan-2-yl*²*H*₂*]methyl)-benzol* ([²H₂]-66): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 220$, 280 nm; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 207 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): *m/z* (%) 163 (7), 67 (10), 49 (10), 41 (10); ¹H-NMR (500 MHz,

*d*₄-MeOD): δ [ppm] 5,90 [d, 1H, *J* = 3,0 Hz, H-C(9)], 6,24 [q, 1H, *J* = 1,8, 3,0 Hz, H-C(10)], 6,27 [d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-C(4)], 6,37 [d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-C(5)], 7,31 [d, 1H, *J* = 1,7 Hz, H-C(11)]: ¹³**C-NMR** (125 MHz, MeOD): δ [ppm] 106,6 [CH, C(9)],



107,8 [CH, C(4)], 111,1 [CH, C(10)], 118,9 [C, C(6)], 121,1 [CH, C(5)], 134,3 [C, C(2)], 142,0 [CH, C(11)], 145,3 [C, C(1)], 145,7 [C, C(3)], 156,7 [C, C(8)].

3.4 Synthese von Hydroxyzimtsäure-Maillard-Reaktionsprodukten

3.4.1 Identifizierung von Reaktionsprodukten in Modellreaktionen

Um mögliche Reaktionsprodukte, die unter *Maillard*-Reaktionsbedingungen mit Hydroxyzimtsäuren gebildet werden können, zu identifizieren, werden binäre Mischungen mit Saccharose (5 mmol) und Kaffeesäure (1) (1 mmol), sowie L-Asparagin (1 mmol) und Kaffeesäure (1) (1 mmol) unter Modellröstbedingungen erhitzt. Außerdem wird noch ein Reaktionsansatz mit einer ternären Mischung aus Saccharose (5 mmol), L-Asparagin (1 mmol) und Kaffeesäure (1) (1 mmol) unter den gleichen Bedingungen angesetzt. Für die Modellröstuntersuchungen werden die Proben mit 5 g Seesand und 500 µL Wasser vermischt und in einem geschlossenen Sovirell Glas (25 mL) und für 15 min auf 200 °C erhitzt. Die so gerösteten Proben werden mit Methanol (2x 20 mL) extrahiert, und das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Nach Lösung des Rückstandes in Wasser (50 mL) wird die Mischung mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die so erhaltenen Proben werden in 4 mL Wasser/Methanol (3/1; v/v) gelöst und mittels HPLC-DAD mit System 2 analysiert.

HPLC System: 2

Säule:	Microsorb 100-5 C18, 250 x 4,6mm i.d., 5 μm (Varian, Darmstadt,			
	Deutschland)			
Fluss:	0,8 mL/min			
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser			
	B: Methanol			
Gradient:	A/B (100/0; v/v) für 5 min halten, in 30 min auf (0/100; v/v), 5 min			
	halten			
Detektion:	DAD Detektor			

3.4.2 Optimierung der Modellröstansätze

In Anlehnung an *Jiang et al. (2009)* werden Mischungen von Kohlenhydraten (10 mmol für Monosaccharide, 5 mmol für Disaccharide), Aminosäuren (1 mmol) und Hydroxyzimtsäuren (1 mmol), 4-Vinylcatechol (1 mmol) oder Chlorogensäure (1 mmol) mit 5 g Quarzsand und 500 μ L Wasser in einem Sovirell Glas (25 mL) gemischt und für 15 min in einem Aluminiumheizblock erhitzt. Nach Abkühlen werden die Ansätze mit Methanol (2x 20 mL) extrahiert, und das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck entfernt. Nach Lösen des Rückstandes in Wasser (50 mL) wird die Mischung mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer abgezogen. Die so extrahierten Proben werden in 4 mL Wasser/Methanol (3/1; v/v) gelöst, membranfiltriert, 1/100 mit Wasser verdünnt und Aliquote (5 μ L) mittels HPLC-MS/MS analysiert.

HPLC-MS/MS:

Säule:	Luna Phenyl Hexyl, 150 x 2,1 mm i.d., 5 μm (Phenomenex,
	Aschaffenburg, Deutschland)
Fluss:	0,25 mL/min
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
	B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser
Gradient:	A/B (0/100; v/v) für 3 min halten, in 12 min auf (60/40; v/v), in
	12 min auf (70/30; v/v), in 2 min auf (100/0; v/v), 5 min halten
Detektion:	API 3200, MS ESI ⁻ , MRM-Mode

3.4.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wird die Reaktion des ternären Gemisches aus Saccharose, L-Asparagin und Kaffeesäure (5 mmol/ 1 mmol/ 1 mmol) bei unterschiedlichen Temperaturen in einem geschlossenen Sovirell Glas, wie unter 3.4.2 beschrieben, erhitzt. Es werden Temperaturen zwischen 120 °C und 220 °C untersucht. Nach der Extraktion mit Methanol, gefolgt von Ethylacetat, werden die Rückstände in Wasser/Methanol (7/3; v/v; 4 mL) gelöst membranfiltriert, 1/100 mit Wasser verdünnt und mittels HPLC-MS/MS analysiert.

3.4.2.2 Einfluss des Phenols auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Um die Rolle von potentiellen Präkursoren zu untersuchen, die bei der Entstehung der Reaktionsprodukte in Kaffee eine Rolle spielen können, wird Chlorogensäure, welche der Kaffeesäurepräkursor in Kaffee ist, als Reaktionsprodukt eingesetzt. Außerdem wird 4-Vinylcatechol, welches als Schlüsselintermediat in dem postulierten Reaktionsmechanismus angesehen wird, gemeinsam mit Saccharose und L-Asparagin unter den zuvor genannten Modellröstbedingungen auf 200 °C für 15 min erhitzt (Kapitel 3.4.2). Die so erhaltenen Reaktionsmischungen werden nach der Extraktion mit Methanol und Ethylacetat mittels HPLC-MS/MS analysiert.

3.4.2.3 Einfluss des Kohlenhydrates auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Um zu untersuchen, welchen Einfluss unterschiedliche Kohlenhydrate auf die Ausbeuten der Reaktionsprodukte haben, werden die Monosaccharide Glukose und Fruktose sowie das Disaccharid Saccharose in Gegenwart von Glycin und Kaffeesäure (10 mmol Monosaccharid und 5 mmol Disaccarid/ 1 mmol/ 1 mmol) unter Modellröstbedingungen (200 °C, 15 min) erhitzt. Nach Extraktion werden die relativen Ausbeuten via HPLC-MS/MS bestimmt.

3.4.2.4 Einfluss der Aminosäure auf die Generierung von Reaktionsprodukten

Um die Abhängigkeit der Ausbeuten der Reaktionsprodukte von der Aminosäure zu untersuchen, werden Modellröstexperimente (200 °C, 15 min) unter Verwendung von Glukose und Kaffeesäure mit unterschiedlichen Aminosäuren (10 mmol/ 1 mmol/ 1 mmol) durchgeführt. Als Aminosäuren werden die geladenen Aminosäuren L-Lysin und

L-Asparaginsäure, die ungeladenen Aminosäuren mit einer polaren Seitenkette L-Asparagin und L-Cystein, sowie die ungeladenen Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette L-Glycin und L-Phenylalanin, eingesetzt. Die so erhaltenen Reaktionsprodukte werden mit Methanol und Ethylacetat extrahiert und nach Lösen in 4 mL Wasser/Methanol (7/3; v/v) und einer 1/100 Verdünnung mit Wasser mittels HPLC-MS/MS quantifiziert.

3.4.3 Präparative Ansätze zur Isolierung der generierten Reaktionsprodukte

Mischungen von Monosacchariden (30 mmol; Glukose oder Ribose), L-Asparagin (3 mmol) und Hydroxyzimtsäuren (3 mmol; Kaffeesäure oder Ferulasäure) werden mit 15 g Quarzsand und 1500 µL Wasser vermischt und 15 min bei 200 °C erhitzt. Die Reaktionsansätze werden, wie zuvor beschrieben, mit Methanol und Ethylacetat extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter Vakuum werden die Proben in 20 mL Wasser/Methanol (3/1; v/v) gelöst und Aliquote werden mittels MPLC unter Verwendung eines Büchi Sepacore Systems aufgetrennt. Die Fraktionierung erfolgt mittels eines automatischen Fraktionssammlers. Die Fraktionen, die eine UV-Absorption bei 280 nm aufweisen, werden individuell gesammelt. Die Fraktionen, welche die Zielverbindungen enthalten, werden vereinigt, vom Lösungsmittel befreit und im Anschluss mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Die vereinigten Eluate werden vom Lösungsmittel befreit und die Rückstände lyophilisiert. Mittels UV/Vis-, LC-MS-, HRMS und 1D- und 2D-NMR-Experimenten werden die erhaltenen Verbindungen untersucht und ihre Struktur aufgeklärt.

MPLC System:

Säule:	selbst gepackte 150 x 40 mm i.d. Polypropylen Kartusche gefül				
	mit LiChroprep, 25 - 40 $\mu m,~RP\mbox{-}18$ Material (Merck KGaA,				
	Darmstadt, Deutschland)				
Fluss:	40 mL/min				
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser				
	B: Methanol				
Gradient:	A/B (100/0; v/v) für 8 min halten, in 45 min auf (0/100; v/v), 10 min				
	halten				
Wellenlänge:	280 nm				

HPL	С.	System:	: 3

Säule:	Microsorb	100-5	C18,	250 x 21,2 m	m i.d.,	5 µm	(Varian,
	Darm-stadt	Deutsc	hland)				
Fluss:	18 mL/min						
Fließmittel:	A: 0,1 % Ar	neisensä	äure in '	Wasser			
	B: Methano	I					
Gradient:	A/B (85/15;	v/v) füi	r 13 mi	n halten, in 1	2 min au	f (65/35	; v/v), in
	5 min auf (0)/100; v/	v), 5 mi	n halten			
Wellenlänge:	220 und 28	0 nm					

Spektroskopische Daten der Verbindungen (die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74):

UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 224$, 284 nm; **LC-TOF-MS**: gemessen: *m*/*z* 261,07641, berechnet für [C₁₄H₁₃O₅]: 261,07685; **MS-ESI**: *m*/*z* (%) 261 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): *m*/*z* (%) 261 (100), 203 (15), 201 (15), 189 (15), 136 (15); ¹**H-NMR** (500 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 1,92 [ddd, 1H, J = 1,3, 7,0, 13,5 Hz, C-H(6 α)], 2,89 [dt, 1H, J = 3.8, 9.3, 13.5 Hz, H-C(6 β)], 3,51 [dd, 1H, J = 7.1, 10,0 Hz, H-C(5)], 3,72 [d, 1H, J = 12,2 Hz, H-C(8 α)], 3,84 [d, 1H, J = 12,2 Hz, H-C(8 β)], 4,53 [d, 1H, J = 8,5 Hz, H-C(7)], 6,19 [d, 1H, J = 10 Hz, H-C(2)], 6,52 [dd, 1H, J = 1.8, 8,1 Hz, H-C(4')],



6,61 [d, 1H, J = 1,8 Hz, H-C(6')], 6,67 [d, 1H, J = 8,1 Hz, H-C(3')], 6,77 [d, 1H, J = 10,0 Hz, H-C(3)]; ¹³C-NMR (125 MHz, *d*₄-MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 34,8 [CH₂, C(6)], 48,3 [CH, C(5)], 64,0 [CH₂, C(8)], 82,0 [CH, C(7)], 87,2 [C, C(4)], 116,3 [CH, C(3')], 116,7 [CH, C(6')], 121,4 [CH, C(4')], 128,8 [CH, C(2)], 129,7 [C, C(5')], 145,8 [C, C(2')], 146,3 [C, C(1')], 155,4 [CH, C(3)], 199,2 [C, C(1)].

exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75):

UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 236$, 284 nm; **LC-TOF-MS**: ge-OH messen: m/z 261,07610, berechnet für $[C_{14}H_{13}O_5]^{-1}$: 261,07685; **MS-ESI**⁻: *m/z* (%) 261 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): *m/z* (%) 261 (100), 203 (15), 201 (15), 189 (15), 136 (15); ¹**H-NMR** (500 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 2,33 [dd, 1H, J = 9,0, 14,0 Hz, C-H(6 α)], 2,48 [ddd, 1H, OH J = 2,2, 9,0, 14,0 Hz, H-C(6 β)], 3,19 [d, 1H, J = 12,0 Hz, H-C(8 α)], 3,27 [dd, 1H, J = 3,0,

O

9,6 Hz, H-C(5)], 3,43 [d, 1H, J = 12,0 Hz, H-C(8 β)], 4,67 [d, 1H, J = 8,5 Hz, H-C(7)], 6,02 [d, 1H, J = 9,8 Hz, H-C(2)], 6,55 [d, 1H, J = 7,8 Hz, H-C(4')], 6,58 [s, 1H, H-C(6')], 6,69 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(3')], 7,50 [d, 1H, J = 10,0 Hz, H-C(3)]; ¹³**C-NMR** (125 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 37,3 [CH₂, C(6)], 48,8 [CH, C(5)], 65,1 [CH₂, C(8)], 82,4 [CH, C(7)], 88,0 [C, C(4)], 116,5 [CH, C(3')], 116,5 [CH, C(6')], 121,2 [CH, C(4')], 126,2 [CH, C(2)], 133,3 [C, C(5')], 145,5 [C, C(2')], 146,3 [C, C(1')], 157,6 [CH, C(3)], 199,4 [C, C(1)].

endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (**76**): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 236, 284$ nm; LC-TOF-MS: gemessen: *m/z* 231,06730, berechnet für [C₁₃H₁₁O₄]⁻: 231,06628; MS-ESI⁻: *m/z* (%) 231 (100, [M-H]⁻); MS/MS (-54 V): *m/z* (%) 231 (100), 203 (15), 201 (15), 187 (30), 135 (25); ¹H-NMR (500 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 1,86 [ddd, 1H, *J* = 1,6, 7,0, 13,5 Hz, C-H(6α)], 2,78 [dt, 1H, *J* = 9,5, 18,6 Hz, H-C(6β)], 3,74 [dt, 1H, *J* = 7,0, 14,1 Hz, H-C(5)], 4,54 [d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H-C(7)], 4,90 [dd, 1H, *J* = 4,4, 6,5 Hz, H-C(4)], 6,06 [dd, 1H, *J* = 0,7, 9,8 Hz, H-C(2)], 6,56 [dd, 1H, *J* = 1,6, 8,1 Hz, H-C(4⁻)], 6,65 [d, 1H, *J* = 1,6 Hz, H-C(6⁻)], 6,67 [d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-C(3⁻)],

6,95 [dd, 1H, J = 4,3, 9,8 Hz, H-C(3)]; ¹³**C-NMR** (125 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 32,0 [CH₂, C(6)], 48,2 [CH, C(5)], 78,5 [CH₂, C(4)], 83,1 [CH, C(7)], 116,3 [CH, C(6')], 116,4 [CH, C(3')], 120,8 [CH, C(4')], 127,6 [CH, C(2)], 130,1 [C, C(5')], 145,5 [C, C(2')], 146,4 [C, C(1')], 154,9 [CH, C(3)], 199,2 [C, C(1)].

endo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on

(77): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 224$, 284 nm; LC-TOF-MS: gemessen: *m/z* 275,09222, berechnet für [C₁₅H₁₅O₅]⁻: 275,09250; MS-ESI⁻: *m/z* (%) 275 (100, [M-H]⁻); MS/MS (-54 V): *m/z* (%) 275 (100), 203 (25), 201 (25), 188 (20), 134 (20); ¹H-NMR (500 MHz, *d*₄-MeOD, COSY): δ [ppm] 1,98 [ddd, 1H, *J* = 1,6, 7,0, 13,7 Hz, C-H(6α)], 2,91 [ddd, 1H, *J* = 3,8, 9,1,18,8 Hz, H-C(6β)], 3,60 [dd, 1H, *J* = 7,0, 10,2 Hz, H-C(5)], 3,73 [d, 1H, *J* = 12,4 Hz, H-C(8α)], 3,82 [s, 3H, H-C(7⁻)], 3,84 [d, 1H, *J* = 12,3 Hz, H-C(8β)], 4,55 [d, 1H, *J* = 8,6 Hz, H-C(7)], 6,20 [dd, 1H, *J* = 1,0, 10,0 Hz, H-C(2)],



6,64 [dd, 1H, J = 1.9, 8,2 Hz, H-C(4´)], 6,71 [d, 1H, J = 8.1 Hz, H-C(3´)], 6,75 [d, 1H, J = 1.9 Hz, H-C(6´)], 6,77 [d, 1H, J = 10.4 Hz, H-C(3)]; ¹³**C-NMR** (125 MHz, d_4 -MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 34,8 [CH₂, C(6)], 48,5 [CH, C(5)], 56,5 [CH₃, C(7´)], 63,9 [CH₂, C(8)], 81,9 [CH, C(7)], 87,2 [C, C(4)], 113,7 [CH, C(6´)], 116,2 [CH, C(3´)], 122,4 [CH,

C(4´)], 128,9 [CH, C(2)], 129,7 [C, C(5´)], 145,1 [C, C(2´)], 148,9 [C, C(1´)], 155,3 [CH, C(3)], 199,2 [C, C(1)].

exo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (78): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 236$, 284 nm; LC-TOF-MS: gemessen: *m*/*z* 275,09212, berech-

net für $[C_{15}H_{15}O_5]$: 275,09250; **MS-ESI**: *m/z* (%) 275 (100, [M-H]); **MS/MS** (-54 V): *m/z* (%) 275 (100), 203 (25), 201 (25), 188 (20), 134 (20); ¹H-NMR (500 MHz, d_4 -MeOD, COSY): δ [ppm] 2,35 [ddd, 1H, J = 1,6, 9,2,14,0 Hz, C-H(6 α)], 2,52 [ddd, 1H, J = 3,1, 8,7, 14,1 Hz, H-C(6 β)], 3,18 [d, 1H, J = 11,8 Hz, H-C(8 α)], 3,36 [dd, 1H,



J = 3,2, 9,1 Hz, H-C(5)], 3,42 [d, 1H, *J* = 11,8 Hz, H-C(8β)], 3,84 [s, 1H, H-C(7΄)], 4,71 [d, 1H, *J* = 8,7 Hz, H-C(7)], 6,03 [dd, 1H, *J* = 0,8, 9,9 Hz, H-C(2)], 6,68 [dd, 1H, *J* = 1,9, 8,1 Hz, H-C(4΄)], 6,73 [d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-C(3΄)], 6,80 [d, 1H, *J* = 1,9 Hz, H-C(6΄)], 7,52 [d, 1H, *J* = 9,9 Hz, H-C(3)]; ¹³**C-NMR** (125 MHz, *d*₄-MeOD, 135-DEPT, HMQC, HMBC): δ [ppm] 37,3 [CH₂, C(6)], 48,9 [CH, C(5)], 56,5 [CH₃, C(7΄)], 65,0 [CH₂, C(8)], 82,4 [CH, C(7)], 88,0 [C, C(4)], 113,3 [CH, C(6΄)], 116,1 [CH, C(3΄)], 122,3 [CH, C(4΄)], 126,2 [CH, C(2)], 133,3 [C, C(5΄)], 146,8 [C, C(2΄)], 148,9 [C, C(1΄)], 157,5 [CH, C(3)], 199,4 [C, C(1)].

3.4.4 Synthese des "Carbon Bond Labeling" (CBL)-Standards

Für den CBL-Standard wird ein präparativer Ansatz aus einer Mischung von [¹³C₆]-D-Glukose (1,5 mmol), D-Glukose (28,5 mmol), Glycin (3 mmol) und Kaffeesäure (1) (3 mmol) mit 15 g Quarzsand und 150 µL Wasser in einem geschlossenen Sovirell Glas (60 mL) hergestellt. Die Mischung wird unter Modellröstbedingungen bei 200 °C für 15 min erhitzt. Nach Abkühlen werden die Zielverbindungen, wie zuvor in Kapitel 3.4.3 beschrieben, unter Verwendung von MPLC und präparativer HPLC isoliert und aufgereinigt. Mittels LC-MS- und 1D-NMR-Experimenten werden die erhaltenen Verbindungen untersucht und der Einbau der Markierung überprüft.

Synthese des ¹³C-markierten Standards der endo- und exo-8-3.4.5 Oxabicyclo[3.2.1][¹³C₆]oct-3-en-2-on-Reaktionsprodukte

Für die quantitative Untersuchung von Kaffeeproben wird ein interner Standard unter Verwendung von total markierter [¹³C₆]-Glukose synthetisiert.

Für den ¹³C-markierten Standard wird ein präparativer Ansatz aus einer Mischung von [¹³C₆]-D-Glukose (30 mmol), Glycin (3 mmol) und Kaffeesäure (1) (3 mmol) analog zur Durchführung in Kapitel 3.4.4 erhitzt, die Zielverbindungen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt.

Spektroskopische Daten der isotopenmarkierten Verbindungen (die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1][¹³C₆]oct-3-en-2-on ([¹³C₆]-74): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 224$, 284 nm; MS-ESI⁻: m/z (%) 267 (100, [M-H]⁻); **MS/MS** (-54 V): *m/z* (%) 267 (100), 207 (15), 205 (15), 191 (10); ¹³**C-NMR** (125 MHz, d_{4} -MeOD): δ [ppm] 64.0 [dd, J = 2.9, 45.3 Hz; C(8)], 81,9 [ddd, J = 2,9, 10,9, 45,3 Hz, C(7)], 87,2 [dd, J = 45,0, 45,0 Hz, C(4)], 128,8 [ddd, J = 10,9, 50,3, 61,2 Hz, C(2)], 155,4 [ddd, HC J = 2,7, 45,0, 61,2 Hz, C(3)], 199,2 [ddd, J = 2,7, 45,3, 50,3 Hz, C(1)].



exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1][¹³C₆]oct-3-en-2-on

([¹³C₆]-75): UV/Vis (MeOH): $\lambda_{max} = 236$, 284 nm; MS-ESI⁻: m/z(%) 267 (100, [M-H]⁻); MS/MS (-54 V): m/z (%) 267 (100), 207 но (15), 205 (15), 191 (10); ¹³**C-NMR**: (125 MHz, d_4 -MeOD): δ [ppm] 65,1 [dd, J = 3,5, 45,0 Hz, C(8)], 82,4 [ddd, J = 3,5, 11,3,45,7 Hz, C(7)], 88,0 [dd, J = 45,0, 45,0 Hz, C(4)], 126,2 [ddd,



J = 11,3, 50,0, 61,2 Hz, C(2)], 157,6 [ddd, J = 2,7, 45,0, 61,2 Hz, C(3)], 199,4 [ddd, J = 2,7, 45,0, 61,2 45,7, 50,0 Hz, C(1)].

3.5 Quantitative Analytik

3.5.1 Quantifizierung der Furan-2-ylmethylhydroxybenzole in Kaffee

Zur Quantifizierung der Furan-2-ylmethylhydroxybenzole in Kaffee wird aus den speziell gerösteten Arabica- und Robusta-Proben ein Standardkaffeegetränk (54 g/L) bereitet. Zu 1 mL Kaffeegetränk werden 5 μ L des internen Standards (c = 0,108 mg/mL 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-yl[²H₂]methyl)-benzol ([²H₂]-64), 0,195 mg/mL 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2yl[²H₂]methyl)-benzol ([²H₂]-66) pipettiert. Nach 10 min Equilibrierzeit wird die Probe membranfiltriert und direkt zur Analyse mittels HPLC-MS/MS verwendet.

Zur Analyse von Espresso-Getränken wird je eine Kapsel Espresso-Kaffee mit 19 bar Druck und 40 mL heißem Wasser aufgebrüht. 1 mL Espresso-Getränk wird mit dem internen Standard versetzt (5 µL) und nach Inkubation von 10 min und Membranfiltration wird die Probe direkt mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Spektrometer:	4000 QTrap (AB SCIEX Instruments, Darmstadt, Deutschland)			
lonisierung:	Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI)			
Scantyp:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)			
Polarität:	Negativ			
Ion Spray Voltage:	-4500 V			
Stationäre Phase:	Luna Phenyl Hexyl, 150 x 2,1 mm i.d., 5 $\mu m,$ (Phenomenex,			
	Aschaffenburg, Deutschland)			
Fluss:	250 μL/min			
Injektionsvolumen:	5 µL			
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Methanol			
	B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser			
Gradient:	A/B (0/100; v/v) für 3 min halten, in 7 min auf (40/60; v/v); in 5 min			
	auf (60/40; v/v), in 12 min auf (70/30; v/v), in 2 min auf (100/0; v/v),			
	2 min halten			

<u>Tuning:</u> Für die Analyten und die internen Standards werden die Ionisierungsparameter unter Nutzung des Tools "*Quantitative Optimization*" (Analyst 1.5) optimiert. Dabei werden das Declustering Potential (DP), die Collision Energy (CE) und das Cell Exit Potential (CXP) für jeden Analyten separat optimiert. Die Probelösung wird über die Spritzenpumpe (10 µL/min) gefördert. Die optimierten Parameter sind in **Tabelle 16** zusammengefasst.

	IS ^b	MWc	Massenübergang					
Substanz (Nr.) ^a		[Da]		[<i>m/z</i>]		DP^{d}	CEe	CXP ^f
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol	$([^{2}H_{2}]-64)$	190,2	189	→	161	-80	-28	-9
(64)			189	\rightarrow	67	-80	-30	-3
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-yl[² H ₂]methyl)-		192,2	191	→	163	-85	-26	-9
benzol (² H ₂ -64)			191	→	67	-85	-36	-3
1,3-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol		190,2	189	→	161	-75	-26	-13
(65)			189	→	67	-75	-36	-13
1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-		206,2	205	→	67	-60	-38	-3
benzol (66)			205	→	43	-60	-28	-1
1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-yl[² H ₂]methyl)-	([² H ₂]-66)	208,2	207	→	67	-85	-38	-11
benzol ([²H₂]-66)			207	→	41	-85	-20	-5
1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2-ylmethyl)-		206,2	205	\rightarrow	67	-70	-40	-1
benzol (67)			205	→	43	-70	-30	-5
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-	$([^{2}H_{2}]-64)$	204,2	203	→	67	-90	-42	-9
methylbenzol (68)			203	→	159	-90	-34	-11
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-	$([^{2}H_{2}]-64)$	204,2	203	→	67	-90	-32	-3
methylbenzol (69)			203	\rightarrow	175	-90	-24	-3
4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,3-		330,2	329	→	125	-40	-40	-1
dihydroxybenzol (70)			329	→	203	-40	-22	-1
4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-		298,2	297	\rightarrow	187	-70	-18	-3
trihydroxybenzol (71)			297	→	253	-70	-26	-5
4,4'-[[5-[(2,4-dihydroxyphenyl)methyl]-2-		420,4	419	→	309	-70	-18	-7
furanyl]methylene]bis-1,3-dihydroxybenzol			419	→	159	-70	-36	-13
(72)								
4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-		468,4	467	→	341	-60	-24	-21
turanyıjmethylenjbis-1,2,3- trihydroxybenzol (73)			467	→	175	-60	-48	-13

Tabelle16:AusgewählteMassenübergängeunddieoptimiertenBedingungenfürdiequantitativeBestimmungder geschmacksaktivenVerbindungen(64-73) in Kaffee.

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 16**, **18** und **20**, ^b für die Quantifizierung verwendeter Interner Standard, ^c Molekulargewicht, ^d Declustering Potential, ^e Collision Energie, ^f Cell Exit Potential.

<u>Standards:</u> Für die mit Deuterium markierten internen Standards 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2- $y|[^{2}H_{2}]methyl)$ -benzol (**[**²**H**₂**]-64**) und 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2- $y|[^{2}H_{2}]methyl)$ -benzol (**[**²**H**₂**]-66**) sowie für die zu quantifizierenden Analyten wird jeweils eine Stammlösung hergestellt (ca. 10 - 20 mg/10 mL in Methanol). Für die internen Standards erfolgt eine 1:10 Verdünnung

und die zu quantifizierenden Analyten werden in einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 1:3 verdünnt.

<u>Kalibration:</u> Die isotopenmarkierten internen Standards werden mit den unmarkierten Derivaten in Konzentrationsverhältnissen von 0,01 bis 7 gemischt und per HPLC-MS/MS analysiert. Die Kalibrationsgeraden werden durch Auftragen der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt / Fläche IS) gegen die Konzentrationsverhältnisse (c Analyt / c IS) erhalten (6 Messpunkte) (**Tabelle 17**).

Substanz (Nr.) ^a	Verwendeter interner Standard	Geradengleichung ^b (R ²)
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2- ylmethyl)-benzol (64)	([² H ₂]-64)	y = 1610,5x + 0,0017 (0,9997)
1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2- ylmethyl)-benzol (66)	([² H ₂]-66)	y = 3158,5x + 0,0004 (0,9729)
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2- ylmethyl)-5-methylbenzol (68)	([² H ₂]-6 4)	y = 6019,4x - 0,1252 (0,9989)
1,2-Dihydroxy-4-(furan-2- ylmethyl)-3-methylbenzol (69)	([² H ₂]-64)	y = 1250,2x + 0,0272 (0,9995)

Tabelle 17: Zur Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS eingesetzte Kalibrierfunktionen.

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 16**, ^b y = Fläche (Analyt / interner Standard), x = Konzentration (Analyt / interner Standard)

3.5.2 Quantifizierung der Hydroxybenzole in Kaffee

Zur Quantifizierung der Hydroxybenzole in Kaffeegetränken wird aus den speziell gerösteten Arabica- und Robusta-Proben ein Standardkaffeegetränk (54 g/L) bereitet, welches direkt nach Membranfiltration zur Analyse mittels HPLC-MS/MS verwendet wird.

Zur Analyse von Espresso-Getränken wird je eine Kapsel Espresso-Kaffee mit 19 bar Druck und 40 mL heißem Wasser aufgebrüht. Das Kaffeegetränk wird membranfiltriert und direkt mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Spektrometer:	4000 QTrap (AB SCIEX Instruments, Darmstadt, Deutschland)			
Ionisierung:	Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI)			
Scantyp:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)			
Polarität	Negativ			
Ion Spray Voltage:	-4500 V			
Stationäre Phase:	Luna Phenyl Hexyl, 150 x 2,1 mm i.d., 5 µm (Phenomenex,			
	Aschaffenburg, Deutschland)			

Fluss:	250 μL/min
Injektionsvolumen:	5 μL
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
	B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser
Gradient:	A/B (0/100; v/v) für 3 min halten, in 7 min auf (40/60; v/v); in 5 min
	auf (60/40; v/v), in 12 min auf (70/30; v/v), in 2 min auf (100/0; v/v),
	2 min halten

<u>Tuning:</u> Für die Analyten werden die Ionisierungsparameter unter Nutzung des Tools "*Quantitative Optimization*" (Analyst 1.5) optimiert. Die Probelösung wird über die Spritzenpumpe (10 µL/min) gefördert. Die optimierten Parameter sind in **Tabelle 18** zusammengefasst.

Tabelle 18: Ausgewählte Massenübergänge und die optimierten Bedingungen für die quantitative Bestimmung der Hydroxybenzole (1, 54, 56, 58 und 59) in Kaffee.

	MW ^b	Massenübergang					
Substanz (Nr.) ^a	[Da]	[/	m/z]		DP	\mathbf{CE}^{d}	CXP ^e
Kaffeesäure (1)	180,2	179	→	135	-55	-24	-7
		179	→	107	-55	-32	-5
Catechol (56)	110,1	109	→	91	-75	-28	-5
		109	→	81	-75	-24	-5
Pyrogallol (54)	126,1	125	→	69	-70	-26	-11
		125	→	97	-70	-28	-3
4-Methylcatechol (58)	124,1	123	→	95	-70	-20	-7
		123	→	108	-70	-28	-5
3-Methylcatechol (59)	124,1	123	→	108	-75	-28	-5
		123	→	95	-75	-22	-5

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4** und **9**, ^b Molekulargewicht, ^c Declustering Potential, ^d Collision Energy, ^e Cell Exit Potential.

<u>Standards:</u> Für die zu quantifizierenden Analyten wird jeweils eine Stammlösung hergestellt (ca. 10 mg/10 mL in Methanol). Diese wird in einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungsschritten von 1:3 verdünnt.

<u>Kalibration</u>: Die Kaffeeproben werden mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Auswertung der Proben erfolgt über externe Kalibration. Die Kalibriergerade wird durch Auftragen der Peakflächen der Kalibrierlösungen gegen die Konzentration erhalten (**Tabelle 19**).

Substanz (Nr.) ^a	Geradengleichung ^b	R ²
Kaffeesäure (1)	y = 2E+08x + 6103,2	0,9989
Catechol (56)	y = 1E+08x + 61016,0	0,9979
Pyrogallol (54)	y = 1E + 08x - 26444,0	0,9969
4-Methylcatechol (58)	y = 7E+08x - 1708,7	0,9963
3-Methylcatechol (59)	y = 2E+08x - 8144,9	0,9999

Tabelle 19: Zur Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS eingesetzte Kalibrierfunktionen für (1, 54, 56, 58 und 59).

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4** und **9**, ^b y = Fläche (Analyt), x = Konzentration (Analyt).

3.5.3 Quantifizierung der Furanderivate in Kaffee

Zur Quantifizierung der Furanderivate Furfurylalkohol (**32**) und 5-Hydroxymethylfurfural (**34**) werden die gleichen Kaffeegetränke, wie unter Kapitel 3.2 beschrieben, aufgebrüht und nach Membranfiltration direkt mittels HPLC-MS/MS analysiert.

Spektrometer:	4000 QTrap (AB SCIEX Instruments, Darmstadt, Deutschland)
Ionisierung:	Atmospheric Pressure Ionsiation (APCI)
Scantyp:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Polarität:	Positiv
Nebuliser Current:	5 μΑ
Stationäre Phase:	Luna PFP, 150 x 2,1 mm i.d., 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg,
	Deutschland)
Fluss:	250 µL/min
Injektionsvolumen:	5 μL
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Methanol
	B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser
Gradient:	A/B (0/100; v/v) für 5 min halten, in 15 min auf (100/0; v/v), 3 min
	halten

<u>Tuning</u>: Für die Analyten werden die Ionisierungsparameter unter Nutzung des Tools "*Quantitative Optimization*" (Analyst 1.5) optimiert. Die Probelösung wird über die Spritzenpumpe (10 μ L/min) gefördert. Die optimierten Parameter sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.

	ММ _р	Masse	enübe	rgang			
Substanz (Nr.) ^a	[Da]		[<i>m/z</i>]		DP℃	CEd	CXP ^e
Furfurylalkohol (32)	98,1	99	→	58	26	17	8
		99	→	72	26	11	6
5-Hydroxymethylfurfural (34)	126,1	127	→	109	26	17	8
		127	→	81	26	23	6

Tabelle 20: Ausgewählte Massenübergänge und die optimierten Bedingungen für die quantitative Bestimmung der Furanderivate 32 und 34 in Kaffee.

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 6**, ^b Molekulargewicht, ^c Declustering Potential, ^d Collision Energy, ^e Cell Exit Potential.

<u>Standards:</u> Für die zu quantifizierenden Analyten wird jeweils eine Stammlösung hergestellt (ca. 100 mg/100 mL in Methanol). Diese wird in einer Verdünnungsreihe von 1:50 bis 1:50000 verdünnt.

<u>Kalibration</u>: Die Kaffeeproben werden mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Auswertung der Proben erfolgt über externe Kalibration. Die Kalibriergerade wird durch Auftragen der Peakflächen der Kalibrierlösungen gegen die Konzentration erhalten, diese sind in **Tabelle 21** aufgeführt.

Substanz (Nr.) ^a	Geradengleichung ^b	R ²
Furfurylalkohol (32)	y = 6E + 07x - 20417	0,9970
5-Hydroxymethylfurfural (34)	y = 4E+09x + 393176	0,9976

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 6**, ^b y = Fläche (Analyt), x = Konzentration (Analyt).

3.5.4 Quantifizierung der Hydroxyzimtsäure-*Maillard*-Reaktionsprodukte in Modellansätzen

Nach Erhitzung der Modellansätze unter Röstbedingungen, werden diese mit Methanol und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels werden die Proben in 4 mL Wasser/Methanol (7/3; v/v) gelöst und 1:100 mit Wasser verdünnt. Die entstandene Suspension wird membranfiltriert (0,45 µm) und per HPLC-MS/MS analysiert.

Spektrometer:	API 3200 (AB SCIEX Instruments, Darmstadt, Deutschland)		
lonisierung:	Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI)		
Scantyp:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)		
Polarität:	Negativ		
Ion Spray Voltage:	-4500 V		
Stationäre Phase:	Luna Phenyl Hexyl, 150 x 2,1 mm i.d., 5 $\mu m,$ (Phenomenex,		
	Aschaffenburg, Deutschland)		
Fluss:	250 μL/min		
Injektionsvolumen:	5 µL		
Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Methanol		
	B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Gradient:	A/B (30/70; v/v) für 2 min halten, in 10 min auf (50/50; v/v); in		
	3 min auf (100/0; v/v), 3 min halten		

<u>Tuning:</u> Für die Produkte werden die Ionisierungsparameter unter Nutzung des Tools "*Quantitative Optimization*" (Analyst 1.5) optimiert. Die Probelösung wird über die Spritzenpumpe (10 µL/min) gefördert. Die Optimierten Parameter sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tabelle 22: Ausgewählte Massenübergänge und die optimierten Bedingungen für die quantitative Bestimmung der geschmacksaktiven Verbindungen 74-75 in Kaffee.

	ММ _Р	Mass	enüber	rgang			
Substanz (Nr.) ^a	[Da]		[<i>m/z</i>]		DP°	\mathbf{CE}^{d}	CXP ^e
6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-	262,32	261	→	189	-60	-26	-4
oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74,75)		261	\rightarrow	203	-60	-26	-4

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36**, ^b Molekulargewicht, ^c Declustering Potential, ^d Collision Energy, ^e Cell Exit Potential.

<u>Standards:</u> Für die zu quantifizierenden Analyten (**74**, **75**) wird jeweils eine Stammlösung hergestellt (ca. 10 mg/10 mL Methanol). Diese wird in einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungsschritten von 1:3 (v/v) verdünnt.

<u>Kalibration:</u> Die Modellansätze werden mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Auswertung der Modellansätze erfolgt über externe Kalibration. Die jeweilige Kalibriergerade wird durch Auftragen der Peakflächen der Kalibrierlösungen gegen die Konzentration erhalten (**Tabelle 23**).

Substanz (Nr.) ^a	Geradengleichung ^b	R ²
<i>endo-</i> 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)- 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74)	y = 8E+07x + 209,67	0,9993
exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxy-methyl)- 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75)	y = 6E+07x - 315	0,9973

 Tabelle
 23:
 Zur
 Quantifizierung
 von
 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8

 oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74, 75) mittels
 HPLC-MS/MS eingesetzte Kalibrierfunktionen.

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36**, ^b y = Fläche (Analyt), x = Konzentration (Analyt)

3.5.5 Quantifizierung der Hydroxyzimtsäure-*Maillard*-Reaktionsprodukte in Kaffee

Zur Quantifizierung der Hydroxyzimtsäure-*Maillard*-Reaktionsprodukte **74-78** in den speziell gerösteten Arabica- und Robusta-Kaffeeproben werden von den Standardkaffeegetränken 30 mL Kaffeegetränk mit 1 mL internen Standard ($[^{13}C_6]$ -74) (c = 0,006 mg/mL) versetzt und unter Schütteln für 30 min inkubiert. Das gesamte Probenvolumen wird auf eine mit Wasser konditionierte C18-E Kartusche (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgegeben. Nach dem Spülen mit zwei Säulenvolumen Wasser wird mit 60 mL Wasser/Methanol (7/3; v/v) eluiert. Das Eluat wird im Vakuum bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 2 mL Wasser/Methanol (7/3; v/v) gelöst. Nach dem Membranfiltrieren wird ein Aliquot zur HPLC-MS/MS Messung eingesetzt.

Zur Analyse der Espresso-Getränke werden 5 mL Kaffee mit 1 mL des internen Standards ([¹³C₆]-74) versetzt. Diese werden analog zu den Standardkaffeegetränken aufgearbeitet. Nach Lösen in 2 mL Wasser/Methanol (7/3; v/v) und Membranfiltration erfolgt die Analyse mittels LC-MS/MS.

Spektrometer:	4000 QTrap (AB SCIEX Instruments, Darmstadt, Deutschland)		
lonisierung:	Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI)		
Scantyp:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)		
Polarität:	Negativ		
Ion Spray Voltage:	-4500 V		
Stationäre Phase:	Luna Phenyl Hexyl, 150 x 2,1 mm i.d., 5 µm, (Phenomenex,		
	Aschaffenburg, Deutschland)		
Fluss:	250 μL/min		
Injektionsvolumen:	5 µL		

Fließmittel:	A: 0,1 % Ameisensäure in Methanol		
	B: 0,1 % Ameisensäure in Wasser		
Gradient:	A/B (0/100; v/v) für 3 min halten, in 12 min auf (60/40; v/v), in		
	12 min auf (70/30; v/v), in 2 min auf (100/0; v/v), 2 min halten		

<u>Tuning:</u> Für die Analyten und die internen Standards werden die Ionisierungsparameter unter Nutzung des Tools "*Quantitative Optimization*" (Analyst 1.5) optimiert. Die Probelösung wird über die Spritzenpumpe (10 µL/min) gefördert. Die optimierten Parameter sind in **Tabelle 24** zusammengefasst.

Tabelle 24: Ausgewählte Massenübergänge und die optimierten Bedingungen für die quantitative Bestimmung der geschmacksaktiven Verbindungen 74-78 in Kaffee.

	MM _p	Mass	enüber	gang			
Substanz (Nr.) ^a	[Da]		[<i>m/z</i>]		DP	CEd	CXP ^e
6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-	262,32	261	→	189	-70	-24	-3
oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74,75)		261	→	203	-70	-28	-1
6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-	268,3	267	\rightarrow	207	-70	-28	-1
oxabicyclo[3.2.1][¹³ C ₆]oct-3-en-2-on ([¹³ C ₆]-74)		267	→	192	-70	-26	-11
endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-	232,3	231	→	187	-70	-28	-11
3-en-2-on (76)		231	→	202	-70	-26	-1
6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-	276,28	275	\rightarrow	203	-70	-16	-1
oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (77, 78)		275	→	188	-70	-28	-3

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36** und **43**, ^b Molekulargewicht, ^c Declustering Potential, ^d Collision Energy, ^e Cell Exit Potential.

<u>Standards:</u> Für den ¹³C- markierten internen Standard 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1][¹³C₆]oct-3-en-2-on ([¹³C₆]-74) wird eine Stammlösung mit c = 0,626 mg/mL hergestellt. Diese wird in 1:10 Verdünnungsschritten bis zu einer Endkonzentration von 0,000626 mg/mL verdünnt. Für die zu quantifizierenden Analyten wird jeweils eine Stammlösung hergestellt (ca. 10 mg/10 mL Methanol). Diese wird in einer Verdünnungsreihe mit Verdünnungsschritten von 1:3 verdünnt.

<u>Kalibration:</u> Der isotopenmarkierte interne Standard wird mit den unmarkierten Derivaten in Konzentrationsverhältnissen von 0,2 bis 5 gemischt und per HPLC-MS/MS analysiert. Die Kalibrationsgeraden werden durch Auftragen der Flächenverhältnisse (Fläche Analyt / Fläche IS) gegen die Konzentrationsverhältnisse (c Analyt / c IS) erhalten (5 Messpunkte) und sind in **Tabelle 25** gezeigt.

Substanz (Nr.) ^a	Geradengleichung ^b	R ²
<i>endo-</i> 6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8- oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74)	y = 2703x + 0,099	0,990
exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8- oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (75)	y = 2041x - 0,145	0,991

Tabelle25:ZurQuantifizierungvon6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74, 75) mittelsHPLC-MS/MS eingesetzte Kalibrierfunktionen.

^a Die Bezifferung der Substanzen bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36**, ^b y = Fläche (Analyt / interner Standard), x = Konzentration (Analyt / interner Standard).

3.6 Sensorische Analyse

Für die humansensorischen Experimente wird kommerziell erhältliches Mineralwasser (Evian[®]) verwendet, welches in der sensorischen Untersuchung nur eine geringe Eigenadstringenz aufweist. Das Wasser wird mit 0,1 M Ameisensäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Um eine retronasale Wahrnehmung von flüchtigen Verbindungen zu verhindern, wird eine Nasenklammer getragen. Bei Farbigkeit der Probenlösungen werden die Probengläschen in Alufolie verpackt. Die sensorischen Analysen werden in einem Sensorikraum bei 18 - 22 °C in drei verschiedenen Durchgängen durchgeführt.

Isolierte Reinsubstanzen werden vor der Sensorik mehrfach gefriergetrocknet und es wird anschließend mittels LC-MS/MS- und ¹H-NMR-Analysen überprüft, ob die Proben frei von Lösungsmittel und Puffer sind.

3.6.1 Schulung des Sensorikpanels

In Abhängigkeit von der Methode werden zur Durchführung der sensorischen Analysen acht bis zwölf geschulte Mitarbeiter des Arbeitskreises Hofmann, vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Freising hinzugezogen. Die Prüfer werden regelmäßig geschult, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Den Prüfern werden die in **Tabelle 26** aufgeführten Referenzen zur Schulung gereicht, die mittels Triangeltests vekostet werden (jeweils 5 mL). Die adstringierenden Verbindungen werden im Half-Mouth Test evaluiert (jeweils 1 mL).

Geschmacksqualität	Substanz	Konzentration
süß	Saccharose	50 mmol/L
sauer	Milchsäure	20 mmol/L
salzig	Natriumchlorid	12 mmol/L
bitter	Koffein	1 mmol/L
umami	Natriumglutamat	3 mmol/L
adstringierend, rau	Tannin	0,05 %
adstringierend, samtig	Quercetin-3-O-β-D-galactopyranosid	0,01 mmol/L

Tabelle	26:	Substanzen	und	eingesetzte	Konzentrationen	zur	Schulung	unterschiedlicher
Geschm	nacks	squalitäten.						

3.6.2 Schwellenwertbestimmung

Zur Bestimmung der Geschmacksschwellen wird, in Abhängigkeit von der Geschmacksqualität der Probe, meist ein Triangeltest durchgeführt (*Wieser, 1975a,b und 1976, DIN 10961 Teil 2 und 10959, Schlichterle-Cerny und Grosch, 1998).* Da Mundgefühle wie die Adstringenz eine länger anhaltende Wirkung besitzen oder durch Nachspülen mit Wasser verstärkt werden können, ist der Triangeltest für diese Substanzen ungeeignet. Da alle sensorisch untersuchten Proben einen adstringierenden Geschmack aufweisen, wird daher für alle Proben der sogenannte Half-Mouth Test (Scharbert und Hofmann, 2005, Stark et al., 2005a, Brock und Hofmann, 2008, Frank et al., 2007 und 2008) durchgeführt.

3.6.3 Half-Mouth Test

Für die Sensoriken wird die zu untersuchende Substanz in 10 mL 0,5 % ethanolischer Lösung aufgenommen und dann schrittweise mit Wasser (1/1; v/v) (pH = 6) verdünnt. Die Verdünnungsreihe wird in aufsteigender Konzentration mit jeweils einem Blindwert dem trainierten Panel in drei Sitzungen zur Beurteilung gereicht. Vor jedem Probenpaar spülen die Probanden den Mund mit Referenzwasser. Die Lösungen werden je auf die linke und rechte Zungenhälfte pipettiert, ohne sie zu vermischen. Durch Vergleich des adstringierenden Geschmackseindrucks beider Zungenhälften und durch Reiben der Zunge gegen den Gaumen nach 10 - 30 Sekunden, wird die Konzentration bestimmt, bei der das Sensorikpanel gerade noch die Probe von der Blindprobe (Wasser, pH 6,0) unterscheiden kann. Nach sorgfältigem Spülen des Mundraumes wird eine Pause von ca. 10 - 30 Minuten bis zum Abklingen des Reizes eingehalten, bis die nächste Probe verkostet wird. Von den individuellen Schwellenwerten aus drei Sitzungen wird das arithmetische Mittel gebildet und die Schwellenwerte, wie in der Literatur (*DIN 10961 Teil 2 und 10959*) beschrieben, über die Bildung des geometrischen Mittels berechnet.

$$E = \sqrt{c_e \cdot c_{e-1}}$$

Formel 1: Geradengleichung zur Berechnung des arithmetischen Mittels mit c_e = Massenkonzentration in g/L bei erstmaliger Erkennung und c_{e-1} = Massenkonzentration in g/L der vorangegangenen Probe.

$$\overline{E} = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^{n} E_i}$$

Formel 2: Geradengleichung zur Berechnung des geometrischen Mittels mit n = Anzahl derPrüfpersonen und $E_i = Erkennungsschwelle der einzelnen Prüfpersonen.$

3.7 Chromatographische Methoden

3.7.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.7.1.1 Analytische HPLC – UV/Vis-Detektion

HPLC System 1

Niederdruckpumpe:	525 Pumpe (Kontron Instruments, Eching, Deutschland)
Autosampler:	560 Autosampler (Kontron Instruments, Eching, Deutschland)
Detektor:	540+ Diodenarraydetektor (Kontron Instruments, Eching, Deutsch-
	land)
Injektionsvolumen:	30 µL

HPLC System 2

Hochdruckpumpe:	PU-2087 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)					
Autosampler:	AS-2055 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)					
Detektor:	MD 2010	Plus	Diodenarraydetektor	(Jasco,	Groß-Umstadt,	
	Deutschla	nd)				
Injektionsvolumen:	30 µL					

3.7.1.2 Preparative HPLC – UV/Vis-Detektion

HLPC System 3

Hochdruckpumpe:	S1122 Hochdruckpumpe (Syskam, Eresing, Deutschland)
Injektionsventil:	Rheodyne-Ventil mit Probenschleife (2mL) (Rheodyne, Alsbach
	a.d. Bergstraße, Deutschland)
Detektor:	Spectraflow 600 DAD (Sunchrom, Friedrichsdorf, Deutschland)
Injektionsvolumen:	100 μL – 2 mL

3.7.1.3 HPLC – Tandem Massenspektrometer (HPLC-MS)

Hochdruckpumpe:	HPLC	Agilent	1200	Serie	(Agilent	Technologies,	Waldbronn,
	Deutsc	hland)					
Autosampler:	HPLC	Agilent	1200	Serie	(Agilent	Technologies,	Waldbronn,
	Deutsc	hland)					
Massenspektrometer:	4000 0	QTrap oc	ler AP	I 3200	(AB SCI	EX Instruments,	Darmstadt,
	Deutsc	hland)					

3.7.1.4 HPLC Säulen

Analytisch:	Luna Phenyl Hexyl, 150 x 2,1 mm i.d., 5 µm (Phenomenex,
	Aschaffenburg, Deutschland)
	Luna Phenyl Hexyl, 250 x 4,6 mm i.d., 5 µm (Phenomenex,
	Aschaffenburg, Deutschland)
	Luna PFP, 150 x 2,1 mm i.d., 5 µm (Phenomenex, Aschaffenburg,
	Deutschland)
	Microsorb 100-5 C18, 250 x 4,6 mm i.d., 5 µm (Varian, Darmstadt,
	Deutschland)
Präparativ:	Microsorb 100-5 C18, 250 x 21,2 mm i.d., 5 μm (Varian,
	Darmstadt, Deutschland)

3.7.2 Middle Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

Pumpe:	C-605 Pumpen mit einem C-615 Pumpenmanager (Büchi, Flawil,
	Schweiz)
Injektionsventil:	Manuelle Rheodyne Injektion (20 mL Loop) (Büchi, Flawil,
	Schweiz)
Detektor:	UV Photometer C-635 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Fraktionssammler:	C-660 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Kartusche:	C-670 150 x 40 mm i.d. (Büchi, Flawil, Schweiz)
Stationäre Phase:	selbst gepackte PP Kartuschen (150 x 40 mm i.d.) gefüllt mit
	LiChroprep® RP-18 Material (Merck KGaA, Darmstadt,
	Deutschland)

3.8 Spektroskopische Methoden

3.8.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgt während der Reversed-Phase-Chromatographie mit einem MD 2010 Plus Diodenarraydetektor (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) bzw. mit dem 540+ Diodenarraydetektor (Kontron Instruments, Eching, Deutschland).

3.8.2 HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

ESI Negativ Modus:

Spektrometer:	4000 Q TRAP oder API 3200 (AB SCIEX Instruments, Darmstadt,
	Deutschland)
Scan Typ:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Curtain Gas:	20 psi
Ion spray Voltage:	-4500 V
Heater Gas Temp:	350 °C
Nebulicer Gas:	50 psi
Heater Gas:	60 psi
Collision Gas :	Stickstoff

APCI Positiv Modus:

Spektrometer:	4000 Q TRAP (AB SCIEX Instruments, Darmstadt, Deutschland)
Scan Typ:	MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Curtain Gas:	20 psi
Nebulicer Current:	5 μΑ
Heater Gas Temp:	350 °C
Nebulicer Gas:	50 psi
Collision Gas :	Stickstoff

3.8.3 Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Die exakten Massen von isolierten Reinsubstanzen werden mit einem Flugzeit-Massenspektrometer, MicroToF (Bruker Daltronics, Bremen, Deutschland) aufgenommen und auf Natriumformiat referenziert. Die Proben werden hierzu in Methanol gelöst und mittels negativer Elektrospray Ionisation ionisiert. Die Abweichung der gemessenen von der berechneten Masse beträgt weniger als 5 *m*amu.

3.8.4 Kernresonanzspektroskopie

Die Daten werden an einem 400 MHz Gerät (DRX 400, Bruker, Rheinstetten, Deutschland) oder an einem 500 MHz Gerät (Avance III, Bruker, Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Die Proben werden in *d*₄-Methanol (0.03 % TMS) (Euriso Top, Gif sur Yvette, Frankreich) gelöst, in ein NMR-Röhrchen (Norell, Sp5000 Landisville, United States) gefüllt und bei 298 K vermessen. Alle Signale werden auf Tetramethylsilan (TMS) bzw. auf das Signal des Lösungsmittels referenziert. Zur Datenprozessierung wird die Top Spin Software (Version 1.3 bzw. 2.1, Bruker, Rheinstetten, Deutschland) verwendet. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Programm MestReNova V. 5.1.0-2940 (Mestrelab Research, La Coruña, Spanien).

3.8.4.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Messungen werden an einem 400 oder 500 MHz Gerät durchgeführt. Aus dem ¹H-Spektrum werden die chemischen Verschiebungen (δ , in ppm), sowie die Kopplungskonstanten (J, in Hz) benachbarter Protonen ermittelt. Die chemischen Verschiebungen sind auf TMS bezogen. Auf Grund des protischen Lösungsmittels werden lediglich kohlenstoffgebundene Protonen erfasst.

3.8.4.2 ¹³C-NMR-Spektroskopie

Die ¹³C-NMR-Messungen werden bei Frequenzen von 100 bzw. 125 MHz durchgeführt. Zur Unterdrückung der heteronuklearen *J*-Kopplungen bzw. zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, erfolgt die Aufnahme unter ¹H-Breitbandentkopplung mittels CPD (*Composite Pulse Decoupling*).

3.8.4.3 *gradient selected* ¹H-¹H-Verschiebungskorrelation (*gs*-COSY)

Die Messungen werden am 400 oder 500 MHz Gerät durchgeführt. Durch die Pulsfolge, zwei 90° Pulse, die durch jeweils inkrementell veränderte Wartezeiten getrennt sind, erhält man ¹H,¹H-korrelierte 2D-Spektren. Die Signale auf der Diagonalen im 2D-Konturdiagramm entsprechen dabei dem ¹H-Spektrum, während symmetrisch angeordnete Korrelationssignale im 2D-Plot die skalare Kopplung zwischen geminal und vicinal benachbarten Protonen anzeigen. Im Vergleich zu normalen COSY-Experimenten ist das *gradient-selected* COSY (*Hurd, 1990*) wesentlich schneller. Da die unerwünschte z-Magnetisierung durch gepulste Feldgradienten zerstört wird, entfallen die Wartezeiten zwischen den Pulsfolgen.

3.8.4.4 *gradient selected* heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (*gs*-HMQC)

Die Messungen für das HMQC-Experiment (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) werden am 400 oder 500 MHz Gerät durchgeführt. Es wird ein ¹H, ¹³C-korreliertes 2D-Spektrum erzeugt. Dabei wird auf der F2-Achse das entsprechende ¹H-Experiment, einschließlich aller chemischen Verschiebungen und *J*_{H,H}-Kopplungen projiziert. Auf der F1-Achse ist das korrespondierende ¹³C-Spektrum sichtbar. Im HMQC-Konturdiagramm werden nur Signale von Methin-, Methylen- und Methylgruppen detektiert, während quartäre Kohlenstoffatome nicht detektiert werden. Bei dem *gradient selected* HMQC-Experiment (*Hurd und Boban, 1991*) werden Feldgradienten dazu verwendet, die richtigen Kohärenzwege auszunutzen, wodurch ¹²C gebundene Protonen keine Signale erzeugen. Gegenüber einem HMQC ohne gepulste Feldgradienten entfallen die benötigten Phasenzyklen zur Unterdrückung der Hauptsignale und somit wird eine Verringerung der Messzeit erreicht.

3.8.4.5 *gradient selected* heteronukleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (*gs*-HMBC)

Die Messungen für das HMBC-Experiment (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) werden am 400 oder 500 MHz Gerät durchgeführt. Es ist eine modifizierte Version des HMQC-Experimentes und ist zur Bestimmung von Kopplungen über mehrere Bindungen (v.a. ²*J*-C,H, ³*J*-C,H, ⁴*J*-C,H) geeignet, die durch unterschiedliche Evolutionszeiten verschieden entwickelt werden können. 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. Bei dem *gradient selected* Verfahren (*Bax und Summers, 1986*) wird während der Datenaufnahme keine ¹³C-Breitbandkopplung vorgenommen, so dass insgesamt das *gs*-HMBC-Experiment kürzere Messzeiten erfordert und eine bessere Auflösung als ein HMBC ohne gepulste Feldgradienten liefert.

3.8.4.6 ¹³C, ¹³C-INADEQUATE-NMR

Die Messungen werden an dem 500 MHz Gerät durchgeführt. Das INADEQUATE-Experiment wird unter Verwendung des Basis Phasen Zyklus gemessen, welcher schon früher in der Literatur von *Bourdonneau et al. 1998* beschrieben wurde. Um Magnetisierungsverluste durch offset Effekte und B1-Feld Inhomogenitäten zu minimieren, wurden Kohlenstoff 90° und 180° Pulse durch BEBOPT (*Luy et al., 2003; Skinner et al., 2004 und 2006*) und BIBOP (*Kobzar et al., 2004 und 2008*) Pulse und durch universelle Rotationspulse, welche auf der Basis von symmetrisch basierten Konstruktionsmodellen (*Luy et al., 2005*) erstellt werden, ersetzt.

4 Zusammenfassung

Neben der stimulierenden Wirkung bestimmt überwiegend das attraktive Aromaprofil sowie der typische Bittergeschmack die Akzeptanz von Kaffeegetränken. Während die Methoden der modernen Geruchsstoffforschung in den letzten 20 Jahren die weitgehende Entschlüsselung des molekularen Codes der den Geruch frisch gebrühten Kaffees bestimmenden Verbindungen ermöglichten, herrschen bezüglich der den Geschmack ursächlich prägenden Bitterstoffe von Kaffeegetränken massive Kenntnislücken. Obwohl in den letzten Jahren einige Schlüsselbitterstoffe von Kaffee als Polyphenol-Thermolyseprodukte identifiziert werden konnten, scheiterten weitere Versuche, die Bitterstoffe aufgrund der Instabilität dieser Verbindungen aus Röstkaffee zu isolieren.

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch geeignete Modellexperimente weitere Einblicke in die Bildung und in die Strukturchemie potentieller Bitterstoffe zu erhalten und deren Vorkommen in Röstkaffee anschließend massenspektrometrisch zu validieren. Hierfür wurden zunächst adäquate Modellsysteme entwickelt und anschließend diverse Furanderivate wie z.B. Furfurylalkohol, Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural mit Chlorogensäureabbauprodukten wie z.B. Kaffeesäure, Pyrogallol, Catechol, Hydroxyhydrochinon, 4-Methylcatechol und 3-Methylcatechol, als reaktive und potentielle Bitterpräkursoren, zur Reaktion gebracht. Die gebildeten Transformationsprodukte wurden nach präparativer Isolierung in ihrer Struktur mittels HRMS- und 1D- und 2D-NMR-Experimenten aufgeklärt. Insgesamt konnten so sechs bislang unbekannte bittere Furfurylalkohol-Transformationsprodukte generiert und strukturell charakterisiert werden: 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol, 1,3-Dihydroxy-4-(furan-2ylmethyl)-benzol, 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol, 1,2,4-Trihydroxy-5-(furan-2ylmethyl)-benzol, 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-5-methylbenzol und 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol. Modellröstungen von Furfural bzw. 5-Hydroxymethylfurfural in Gegenwart verschiedener Di- und Trihydroxybenzole ermöglichten die Identifizierung von Reaktionsprodukten mit Resorcin und Pyrogallol. Während der Erhitzung die disubstituierten Transformationsprodukte von Furfural wurden 4.4'-(Furan-2ylmethandiyl)bis-1,3-dihydroxybenzol und 4,4'-(Furan-2-ylmethandiyl)bis-1,2,3-trihydroxybenzol generiert, welche strukturell erstmals vollständig mittels HRMS- und 1D- und 2D-NMR-Experimenten aufgeklärt wurden. Daneben wurden bei der Modellröstung von 5-Hydroxymethylfurfural mit Resorcin und Pyrogallol die trisubstituierten Reaktionsprodukte 4,4'-[[5-[(2,4-Dihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]-bis-1,3-dihydroxybenzol und 4,4'-[[5-[(2,3,4-Trihydroxyphenyl)methyl]-2-furanyl]methylen]-bis-1,2,3-trihydroxybenzol generiert und in ihrer Struktur abgesichert. Die Reaktion anderer Di- und Trihydroxybenzole führte nicht zur Produktbildung.

Mit dem Ziel die sensorische Relevanz der untersuchten Röstprodukte zu studieren, wurde deren intrinsische Geschmacksqualität sowie der jeweilige Erkennungsschwellenwert ermittelt. Dabei wurden sowohl für die eingesetzten nativen Di- und Trihydroxybenzole, als auch für die generierten Reaktionsprodukte ein adstringierendes Mundgefühl sowie ein eindeutiger Bittergeschmack beschrieben. Durch die Reaktion der Di- und Trihydroxybenzole mit den Furanderivaten verringerten sich die Geschmacksschwellenwerte für die Adstringenz signifikant. Bei der Bitterkeit konnte ebenfalls eine Reduktion der Geschmacksschwellenwerte für alle Kaffeeerhitzungsprodukte mit Ausnahme der Pyrogallolprodukte beobachtet werden.

Quantitative Untersuchungen mittels HPLC-MS/MS aller identifizierten Kaffeebitterstoffe in einem frisch aufgebrühten Kaffeegetränk ergaben, nachweisbare Gehalte der Furfurylalkoholprodukte. Dahingegen konnten die Transformationsprodukte von Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse (SIVA) wurde anschließend die Bildung der Furan-2ylmethylhydroxybenzol-Derivate in Kaffeegetränken aus unterschiedlich stark gerösteten Kaffeeproben untersucht. Darüber hinaus wurden auch die jeweiligen Edukte die Di- und Trihydroxybenzole sowie Furfurylalkohol und 5-Hydroxymethylfurfural in den Kaffeeproben quantifiziert. Dabei zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit der Gehalte der Furan-2ylmethylhydroxybenzol-Derivate vom Röstgrad.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Maillard-Reaktionssysteme von Kohlenhydraten und Aminosäuren in Gegenwart von Hydroxyzimtsäuren zur Reaktion gebracht. In einem ternären Reaktionsansatz aus Kaffeesäure, Saccharose und L-Asparagin wurde nach präparativer Aufreinigung und anschließenden strukturanalytischen Untersuchungen mittels HRMS- und 1D- und 2D-NMR-Experimenten das endo- und exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on identifiziert. Zur Optimierung des entwickelten Maillard-Modellsystems wurden der Einfluss des eingesetzten Kohlenhydrates, der Aminosäure und der Erhitzungstemperatur ermittelt. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Produktgenerierung aus Phenolvorläufern (Chlorogensäure) und Reaktionszwischenprodukten (4-Vinylcatechol) evaluiert. Als optimales Reaktionsverhältnis wurde schließlich der Einsatz eines C₆-Kohlenhydrates wie Glukose oder Fruktose, einer ungeladenen Aminosäure, einer Temperatur zwischen 180 und 220 °C, sowie die Verwendung der Hydroxyzimtsäure festgestellt. Nach Substitution der C₆-Kohlenhydratkomponente durch ein C₅erfolgreich endo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-Kohlenhydratgerüst konnte das oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on identifiziert werden. Neben diesem Kaffeesäureabkömmling gelang es in einem ferulasäurehaltigen System die analogen Reaktionsprodukte endo- und exo-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on strukturanalytisch aufzuklären.

Zusammenfassung

Um einen Einblick in die Geschmacksaktivität dieser neuartigen Kaffee-Maillard-Transformationsprodukte zu erhalten, wurden wiederum humansensorische Untersuchungen der isolierten Reinsubstanzen durchgeführt. Alle fünf Verbindungen, die unter den oben genannten Maillard-Erhitzungsbedingungen gebildet wurden, wiesen wiederum einen bitteren und adstringierenden intrinsischen Geschmack auf. Die generierten endo-Reaktionsprodukte zeigten dabei, unabhängig von der verwendeten Hydroxyzimtsäure, signifikant höhere Geschmacksschwellen als die korrespondierenden exo-Reaktionsprodukte. Das Vorhandensein dieser Maillard-Transformationsprodukte in einem Kaffeegetränk wurde mit Hilfe einer HPLC-MS/MS Methode überprüft. Nach einer Aufreinigung über RP-18-Kartuschen, wurden die Reaktionsprodukte endo- und exo-6-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo-[3.2.1]oct-3-en-2-on, welche einen Kaffeesäurerest als Hydroxyzimtsäureeinheit im Molekül beinhalteten, in einem frisch zubereiteten Kaffeegetränk nachgewiesen. Bei der anschließenden Quantifizierung mittels Stabil-Isotopen-Verdünnungs-Analyse (SIVA) unter ¹³C₆-markierte *endo*-6-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-Nutzuna von oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on als internen Standard konnte die Abhängigkeit der Bildung dieser Bitterstoffe vom Röstgrad des Kaffees aufgezeigt werden.

Insgesamt stellen die im Rahmen dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse über die Bildung von neuartigen bitteren Kaffeetransformationsprodukten im Röstprozess, sowie über deren sensorische Aktivität einen weiteren essentiellen Schritt dar, der in der Objektivierung des Kaffeegeschmacks und zur technologischen Optimierung der Kaffeeröstung, unter dem Aspekt der Bitterstoffbildung und der Ausbildung gewünschter Bitterkeitsprofile, genutzt werden kann.

5 Literaturverzeichnis

Alonso-Salces, R. M.; Serra, F.; Reniero, F.; Héberger, K. Botanical and geographical characterization of green coffee (*Coffea Arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric evaluation of phenolic and methylxanthine contents. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4224-4235.

Bacher, A.; Rieder, C.; Eichinger, D.; Arigoni, D.; Fuchs, G.; Eisenreich, W. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. *FEMS Microbiol. ReV.* **1999**, *22*, 567-598.

Bax, A.; Summers, M. F. Proton and carbon-13 assignments form sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.

Belitz, H. D. Geschmacksaktive Substanzen in Kaffee. 7. Intern. Wiss. Kolloquium über Kaffee, Hamburg 1975, *ASIC Bremen* **1976**, 243-252.

Belitz, H. D. Taste-active substances in coffee. In: *Proceedings* of the 7th Colloquium of the International Coffee Science Association, ASIC, Bremen, Hamburg, **1977**, 24, 3-252.

Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5 ed.; Springer Verlag: Berlin **2001**.

Bennat, C.; Engelhardt, U. H.; Kiehne, A.; Wirries, F.-M.; Maier, H. G. HPLC Analysis of chlorogenic acid lactones in roasted coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *199*, 17-21.

Blumberg, S.; Frank, O.; Hofmann, T. Quantitative studies on the influence of bean roasting parameters and hot water percolation on the concentrations of bitter compounds in coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3720-3728.

Bourdonneau, M.; Ancian, B. Rapid-pulsing artifact-free double-quantum-filtered homonuclear spectroscopy. The 2D-INADEQUATE experiment recisited. *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 316-327. Boyd, T. J. Identification and quantification of mono-, di- and trihydroxybenzenes (phenols) at trace concentrations in seawater by aqueous acetylation and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromat. A.* **1994**, *66*, *281-292*.

Brock, A.; Hofmann, T. Identification of the key astringent compounds in spinach (*Spinacia oleracea*) by means of the taste dilution analysis. *Chem. Percept.* **2008**, *4*, 268-281.

Chen, W. C. Untersuchungen über den Bittergeschmack von Röstkaffee. Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei einigen einfachen organischen Verbindungen. Doktorarbeit, Universität München, **1979**.

Clark, R. J. Green Coffee. In: Caballero F.; Trugo, L.C.; Finglas, P.M. editors. Encyclopedia in food sciences and nutrition. *London Academic Press*, **2003**, 1481-1487.

Clifford, M. N. Chlorogenic acids – their complex nature and routine determinations in coffee beans. *Food Chem.* **1979**, *4*, 63-71.

Clifford, M. N.; Kellard, B. Characterisation of caffeoylferuloylquinic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chem.* **1989**, *34*, 81-88.

Cohen, L. A. Study of pH dependence in the decarboxylation of *p*-hydroxycinnamic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *82*, 1907–1911.

Deutscher Kaffeeverband e. V. Deutsche tranken in 2009 über eine Milliarde mehr Tassen Kaffee, Pressemitteilung, http://www.kaffeeverband.de/presse/pressemitteilungen/161-pressemitteilungen-2010 (Abfragedatum: 07.08.2011).

Deutscher Kaffeeverband e. V. Ursprungsländer der Rohkaffee-Einfuhren, http://www.kaffeeverband.de/presse/zahlen-daten-fakten/259-import (Abfragedatum: 07.08.2011).

Farah, A.; De Paulis, T.; Trugo, L. C.; Martin, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1505-1513.

Flament, I. Coffee Flavor Chemistry. John Wiley & Sons Inc. New York **2002** ISBN: 0-471-72038-0.

Frank, O.; Hofmann, T. Reinvestigation of the chemical structure of bitter-tasting quinizolate and homoquinizolate and studies on their maillard-type formation pathways using suitable ¹³C-labeling experiments. *J.Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6027-6036.

Frank, O.; Zehntbauer, G.; Hofmann, T. Bioresponse-guided decomposition of roasted coffee beverage and identification of key bitter taste compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 492-508.

Frank, O.; Blumberg, S.; Kunert, C.; Zehntbauer, G.; Hofmann, T. Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1945-1954.

Frank, O.; Blumberg, S.; Krümpel, G.; Hofmann, T. Structure determination of 3-O-caffeoyl*epi* γ -quinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9581-9585.

Gerstenberg, B.; Speck, M. Determination of catechol in cigarette smoke condensate by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis with an automated precolumn sample preparation. *Beiträge zur Tabakforschung International*, **1986**, *13*, 239-242.

Ginz, M; Engelhardt, U. H. Identification of Proline-Based Diketopiperazines in Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3528-3532.

Ginz, M; Engelhardt, U. H. Identification of new diketopiperazines in roasted coffee. *Eur. Food Res. Technol.* **2001a**, *213*, 8-11

Ginz, M. Bittere Diketopiperazine und Chlorogensäurederivate in Röstkaffee. Doktorarbeit, Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, **2001b**

Haffenden, L. J. W.; Yaylayan, V. A. Mechanism of formation of redox-active hydroxylated benzenes and pyrazine in ¹³C-labeled glycin/D-glucose model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9742-9746.

Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chem.* **2009**, *116*, 71-81.

Heinrich, L.; Baltes, W. Über die Bestimmung von Phenolen im Kaffeegetränk. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 362-365.

Hofmann, T.; Czerny, M.; Calligaris, S.; Schieberle, P. Model studies on the influence of coffee melanoidins on flavour volatiles of coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2382-2486.

Högel, O. Über einige nichtflüchtige Extraktstoffe aus Kaffee. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, **1958**, *49*, 433-441.

Hurd, R. E. Gradient-enhanced spectroscopy. J. Magn. Reson. 1990, 81, 422-428.

Hurd, R. E.; Boban, J. K. Gradient-enhanced proton-detected heteronuclear multiplequantum coherence spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 648-653.

Intelmann, D.; Kummerloewe, G.; Haseleu, G.; Desmer, N.; Schulze, K.; Froehlich, R.; Frank, O.; Luy, B.; Hofmann, T. Structures of storage-induced transformation products of the beer's bitter principles, revealed by sophisticated NMR spectroscopic and LC-MS techniques. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 13047-13058.

Intelmann, D.; Hofmann, T. On the autoxidation of bitter-tasting iso-α-acids in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5059-5067.

Jiang, D.; Chiaro, C.; Maddali, P.; Prabhu, S.; Peterson, D. G. Identification of hydroxycinnamic acid-maillard reaction products in low-moisture baking model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9932-9943.

Kenzo, T. Condensation products of furfuryl alcohol. V. Condensation products of furfuryl alcohol with polyhydric phenols. *Nippon Kagaku Zasshi* **1960**, *81*, 336-337.

Kenzo, T. Condensation products of furfuryl alcohol. VII. Some characteristic infrared absorption bands of furan derivatives. *Nippon Kagaku Zasshi* **1961**, *82*, 373-376.

Kobzar, K.; Skinner, T. E.; Khaneja, N.; Glaser, S. J.; Luy, B. Exploring the limits of broadband excitation and inversion pulses. *J. Magn. Reson.* **2004**, *170*, 236-243. Kobzar, K.; Skinner, T. E.; Khaneja, N.; Glaser, S. J.; Luy, B. Exploring the limits of broadband excitation and inversion: II. Rf-power optimized pulses. *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 58– 66.

König, W. A.; Sturm, A. Gaschromatographie und Massenspektrometrie als Hilfsmittel zur Untersuchung hochsiedender Kaffeeinhaltsstoffe. *ASIC*, 10e Colloque, Salvador, **1982**.

Lang, R.; Müller, C.; Hofmann, T. Development of a stable isotope dilution analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection for the quantitative analysis of di- and trihydroxybenzenes in foods and model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5755-5762.

Liardon R.; Ott, U.; Daget, N. Analysis of Coffee Headspace Profiles by Multivariate Statistics. In *Analysis of Volatiles*; Schreier, P.; Walter de Gryter Berlin, **1984**, 447-459.

Luy, B.; Khaneja, N.; Glaser, S. J. Application of optimal control theory to the design of broadband excitation pulses for high-resolution NMR. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 8–15.

Luy, B.; Kobzar, K.; Skinner, T. E.; Khaneja, N.; Glaser, S. J. Construction of universal rotations from point-to-point transformations. *J. Magn. Reson.* **2005**, *176*, 179–186.

Maga J. A. Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. CRC *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **1978**, *10*, 323-372

Mayer, F.; Czerny, M.; Grosch, W. Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 272-276.

McCamey, D. A.; Thorpe, T. M.; McCarthy, J. P. Bitterness in Foods and Beverages. In *Developments in Food Science*; Rouseff, R. L., Ed.; Elsevir Science Publishers: Amsterdam, **1990**; 169-182.

Moon, J.-K.; Shibamoto, T. Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, *58*23-5831.

Müller C. Molecular studies on the storage-induced degradation of odor-active thiols in coffee beverages. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, **2006a**. Schüling-Verlag ISBN10: 3-86523-053-9.

Müller, C.; Hemmersbach, S.; Van't Slot, G.; Hofmann, T. Synthesis and structure determination of covalent conjugates formed from the sulfury-roasty smelling 2-furfurylthiol and di- or trihydroxybenzenes and their identification in coffee brew. *J. Agric. Food Chem.* **2006b** *54*, 10076-10085.

Müller, C.; Hofmann, T. Quantitative studies on the formation of phenol/2-furfurylthiol conjugates in coffee beverages toward the understanding of the molecular mechanisms of coffee aroma staling. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4095-4102.

Murkovic, M.; Derler, K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2006**, *69*, 25-32.

Noda, Y.; Peterson, D. G. Structure-reactivity relationships of flavan-3-ols on product generation in aqueous glucose/glycine model systems. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3686-3691.

Norm DIN 10959, Sensorische Prüfverfahren – Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit.

Norm DIN 10961, Schulung von Prüfpersonen für sensorische Prüfungen.

Ottinger, H.; Bareth, A.; Hofmann, T. Characterization of natural "cooling" compounds formed from glucose and L-proline in dark malt by application of taste dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1336-1344.

Ottinger, H.; Soldo, T.; Hofmann, T. Discovery and structure determination of a novel Maillard-derived sweetness enhancer by application of the comparative taste dilution analysis (cTDA). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1035-1041.

Osterveld, A.; Voragen, A. G. J.; Schols, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *54*, 183-192.

Reichstein, T.; Staudinger, H. A new or improved method of producing artificial coffee oil. Br. Patent 260960, **1926**. Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3498-3508.

Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5377-5388.

Schlichterle-Cerny, H.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1998**, *207*, 369-376.

Semmelroch, P.; Grosch, W. Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 310-313.

Semmelroch, P.; Grosch, W. Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 537-543.

Shibamoto, T.; Harada, K.; Mihara, J.; Nishimura, K.; Yamaguchi, A.; Aitoku, A.; Fukada, T. Application of HPLC for evaluation of coffee flavor quality. *The Quality of Foods and Beverages*; Charambous, G.; Inglett, G., Eds.; Academic Press: New York, **1981** *Vol.* 2, 311.

Skinner, T. E.; Reiss, T. O.; Luy, B.; Khaneja, N.; Glaser, S. J. Reducing the duration of broadband excitation pulses using optimal control with limited RF amplitude. *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 68–74.

Skinner, T. E.; Kobzar, K.; Luy, B.; Bendall, M. R.; Bermel, W.; Khaneja, N.; Glaser, S. J. Optimal control design of constant amplitude phase-modulated pulses: Application to calibration-free broadband excitation. *J. Magn. Reson.* **2006**, *179*, 241–249.

Snider, B. B. Synthesis of the 5-hydroxymethyl-6-aryl-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on in natural products descurainin and cartorimine. *Tetrahedron*, **2006**, *6*2, 5171-5177.

Sonntag, T.; Kunert, C.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Sensory-guided identification of *N*-(1-methyl-4-oxoimidazolidin-2-ylidene)-R-amino acids as contributors to the thick-sour and mouth-drying orosensation of stewed beef juice. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6341-6350.

Stadler, R. H.; Welti, H.-D.; Stämpfli, A.; Fay, L. Thermal decomposition of caffeic acid in model systems: Identification of novel tetraoxygenated phenylindan isomers and their stability in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 898-905.

Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste-active polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, 53, 5407-5418.

Stark, T. Charakterisierung der wertgebenden Geschmackstoffe von geröstetem Kakao (Theobroma cacao) mittels Dekompositions- und Rekonstruktions-Analyse, Disertation Technische Universität München, **2005b**. Verlag Dr. Hut ISBN10: 3-89963-136-6.

Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5530-5539.

Stennert, A.; Maier, H. G. Trigonelline in coffee. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1994, 199, 198-200.

Teixidó, E.; Moyano, E.; Santos, F. J.; Galceran, T. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 102-108.

Tressl, R.; Grünewald, K. G.; Köppler, H.; Silwar, R. Flüchtige Phenole in Röstkaffees verschiedener Sorten. *Lebensm. Unters. Forsch.* **1978a**, *167*, 108-110.

Tressl, R.; Bahri, D.; Koeppler, H.; Jensen, A. Diphenols and caramel compounds in roasted coffees of different varieties. II. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1978b**, *167*, 111-114.

Trugo, L.C.; Macrae, R. A Study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.* **1984**, *15*, 219-22.

Van der Stegen, G. H. D.; Van Duijn, J. Analysis of chlorogenic acids in coffee. *Colloque Scientifique International sur le Café*. **1980**, *9th*, 107-112.

Viani, R.; Horman, I. Thermal behavior of trigonelline. J. Food Sci. 1974, 39, 1216-1217.
Vitzthum, O. G.; in Eichler, O. Kaffee und Coffein, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 1976.

Wang, Y. Effects of naturally occurring phenolic compounds on the formation of Maillard Aroma. *Food Science Dep.*, vol. PH.D. Rutgers State University, **2000**.

Wieser, H.; Belitz, H.-D. Bittere Peptide aus dem Maisprotein Zein durch Hydrolyse mit Pepsin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1975a**, *159*, 329-336.

Wieser, H.; Belitz, H.-D. Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden I. Aminosäuren und verwandte Verbindungen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1975b**, *159*, 65-72.

Wieser, H.; Belitz, H.-D. Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden II. Peptide und Peptidderivate. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 383-392.

Zimmer, D. Introduction to quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Chromatographia*, **2003**, *57*, 325-332.

6 Anhang

Anhang 1: Gehalte [µg/L] der Furan-2-ylmethylhydroxybenzole 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2ylmethyl)-5-methylbenzol (68), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-3-methylbenzol (69), 1,2-Dihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (64), 1,2,3-Trihydroxy-4-(furan-2-ylmethyl)-benzol (66) in definiert gerösteten Robusta- und Arabica-Standardkaffeegetränken.

	Konzentration (μg/L) ^a			
	68 ^b	69 ^b	64 ^b	66 ^b
Robusta (Röstbedingungen)				
111 SKT (245 °C, 180 s)	58 ± 0,5	$39 \pm 0,9$	67 ± 0.4	n.d.
94 SKT (251 °C, 180 s)	60 ± 0.5	$39 \pm 0,9$	$205 \pm 42,8$	n.d.
78 SKT (257 °C, 180 s)	61 ± 0,4	$44 \pm 0,5$	$404 \pm 82,0$	n.d.
71 SKT (261 °C, 180 s)	62 ± 0.5	45 ± 2,5	$655 \pm 72,5$	n.d.
51 SKT (269 °C, 180 s)	69 ± 2,0	52 ± 2,4	1412 ± 117,8	n.d.
114 SKT (265 °C, 120 s)	57 ± 0,4	38 ± 1,0	88 ± 11,9	n.d.
92 SKT (265 °C, 135 s)	60 ± 1,0	43 ± 2,5	$236 \pm 63,4$	n.d.
81 SKT (265 °C, 145 s)	61 ± 1,5	43 ± 2,5	384 ± 104,0	n.d.
69 SKT (265 °C, 159 s)	64 ± 2,8	46 ± 3,5	610 ± 85,6	n.d.
60 SKT (265 °C, 177 s)	68 ± 1,3	50 ± 1,6	969 ± 105,4	n.d.
Arabica (Röstbedingungen)				
Rohkaffee	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
113 SKT (230 °C, 180 s)	57 ± 0,6	39 ± 0.8	110 ± 1,0	151 ± 12,5
76 SKT (243 °C, 180 s)	60 ± 1,5	$46 \pm 0,5$	$140 \pm 9,9$	$363 \pm 32,5$
67 SKT (248 °C, 180 s)	62 ± 0.8	51 ± 0,7	$238 \pm 24,8$	441 ± 55,0
50 SKT (256 °C, 180 s)	70 ± 1,7	63 ± 0,5	$668 \pm 61,7$	$784 \pm 40,6$
41 SKT (263 °C, 180 s)	78 ± 2,8	75 ± 4,1	1281 ± 151,5	645 ± 160,6
84 SKT (265 °C, 106 s)	60 ± 1,2	47 ± 2,3	109 ± 15,1	$362 \pm 40,0$
75 SKT (265 °C, 116 s)	$60 \pm 0,7$	48 ± 0.4	$140 \pm 9,6$	436 ± 26,3
68 SKT (265 °C, 123 s)	60 ± 0,2	48 ± 0.4	215 ± 28,1	468 ± 12,5
61 SKT (265 °C, 129 s)	64 ± 0,3	53 ± 0,9	341 ± 9,6	709 ± 19,4
45 SKT (265 °C, 153 s)	72 ± 0,6	67 ± 3,3	806 ± 47,0	468 ± 60,0

^a Mittelwert ± Standardabweichung (μ g/L) aus n = 3 (einzelne Getränke), ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 16**, n.d. nicht detektiert. Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

Anhang 2: Gehalte [µg/L] der Di- und Trihydroxybenzole Catechol (56), 4-Methylcatechol (58), 3-Methylcatechol (59), Pyrogallol (54) und Kaffeesäure (1) in definiert gerösteten Robusta- und Arabica-Standardkaffeegetränken.

	Konzentration (μg/L) ^a				
	56 ^b	58 ^b	59 ^b	54 ^b	1 ^b
Robusta (Röstbedingungen)					
111 SKT (245 °C, 180 s)	1163 ± 23,0	161 ± 1,8	66 ± 5,8	1032 ± 191,0	413 ± 56,0
94 SKT (251 °C, 180 s)	1663 ± 69,0	182 ± 0,1	60 ± 9,3	1424 ± 279,0	370 ± 71,0
78 SKT (257 °C, 180 s)	2713 ± 169,0	214 ± 1,5	91 ± 1,8	1608 ± 123,0	$283 \pm 24,0$
71 SKT (261 °C, 180 s)	3744 ± 125,0	233 ± 10,1	103 ± 8,6	1378 ± 301,0	237 ± 32,0
51 SKT (269 °C, 180 s)	5219 ± 75,0	252 ± 8,8	104 ± 3,1	938 ± 9,0	177 ± 66,0
114 SKT (265 °C, 120 s)	1438 ± 169,0	178 ± 6,6	115 ± 5,0	1267 ± 226,0	$377 \pm 24,0$
92 SKT (265 °C, 135 s)	2244 ± 25,0	200 ± 12,6	106 ± 0,8	1211 ± 278,0	$355 \pm 36,0$
81 SKT (265 °C, 145 s)	2669 ± 37,0	208 ± 14,3	92 ± 3,7	1572 ± 307,0	281 ± 20,0
69 SKT (265 °C, 159 s)	3657 ± 0.0	229 ± 9,1	101 ± 6,3	1217 ± 562,0	220 ± 31,0
60 SKT (265 °C, 177 s)	4513 ± 81,0	225 ± 10,9	102 ± 2,2	2686 ± 109,5	239 ± 70,0
Arabica (Röstbedingungen)					
Rohkaffee	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	817 ± 47,1
113 SKT (230 °C, 180 s)	742 ± 24,4	382 ± 9,0	116 ± 4,2	$2034 \pm 67,0$	$359 \pm 38,0$
76 SKT (243 °C, 180 s)	1594 ± 25,0	384 ± 8,8	119 ± 0,5	1834 ± 347,0	222 ± 13,0
67 SKT (248 °C, 180 s)	1938 ± 106,3	418 ± 23,8	114 ± 6,7	$2045 \pm 396,0$	$175 \pm 0,0$
50 SKT (256 °C, 180 s)	$3738 \pm 6,3$	422 ± 12,5	95 ± 23,0	1901 ± 200,0	147 ± 10,0
41 SKT (263 °C, 180 s)	5176 ± 56,3	397 ± 28,8	121 ± 0,8	2331 ± 230,0	146 ± 11,0
84 SKT (265 °C, 106 s)	1407 ± 12,5	402 ± 21,3	104 ± 4,6	1796 ± 255,0	308 ± 1,0
75 SKT (265 °C, 116 s)	1844 ± 25,0	$394 \pm 6,3$	118 ± 0,2	1910 ± 61,0	223 ± 6,0
68 SKT (265 °C, 123 s)	2132 ± 37,5	444 ± 3,7	115 ± 3,2	2227 ± 234,0	175 ± 2,0
61 SKT (265 °C, 129 s)	2819 ± 62,5	442 ± 18,8	112 ± 2,5	2191 ± 190,0	180 ± 21,0
45 SKT (265 °C, 153 s)	4238 ± 118,7	324 ± 23,8	126 ± 2,8	1466 ± 234,0	142 ± 27,0

^a Mittelwert ± Standardabweichung (μ g/L) aus n = 3 (einzelne Getränke), ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 4** und **9**, n.d. nicht detektiert. Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

	Konzentration (mg/L) ^a		
	32 ^b	34 ^b	
Robusta (Röstbedingungen)			
111 SKT (245 °C, 180 s)	$24 \pm 0,40$	$3,3 \pm 0,010$	
94 SKT (251 °C, 180 s)	27 ± 0,56	$1,9 \pm 0,001$	
78 SKT (257 °C, 180 s)	42 ± 0,15	$1,8 \pm 0,012$	
71 SKT (261 °C, 180 s)	48 ± 0,25	$1,2 \pm 0,009$	
51 SKT (269 °C, 180 s)	43 ± 0,31	$1,0 \pm 0,028$	
114 SKT (265 °C, 120 s)	27 ± 0.47	$3,7 \pm 0,013$	
92 SKT (265 °C, 135 s)	$40 \pm 0,19$	2,8 ± 0,015	
81 SKT (265 °C, 145 s)	$42 \pm 0,22$	2,1 ± 0,010	
69 SKT (265 °C, 159 s)	$49 \pm 0,19$	$2,3 \pm 0,054$	
60 SKT (265 °C, 177 s)	50 ± 0,18	0,8 ± 0,019	
Arabica (Röstbedingungen)			
Rohkaffee	n.d.	n.d.	
113 SKT (230 °C, 180 s)	26 ± 0.38	$11,8 \pm 0,190$	
76 SKT (243 °C, 180 s)	$34 \pm 0,61$	$5,4 \pm 0,305$	
67 SKT (248 °C, 180 s)	36 ± 0.89	$3,5 \pm 0,440$	
50 SKT (256 °C, 180 s)	$51 \pm 0,99$	1,8 ± 0,376	
41 SKT (263 °C, 180 s)	47 ± 0.54	$2,8 \pm 0,276$	
84 SKT (265 °C, 106 s)	36 ± 0.62	$9,3 \pm 0,314$	
75 SKT (265 °C, 116 s)	43 ± 0.45	6,4 ± 0,211	
68 SKT (265 °C, 123 s)	$42 \pm 0,65$	$5,0 \pm 0,319$	
61 SKT (265 °C, 129 s)	48 ± 0,81	4,1 ± 0,413	
45 SKT (265 °C, 153 s)	51 ± 0,93	1,5 ± 0,470	

Anhang 3: Gehalte [mg/L] der Furanmoleküle Furfurylalkohol (32) und 5-Hydroxymethylfurfural (34) in definiert gerösteten Robusta- und Arabica-Standardkaffeegetränken.

^a Mittelwert ± Standardabweichung (mg/L) aus n = 3 (einzelne Getränke). ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 6**, n.d. nicht detektiert. Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

	Konzentration (μg/L) ^a		
_	74 ^b	75 ^b	
Robusta (Röstbedingungen)			
111 SKT (245 °C, 180 s)	$20 \pm 3,4$	22 ± 0.8	
94 SKT (251 °C, 180 s)	25 ± 2,5	25 ± 0.8	
78 SKT (257 °C, 180 s)	25 ± 2,6	$30 \pm 2,4$	
71 SKT (261 °C, 180 s)	21 ± 2,4	41 ± 2,5	
51 SKT (269 °C, 180 s)	11 ± 0,6	73 ± 1,03	
114 SKT (265 °C, 120 s)	24 ± 1,4	21 ± 0,5	
92 SKT (265 °C, 135 s)	35 ± 1,6	24 ± 1,6	
81 SKT (265 °C, 145 s)	$34 \pm 0,5$	33 ± 1,1	
69 SKT (265 °C, 159 s)	$33 \pm 6,2$	36 ± 1,9	
60 SKT (265 °C, 177 s)	21 ±1 ,2	52 ± 3,7	
Arabica (Röstbedingungen)			
Rohkaffee	n.d.	n.d.	
113 SKT (230 °C, 180 s)	$35 \pm 0,6$	43 ± 8,6	
76 SKT (243 °C, 180 s)	51 ± 0,6	36 ± 8,7	
67 SKT (248 °C, 180 s)	42 ± 1,4	44 ± 0.6	
50 SKT (256 °C, 180 s)	25 ± 0,1	59 ± 0.4	
41 SKT (263 °C, 180 s)	12 ± 1,2	$94 \pm 0,9$	
84 SKT (265 °C, 106 s)	$48 \pm 4,0$	58 ± 1,6	
75 SKT (265 °C, 116 s)	54 ± 3,2	44 ± 2,1	
68 SKT (265 °C, 123 s)	51 ± 3,7	$46 \pm 3,4$	
61 SKT (265 °C, 129 s)	$48 \pm 2,4$	49 ± 0.4	
45 SKT (265 °C 153 s)	29 + 0 4	69 + 2 0	

Anhang 4: Gehalte [µg/L] der synthetisierten *endo- und exo-6-*(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-(hydroxymethyl)-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (74, 75) in definiert gerösteten Robusta- und Arabica-Standardkaffeegetränken.

^a Mittelwert ± Standardabweichung (μg/L) aus n = 3 (einzelne Getränke), ^b Bezifferung der Bitterstoffe bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 36**, n.d. nicht detektiert. Die Angaben zu den Röstbedingungen der Kaffeeproben sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

Lebenslauf

Name	Stefanie Kreppenhofer	
Geburtsdatum	23.12.1980 in Stuttgart	
Staatsangehörigkeit	Deutsch	
Eltern	Walter Kreppenhofer	
	Renate Kreppenhofer, geb. Mogdans	
Schulausbildung		
1987-1991	Erich-Kästner-Grundschule, Ostfildern Nellingen	
1991-1997	Realschule Nellingen, Ostfildern Nellingen	
1997-2000	Käthe-Kollwitz-Gymnasium, Esslingen	
28.06.2000	Abitur	
Studium		
2000-2002	Eberhard Karls Universität Tübingen, Fach: Chemie	
2002-2003	Universität Stuttgart, Fach:Lebensmittelchemie	
2003-2006	Universität Hohenheim Hauptstudium, Fach: Lebensmittelchemie	
19.04.2006	1. Staatsexamen	
Weiterführende Ausbild	ung	
2006-2007	Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin beim	
	Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg	
24.04.2007	2. Staatsexamen	
Promotionsstudium		
06.2007-08.2010	Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik,	
	Betreuer: UnivProf. Dr. Thomas Hofmann	
Berufstätigkeit		
06.2007-08.2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Lebensmittel-	
	chemie und Molekulare Sensorik, Technische Universität	
	München, Freising	
Seit 11.2010	Specialist Support bei AB SCIEX, Darmstadt	