

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik

Geschmacksstoffe und Geschmacksmodulatoren in Hefeextrakten und Studien zur *Maillard*-Reaktion von Guanosin-5'-monophosphat

Daniel Festring

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.

Vorsitzende(r):

Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Th. F. Hofmann
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle
3. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 27.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.07.2012 angenommen.

Worte des Dankes

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann für die Überlassung der interessanten Thematik. Ein noch größerer Dank gehört ihm für die hervorragende Betreuung, für seinen nahezu unerschöpflichen Ideenreichtum, die fachlichen Diskussionen, Tipps und Ratschläge. Nicht zuletzt möchte ich mich für die permanente Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern am Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für das herausragende Arbeitsklima, die Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich allen Kolleginnen und Kollegen am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik in Freising. Ein besonderer Dank gilt den „Insassen“ von Labor II für die gemeinsame Zeit, die derben Sprüche, den schrecklichen Musikgeschmack und das ein oder andere Bierchen nach Feierabend.

Ich bedanke mich beim NMR-Team um Dr. Oliver Frank für die Messung zahlreicher Proben und die Hilfsbereitschaft bei mess- und auswertetechnischen Fragen. Besonderer Dank gebührt Barbara Süß für ihren unermüdlichen Einsatz auf der Suche nach dem perfekten *Shim*. All den MS-Operatoren um Dr. Timo Stark sei ebenso für deren Zeit und Hilfsbereitschaft gedankt. Besonders soll an dieser Stelle Stefanie Kreppenhofer für ihre Geduld, Zeit und großartige Hilfe bei der Methodenentwicklung gedankt werden.

Mein Dank gilt ferner Sabine Rauth für ihre Unterstützung bei den Messungen am CD-Spektrometer und Dr. Anne Brockhoff für ihre Antworten auf Rezeptorfragen sowie die Bereitstellung einiger Grafiken.

Allen Teilnehmern an den sensorischen Experimenten meinen besten Dank.

Für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes und die getätigten Verbesserungsvorschläge bedanke ich mich bei Dr. Annika Lagemann, Caroline Hellfritsch, Dr. Gesa Haseleu und Dr. Daniel Intelmann.

Bei Barbara Süß, Caroline Hellfritsch, Christina Schmidt, Dr. Gesa Haseleu, Stefanie Kreppenhofer und Dr. Daniel Intelmann bedanke ich mich für eine unvergessliche gemeinsame Zeit und Bier.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und all meinen Freunden für die Unterstützung, Motivation und dafür, dass ich immer auf euch zählen kann. DANKE.

Eine Entschuldigung an alle die ich an dieser Stelle vergessen habe explizit zu erwähnen. Seid euch aber meines Dankes gewiss.

Vorbemerkungen

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Juli 2010 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München unter der Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Th. F. Hofmann durchgeführt. Dabei fand dieser in der Zeit von Januar bis September 2007 im Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster statt. Die Messungen mittels zellbasierter Rezeptorassays wurden in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke von Dr. A. Brockhoff durchgeführt.

Publikationen/Patente

Festring, D.; Hofmann, T. Discovery of *N*²-(1-carboxyethyl)guanosine 5'-monophosphate as an umami-enhancing *Maillard*-modified nucleotide in yeast extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10614-10622.

Festring, D.; Hofmann, T. Systematic studies on the chemical structure and umami enhancing activity of *Maillard*-modified guanosine 5'-monophosphates. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 665-676.

Festring, D.; Brockhoff, A.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Stereoselective synthesis of amides sharing the guanosine 5'-monophosphate scaffold and umami enhancement studies using human sensory and hT1R1/rT1R3 receptor assays. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8875-8885.

Festring, D.; Hofmann, T. Discovery of umami enhancing *N*-glycated guanosine 5'-monophosphates in yeast extracts. In: *Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology*; Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Schieberle, P., Eds.; Proceedings of the 9th Wartburg Symposium: Eisenach, Germany, 2011 pp 167-172.

Oriol, E.; Hofmann, T.; Festring, D. Nouveaux composés exhausteurs de goût. *Fr. Demande* **2010**, FR 2939798 - A1.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Allgemeines zu Hefeextrakten und -autolysaten	1
1.2	<i>Flavour</i> von Hefeextrakten und -autolysaten	4
1.2.1	Aromaaktive Verbindungen in Hefeextrakten und -autolysaten	5
1.2.2	Geschmacksaktive Verbindungen in Hefeextrakten und -autolysaten	6
1.3	Geschmacksverstärkende Nukleotide	8
1.4	Die <i>Maillard</i> -Reaktion	10
1.4.1	Bildung von <i>N</i> -Glykosiden, <i>Amadori</i> - und <i>Heyns</i> -Produkten	11
1.4.2	Bildung von α -Dicarbonylverbindungen	12
1.4.3	Geschmacksstoffe aus der <i>Maillard</i> -Reaktion	15
1.5	Geschmackswahrnehmung	17
1.6	Analytik von Geschmacksstoffen	20
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	23
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	24
3.1	Geschmacksaktive Verbindungen in Hefeextrakten	24
3.1.1	Quantifizierung der Basisgeschmacksstoffe und Bestimmung der <i>Dose-over-Threshold</i> (<i>DoT</i>)-Faktoren	25
3.1.2	Geschmacksrekombinationsexperimente	31
3.1.3	Sensorische Bedeutung ausgewählter 5'-Nukleotide	32
3.1.4	Diskussion	34
3.2	Umamigeschmacksstoffe und -modulatoren in nukleotidreichen Hefeextrakten	36
3.2.1	Sensorische Voruntersuchungen	36
3.2.2	Aktivitätsorientierte Fraktionierung des Hefeextraktes 3 mittels RP-MPLC	37
3.2.3	Identifizierung geschmacksaktiver Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VI	39
3.2.4	Sensorische Untersuchung der identifizierten, geschmacksaktiven Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VI	46
3.2.5	Identifizierung geschmacksaktiver Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VIII	46
3.2.6	Synthese von (<i>R</i>)-, (<i>S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat und (<i>S</i>)- <i>N</i> ² -Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat	51
3.2.7	Stereochemische und sensorische Untersuchungen zu (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat	56
3.2.8	Diskussion	60
3.3	Systematische Studien zur Struktur, Bildung und sensorischen Eigenschaft glykierter Nukleotide	62
3.3.1	<i>N</i> ² -(1-Carboxyalkyl)-5'-GMP-Derivate aus der Reaktion von 5'-GMP mit Dicarbonylen	62
3.3.2	<i>N</i> ² -(1-Carboxyalkyl)-5'-GMP-Derivate aus der Reaktion von 5'-GMP mit reduzierenden Kohlenhydraten	65
3.3.2.1	Reaktion von 5'-GMP mit Erythrose	66
3.3.2.2	Reaktion von 5'-GMP mit Ribose	70
3.3.2.3	Reaktion von 5'-GMP mit Glukose	72
3.3.2.4	Reaktion von 5'-GMP mit Maltose	76
3.3.3	<i>N</i> ² -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl-5'-GMP-Derivate aus der Reaktion von 5'-GMP mit Triosen und Aminokomponenten	78
3.3.3.1	Reaktion von 5'-GMP, 1,3-Dihydroxyaceton und <i>n</i> -Propylamin	79

3.3.3.2	Reaktion von 5'-GMP, 1,3-Dihydroxyaceton und Mononatrium-L-Glutamat	81
3.3.4	Mechanismen der <i>Maillard</i> -Reaktion von 5'-GMP	83
3.3.5	Sensorische Studien zur Umamigeschmacksverstärkung modifizierter 5'-GMP-Derivate ..	86
3.3.6	Diskussion	89
3.4	Quantitative Bestimmung glykierter Guanosin-5'-monophosphate in Hefeextrakten	92
3.4.1	Synthese und strukturelle Charakterisierung von N^2 -([$^{13}C_3$]-1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat.....	92
3.4.2	Screening von Hefeextrakten nach glykierten Guanosin-5'-monophosphatderivaten.....	94
3.4.3	Quantifizierung modifizierter Nukleotide in Hefeextrakten mittels SIDA	97
3.4.4	Diskussion	101
3.5	Synthese weiterer N^2-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate	103
3.5.1	Einfluss der Reaktionszeit und des pH-Wertes auf die Bildung von N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphaten	103
3.5.2	Synthese von N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphaten.....	105
3.5.3	Synthese von N^2 -acylierten Guanosin-5'-monophosphaten	110
3.5.4	Diskussion	111
3.6	Humansensorische Aktivität und Umamirezeptoraktivierung durch N^2-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)- und N^2-acylierte Nukleotidderivate	113
3.6.1	Humansensorik	113
3.6.2	Sensorische Studien zum Zeit-Intensitäts-Verlauf der Umamigeschmacksverstärkung ausgewählter 5'-GMP-Derivate	116
3.6.3	Modulierende Eigenschaften von 5'-GMP-Derivaten auf den <i>Response</i> von hT1R1/rT1R3 Umamirezeptorzellen <i>in vitro</i>	118
3.6.4	Diskussion	122
4	EXPERIMENTELLER TEIL.....	124
4.1	Reagenzien und Materialien	124
4.2	Untersuchungsmaterial	127
4.3	Isolierung von Umamigeschmacksmodulatoren aus nukleotidreichen Hefeextrakten	127
4.3.1	RP-MPLC/GVA des Hefeextraktes 3	127
4.3.2	HPLC/vergleichende Geschmacksprofilanalyse der RP-MPLC Fraktion VI.....	127
4.3.3	Isolierung der Dinukleotide aus RP-MPLC Fraktion VI.....	127
4.3.4	Isolierung von (S)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat.....	128
4.4	Modellreaktionen	129
4.4.1	Reaktion von 5'-GMP mit DL-Glycerinaldehyd	129
4.4.2	Reaktion von 2'-Desoxyguanosin mit 1,3-Dihydroxyaceton	130
4.4.3	Säurehydrolytische Spaltung der N^2 -carboxyethylierten Derivate	131
4.4.4	Reaktion von 5'-GMP mit Glyoxal	132
4.4.5	Reaktion von 5'-GMP mit Erythrose.....	132
4.4.6	Reaktion von 5'-GMP mit Ribose, Glukose und Maltose	134
4.4.7	Reaktion von 5'-GMP mit Glukose in Abwesenheit von L-Alanin.....	137
4.4.8	Reaktion von 5'-GMP mit Aminokomponenten in Gegenwart von Triosen	138
4.4.9	Reaktion von 5'-GMP mit [$^{13}C_3$]-Glycerinaldehyd	140
4.4.10	Bildungsstudien der N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate....	141
4.5	Organische Synthesen.....	142
4.5.1	N^2 -acylierte Guanosinderivate	142
4.5.2	N^2 -acylierte Guanosin-5'-monophosphatderivate	144
4.5.3	N^2 -Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat.....	145
4.5.4	Synthese von amidierten N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphatderivaten.....	146
4.6	Quantitative Bestimmungen.....	153
4.6.1	Nukleotide, Nukleoside sowie ausgewählte Derivate	153

4.6.2	Aminosäuren	154
4.6.3	Kationen	154
4.6.4	Anionen und organische Säuren.....	155
4.6.5	Kohlenhydrate und Polyole	155
4.6.6	Glutamylpeptide	155
4.6.7	Glutathion	156
4.6.8	<i>N</i> ² -modifizierte Nukleotide.....	157
4.7	Spektroskopische, spektrometrische und chromatographische Methoden.....	158
4.7.1	Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)	158
4.7.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	159
4.7.3	High Performance Ion Chromatography (HPIC)	162
4.7.4	Aminosäureanalysator (ASA).....	165
4.7.5	UV-VIS-Spektroskopie (UV).....	165
4.7.6	Circulardichroismus-Spektroskopie (CD).....	166
4.7.7	HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	166
4.7.8	Time of Flight Massenspektrometrie (TOF-MS).....	169
4.7.9	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	169
4.7.9.1	¹ H-NMR	169
4.7.9.2	¹³ C-NMR	170
4.7.9.3	¹³ C-DEPT-(135°)-NMR	170
4.7.9.4	gradient selected Correlation Spectroscopy (gsCOSY)	170
4.7.9.5	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)	170
4.7.9.6	Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)	170
4.7.9.7	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC)	171
4.8	Humansensorische Analysen	171
4.8.1	Geschmacksprofilanalysen	172
4.8.2	Erstellen und sensorische Beurteilung von Rekombinaten	172
4.8.3	Vergleichende Geschmacksprofilanalysen	174
4.8.4	Schwellenwertsbestimmung.....	174
4.8.5	Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA).....	175
4.8.6	Matrixsimulierende Geschmacksverdünnungsanalyse (mGVA).....	175
4.8.7	Bestimmung der umamiverstärkenden Eigenschaften	175
4.8.8	Bestimmung von Zeit-Intensitäts-Verläufen	176
4.9	Umamirezeptorstudien.....	177
5	ZUSAMMENFASSUNG	179
6	LITERATURVERZEICHNIS	182
ANHANG.....		192
LEBENS LAUF		194

Abkürzungsverzeichnis

AF	Aktivitätsfaktor
AGE	Advanced glycation endproduct
5'-AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ASA	Aminosäureanalysator
amu	Atom mass unit
CD	Circulardichroismus
3'-5'-cAMP	Zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
5'-CMP	Cytidin-5'-monophosphat
COSY	Homonuclear correlation spectroscopy
d	Dublett
DAD	Diodenarraydetektor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dd	Dublett vom Dublett
DoT	<i>Dose-over-Threshold</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett vom Triplet
ESI	Electronspray ionization
Gly	Glycin
5'-GMP	Guanosin-5'-monophosphat
gs	Gradient selected
GSH	Glutathion
GV	Geschmacksverdünnungs-
GVA	Geschmacksverdünnungsanalyse
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-MS/MS	HPLC – Tandemmassenspektrometrie
HPIC	High performance ion chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
i.D.	Innerer Durchmesser
5'-IMP	Inosin-5'-monophosphat
L-Ala	L-Alanin
L-Arg	L-Arginin
L-Asn	L-Asparagin

L-Asp	L-Asparaginsäure
L-Gln	L-Glutamin
L-Glu	L-Glutaminsäure
L-His	L-Histidin
L-Ile	L-Isoleucin
L-Leu	L-Leucin
L-Lys	L-Lysin
L-Met	L-Methionin
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Pro	L-Prolin
L-Ser	L-Serin
L-Thr	L-Threonin
L-Try	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
L-Val	L-Valin
LC	Liquid chromatography
m	Multipllett
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie/massenspektrometrisch
MSG	Mononatrium-L-Glutamat
n.d.	Nicht detektierbar
NMR	Nuclear magnetic resonance
<i>N</i> -MVP	<i>N</i> -Methyl-4-vinylpyridinium
PFP	Pentafluorphenylpropyl
pt	Pseudotriplett
q	Quartett
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed phase
s	Singulett
sCD	Suppressed conductivity detection
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
sh	Schulter
t	Triplett
TIC	Total ion chromatogram
TMS	Tetramethylsilan

TMSP	3-(Trimethylsilyl)-propion-2,2,3,3- <i>d</i> ₄ -säure
TOF	Time of flight
5'-UMP	Uridin-5'-monophosphat
UV/VIS	Ultraviolet/Visible spectroscopy
5'-XMP	Xanthosin-5'-monophosphat

Symbole

<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
δ	chemische Verschiebung [ppm]
λ	Wellenlänge [nm]

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu Hefeextrakten und -autolysaten

Unter Hefeextrakten versteht man Konzentrate der löslichen Bestandteile aufgeschlossener Hefezellen^[1], die vor allem als Substrate in der Fermentationsindustrie oder als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie Verwendung finden. Aufgrund ihres typischen Geschmacksprofils findet eine Vielzahl von Hefeextrakten Anwendung zur Intensivierung des fleischigen, brühe-artigen Charakters von z.B. Suppen, Chips oder anderen Snackprodukten.

Eine schematische Darstellung über den Herstellungsprozess von Hefeextrakten aus Bäckerhefe ist in **Abbildung 1** gezeigt. Der erste Schritt der Herstellung besteht aus der Kultivierung der Hefe. Hierfür werden zumeist speziell für die Anwendung im Lebensmittel gezüchtete Hefestämme mit hohem Proteingehalt (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) verwendet^[1]. Allerdings kommen vermehrt auch verschiedene andere Hefearten (z.B. *Kluyveromyces*^[2] oder *Candida* Stämme) als potentielle Rohstoffe in Betracht. Ein Beispiel für die Valorisierung industrieller Produktseitenströme stellt die Verwendung entbitterter Brauhefe als Ausgangsmaterial für die Produktion von Hefeextrakten dar^[3, 4].

Nach Beendigung des Kultivierungsprozess erfolgt der Aufschluss des Hefematerials, wobei verschiedene Verfahren wie Plasmolyse, Autolyse oder chemische Hydrolyse Verwendung finden^[5]. Unter Autolyse fasst man Verfahren zusammen, bei denen die Zellen durch die hefeeigenen Enzyme verdaut werden. Dazu werden unter kontrollierten Bedingungen (Temperatur, pH-Wert, Zeit) sowie unter eventueller Zugabe zusätzlicher Enzyme und Degradationsbeschleunigern die Zellen abgetötet, wobei die hydrolytisch wirkenden, endogenen Enzyme (z.B. Proteasen) jedoch nicht deaktiviert werden. Der Zelltod, der in der Auflösung der räumlichen Kompartimentierung der Zelle resultiert, ermöglicht den Enzymen ungehindert innerhalb der gesamten Hefezelle ihrer degradativen Funktion nachzukommen, wobei die entstehenden Abbauprodukte in das umgebende Medium freigesetzt werden^[1]. Verwendung findet die Autolyse vor allem zur Herstellung von natriumarmen Hefeextrakten, wobei die Geschmacksprofile der erhaltenen Produkte in Abhängigkeit der Produktionsparameter zum Teil stark variieren^[1].

Der plasmolytische Herstellungsprozess stellt ein weiteres Produktionsverfahren von Hefeextrakten dar, wobei die Hefezellen durch Zusatz von Salz in das umgebende Medium einem dauerhaften plasmolytischen Stresszustand ausgesetzt werden. Bleibt dieser Zustand ausreichend lang erhalten, führt dies zum Absterben der Zellen gefolgt vom anschließenden enzymatischen Verdau^[1]. Da plasmolytisch hergestellte Hefeextrakte große Mengen an Salz

enthalten, ist die zukünftige Verwendung dieses Verfahrens, aufgrund der steigenden öffentlichen Nachfrage nach natriumreduzierten Lebensmitteln limitiert ^[1].

Bei der chemischen Hydrolyse werden die Hefezellen durch die Einwirkung von Salzsäure aufgeschlossen. Obwohl dieser Prozess vergleichsweise schnell und äußerst effektiv ist, kann es zur Bildung unerwünschter chlorierter Nebenprodukte wie z.B. Monochlorpropandiol oder Dichlorpropanol sowie zum sauren Abbau von Aminosäuren und Vitaminen kommen ^[1]. Des Weiteren enthalten auch diese Extrakte als Resultat der Neutralisation der überschüssigen Salzsäure mit Natronlauge hohe Gehalte an Natriumchlorid.

Um nach dem Aufschluss das finale Produkt zu erhalten werden bei allen Verfahren die gelösten Zellbestandteile von den unlöslichen Zellwänden getrennt, aufkonzentriert, sterilisiert und in Form von flüssigen Hefeextrakten (50-65 % Trockenmasse), hochviskosen Pasten (70-80 % Trockenmasse) oder als getrocknete Pulver in den Handel gebracht. Abhängig von der Verwendung des Endproduktes kann der Herstellungsprozess zusätzliche technologische Schritte (z.B. Filtrationen etc.) enthalten. Im Gegensatz zu Hefeextrakten werden bei Hefeautolysaten die Zellwände nicht von den löslichen Komponenten separiert. Dies führt zu einem Produkt mit reduzierter Geschmacksintensität, da es durch die Zellwandbestandteile zu einer Verdünnung des geschmacksaktiven Extraktes kommt ^[1]. Diese Produkte weisen darüber hinaus eine schlechtere Wasserlöslichkeit als Hefeextrakte auf ^[5]. Aufgrund ihrer reduzierten Kosten und ihrer Wasserbindungsfähigkeit werden sie vielfach in Produkten verwendet, in denen die Löslichkeit eine untergeordnete Rolle spielt ^[5].

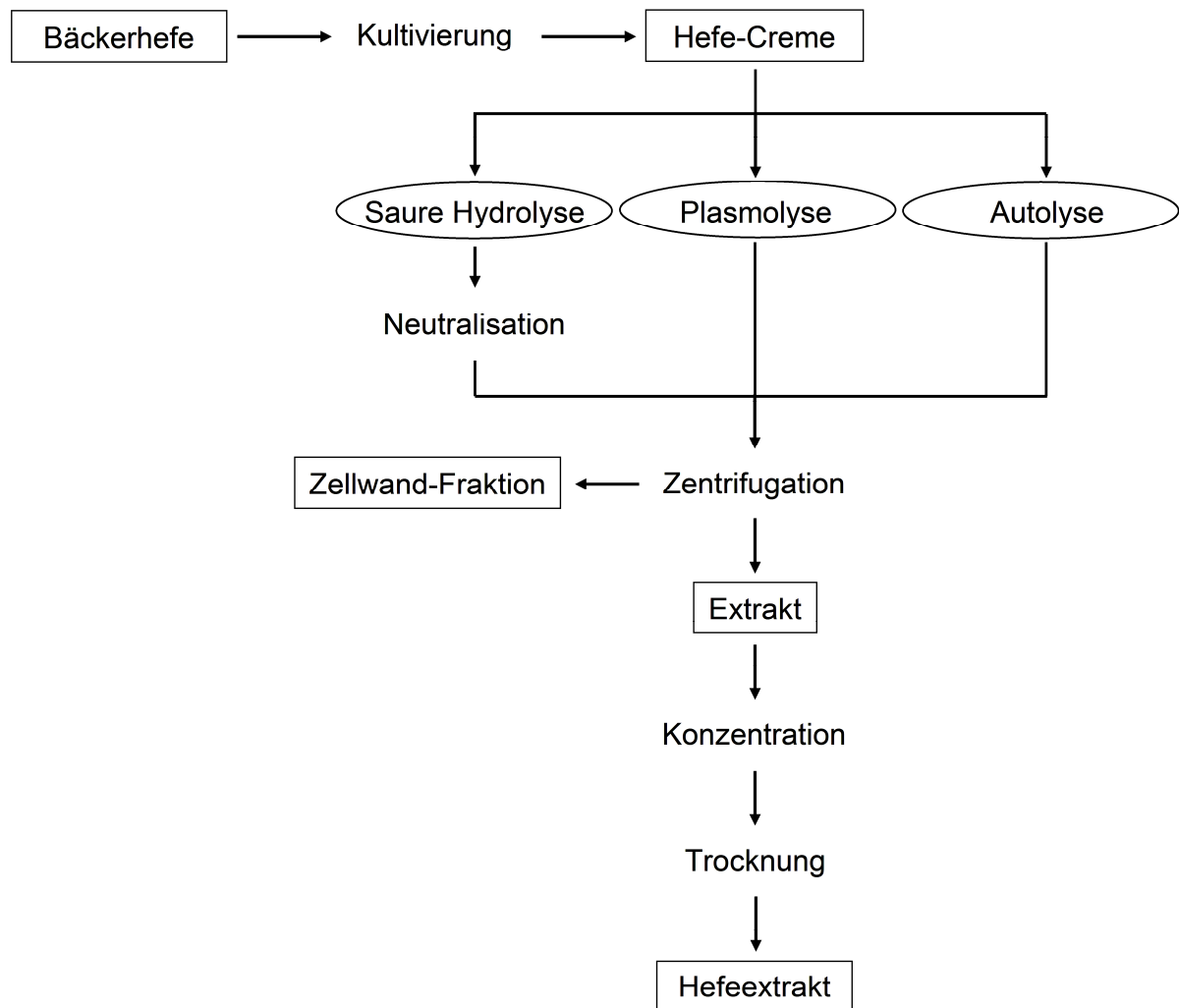


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Prozessschritte zur Herstellung von Hefeextrakten aus Bäckerhefe (modifiziert nach Nagodawithana, 1994^[5]).

Eine Sonderform unter den Hefeextrakten stellen nukleotidangereicherte Produkte dar, wobei insbesondere RNA-reiche Stämme für die enzymatische Degradation Verwendung finden. Im Falle der Hefen besteht die Nukleinsäurefraktion überwiegend aus RNA während die Gehalte an DNA vergleichsweise niedrig sind. Durch Hydrolyse der RNA wird die Freisetzung großer Mengen an umamiverstärkenden Ribonukleotiden ermöglicht^[1]. Der Gesamtgehalt an RNA beträgt im Falle von Bäckerhefe zwischen 8-11 %, während *Candida utilis* sogar Gehalte zwischen 10-15 % aufweist, was die Verwendung dieser Mikroorganismen für die industrielle Produktion von Nukleotiden prädestiniert^[1]. Im Zuge der Herstellung erfolgt zunächst die Extraktion der RNA durch Erhitzung der Hefesuspension (90-100 °C, 1-3 Stunden), gefolgt von der Zugabe des Enzyms 5'-Phosphodiesterase, das die Freisetzung von 5'-Mononukleotiden bewirkt (**Abbildung 2**)^[1]. Als kostengünstigere Alternative erweist sich an Stelle des reinen Enzyms die Verwendung einer Malzkeimlingszubereitung, die eine hohe Phosphodiesteraseaktivität aufweist^[6]. Ebenso

erfolgt die Zugabe einer Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP)-Desaminase, die die Umwandlung des wenig geschmacksaktiven 5'-AMP in Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP) bewirkt ^[1]. Die Herstellung eines nukleotidreichen Hefeextraktes aus Brauhefe unter Anwendung verschiedener Enzyme ist in der Literatur beschrieben ^[7].

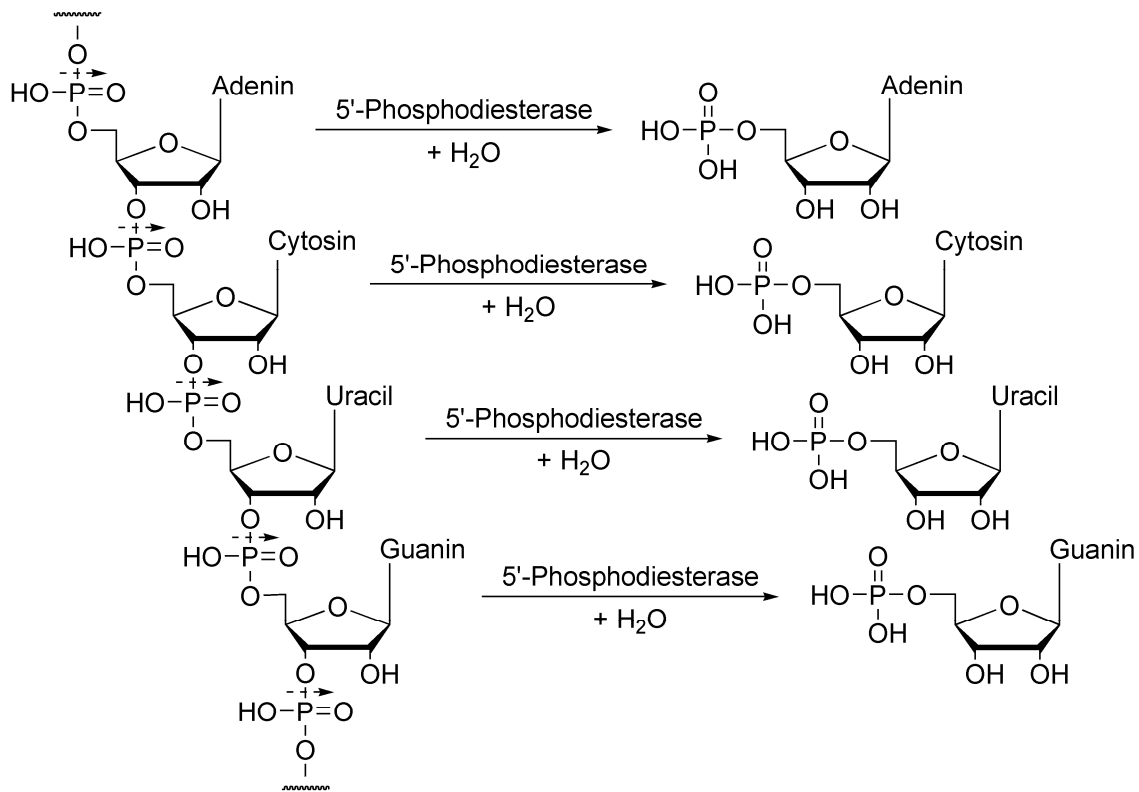


Abbildung 2. Schematische Darstellung der enzymatischen Spaltung der RNA durch 5'-Phosphodiesterase unter Bildung von 5'-Nucleotiden (modifiziert nach Nagodawithana, 1992 ^[1]).

1.2 Flavour von Hefeextrakten und -autolysaten

Die organoleptischen Eigenschaften eines Lebensmittels werden in der deutschen Umgangssprache zumeist als Geschmack beschrieben. Um allerdings zu spezifizieren wird zwischen Aroma, Geschmack und Tastempfindung unterschieden, deren Summe im Englischen als „Flavour“ zusammengefasst wird ^[8].

Bei Aromastoffen handelt es sich um flüchtige Moleküle die in spezifischen Epithelzellen der Nase detektiert werden. Dabei erfolgt die Wahrnehmung direkt (orthonasal) und durch den Nasopharynx (retronasal) ^[8]. Im Gegensatz dazu sind Geschmacksstoffe zumeist polare Verbindungen mit höheren Molekulargewichten als Aromastoffe, was in einer geringeren Volatilität resultiert. Die Wahrnehmung dieser Verbindungen erfolgt im Mundraum durch spezielle Rezeptorsysteme.

Eine strikte Trennung zwischen diesen beiden Gruppen ist nicht in allen Fällen möglich, da einige Substanzen sowohl einen Geschmack aufweisen, als auch zum Aroma eines Lebensmittels beitragen ^[8].

1.2.1 Aromaaktive Verbindungen in Hefeextrakten und -autolysaten

Während in der Literatur eine Vielzahl an Patenten existiert, die sich mit Hefeextrakten bzw. -autolysaten beschäftigen, ist die Anzahl wissenschaftlicher Publikationen beschränkt. Erste systematische Untersuchungen eines Hefeautolysates resultierten in der Identifizierung von insgesamt 29 sauren und 17 neutral/basischen, flüchtigen Verbindungen ^[9, 10]. Weiterhin zeigte eine zusätzliche thermische Behandlung des Autolysates eine signifikante Veränderung des Aromaprofils in Richtung eines nussigen, karamell-artigen Charakters, allerdings blieben die Verbindungen, die für diese Abweichung verantwortlich waren, unbekannt ^[10].

Die Untersuchung einer Hefeextraktzubereitung, bestehend aus Hefeextrakt, Salz, Gewürzen und nicht näher spezifizierten Pflanzenextrakten, führte zur Identifizierung von etwa 100 flüchtigen Verbindungen ^[11]. Neben Biosyntheseprodukten der Hefe wurden Verbindungen aus der Lipidoxidation und insbesondere *Maillard*-Reaktionsprodukte entdeckt ^[11]. Weiterhin zeigte sich die untersuchte Zubereitung als eine natürliche Quelle für ausgewählte schwefelhaltige Furane, die ein fleischiges Aroma besaßen und bereits in niedrigen Konzentrationen aromaaktiv waren ^[11].

Umfassende Untersuchungen eines thermisch behandelten Hefeextraktes mit speziellem Fokus auf schwefelhaltige Verbindungen untermauerten die besondere Bedeutung dieser Substanzklasse wobei jene Verbindungen mit fleisch-artigen, röstigen Aromanoten als bedeutsam für das Gesamtaroma erachtet wurden ^[12].

Allen diesen Studien war gemein, dass die Aromastoffe nicht in ihrem Beitrag zum Gesamtaroma des Hefeextraktes gewichtet wurden. Um diese Lücke in der Literatur zu schließen und das Aroma eines nativen sowie thermisch behandelten Hefeextraktes auf molekularer Ebene zu objektivieren, wurden diese mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse untersucht ^[13]. Dabei erwiesen sich im unerhitzten Extrakt, der schwach hefe- und käse-artige Noten aufwies, die schweiß-artig, käsig riechende Buttersäure, 2- und 3-Methylbuttersäure sowie das karamell-artig riechende 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon als aromaaktivste Verbindungen ^[13]. Nach thermischer Behandlung einer wässrigen Hefeextraktlösung bei 145 °C für 20 Minuten zeichneten sich neben den bereits erwähnten Verbindungen (mit Ausnahme der Buttersäure) das rauchig riechende 2-Methoxyphenol sowie das schweflig-röstig riechende 2-Furanmethanthiol als Schlüsselaromastoffe aus ^[13].

Folgende quantitative Studien und die anschließende Berechnung von Aromawerten (AW) wiesen insbesondere die oxidationsempfindlichen Thiole 2-Methyl-3-furanthiol (**I**, **Abbildung**

3), 2-Furfurylthiol (**II**, **Abbildung 3**) sowie die *Strecker*-Aldehyde 3-Methylbutanal (**III**, **Abbildung 3**) und Methional (**IV**, **Abbildung 3**) als Hauptaromastoffe im thermisch nachbehandelten, kommerziell erhältlichen Hefeextrakt aus ^[14], was die Bedeutsamkeit der *Maillard*-Reaktion für die Aromaformation in den Hefeprodukten untermauerte. Unter den weiteren wertgebenden Aromastoffen befanden sich 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon (**V**, **Abbildung 3**), Phenylacetaldehyd (**VI**, **Abbildung 3**), 3-Mercapto-2-pentanon (**VII**, **Abbildung 3**) und 2-Methylbutanal (**VIII**, **Abbildung 3**) ^[14].

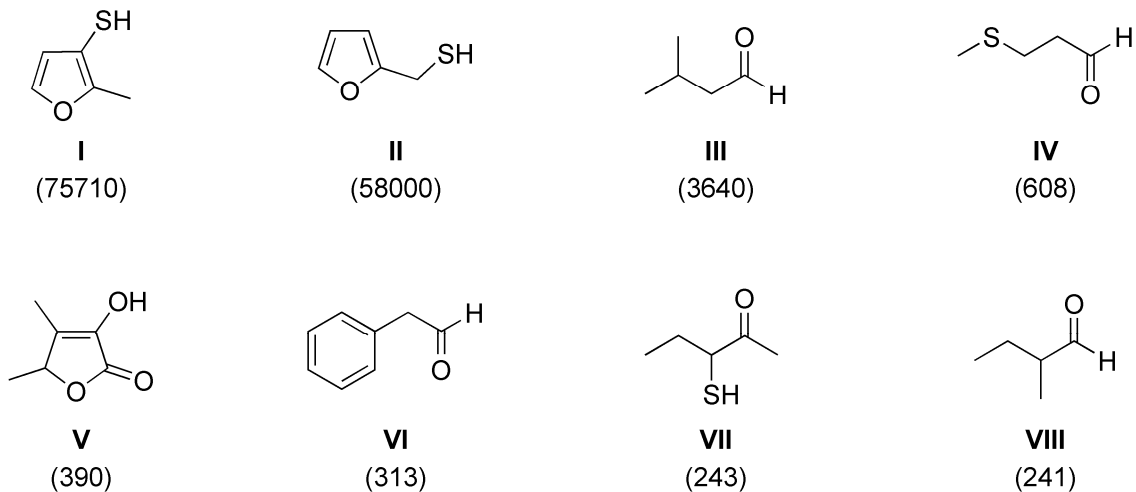


Abbildung 3. Übersicht über die Hauptaromastoffe 2-Methyl-3-furanthiol (**I**), 2-Furfurylthiol (**II**), 3-Methylbutanal (**III**), Methional (**IV**), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon (**V**), Phenylacetaldehyd (**VI**), 3-Mercapto-2-pentanon (**VII**) und 2-Methylbutanal (**VIII**) in einem kommerziell erhältlichen Hefeextrakt nach thermischer Behandlung (145 °C, 20 min). Die Aromawerte, berechnet als Quotient aus Konzentration und Geruchsschwellenwert, sind in Klammern angegeben (nach *Münch und Schieberle, 1998* ^[14]).

1.2.2 Geschmacksaktive Verbindungen in Hefeextrakten und –autolysaten

Studien über Geschmacksstoffe in Hefeextrakten konzentrierten sich bislang überwiegend auf Möglichkeiten einer Anreicherung bekannter Geschmacksstoffe und weniger auf die Identifizierung unbekannter Geschmacksstoffe und Geschmacksmodulatoren.

Sensorisches Charakteristikum von Hefeextrakten ist die ausgeprägte würzige, fleischige Geschmacksnote. Dieser Eindruck, der den Namen „umami“ trägt, leitet sich von dem japanischen Wort „umai“ ab, das frei mit brühe-artig, fleischig oder schmackhaft übersetzt werden kann ^[15]. Die erstmalige Isolierung der für diesen Geschmack ursächlichen Substanz gelang bereits 1909 aus getrocknetem Seetang (*Laminaria japonica*) und enthüllte den Umamigeschmack von L-Glutaminsäure bzw. des entsprechenden Mononatriumsalzes (MSG, **1**, **Abbildung 4**) ^[15].

Aufgrund ihres hohen Gehaltes an freier, als auch an peptid- oder proteingebundener L-Glutaminsäure werden Hefezellen als kostengünstiges Ausgangsmaterial zur Herstellung von Würzen durch Proteinhydrolyse genutzt. Obwohl die Gehalte an freiem L-Glutamat im fertigen Produkt in Abhängigkeit vom Herstellungsprozess stark variieren können, wird diese Aminosäure dennoch als eine der Hauptgeschmacksstoffe in Hefeextrakten vermutet.

Eine weitere wichtige Substanzklasse für den Umamigeschmack bilden die Purin-5'-ribonukleotide, die als Abbauprodukte der hefeeigenen RNA entstehen ^[1]. Dabei zeigen einige Derivate einen intrinsischen Umamigeschmack in Wasser mit Schwellenwerten von 0,3 mmol/L für Guanosin-5'-monophosphat (5'-GMP, **2**, **Abbildung 4**), 5 mmol/L für Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP, **3**, **Abbildung 4**) und 4 mmol/L für Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP, **4**, **Abbildung 4**) ^[16, 17]. Allerdings ergibt sich die eigentliche Bedeutsamkeit dieser Substanzklasse weniger durch ihren Eigengeschmack, sondern vielmehr durch die Eigenschaften den Umamigeschmack von **1** synergistisch zu verstärken. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von **3** zu einer Lösung von **1** die resultierende Umamiintensität signifikant ansteigen ließ ^[18]. Ein Vergleich der Aktivität der unterschiedlichen Purine in Relation zu **3** ergab, dass **2** ca. 2,3-fach aktiver war, während Xanthosin-5'-monophosphat (5'-XMP, **5**, **Abbildung 4**) und **4** lediglich 0,5- bzw. 0,13-mal die Aktivität der Referenz (**3**) aufwiesen ^[18, 19]. Weiterhin tragen die Nukleotide zum Körper, Mundgefühl und zur Persistenz des Geschmacks bei ^[20]. Da in den Hefeextrakten die Nukleotide in Gegenwart von **1** vorliegen, ist zu erwarten, dass diese einen entscheidenden Beitrag zum Gesamtgeschmack des Produktes leisten.

Darüber hinaus besitzen auch einige organische Säuren einen umami-artigen Geschmackseindruck, wobei hierbei insbesondere C₄-Dicarbonsäuren wie Bernstein- (**6**, **Abbildung 4**) und Weinsäure zu nennen sind ^[21, 22]. Über die Präsenz von **6** in Hefeautolysaten und deren Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften wurde bereits in der Literatur berichtet. Nach Zugabe von Natriumsuccinat zu einer Fleischbrühe wurde ein geschmacksverbessernder Effekt ähnlich dem von **1** beobachtet ^[22].

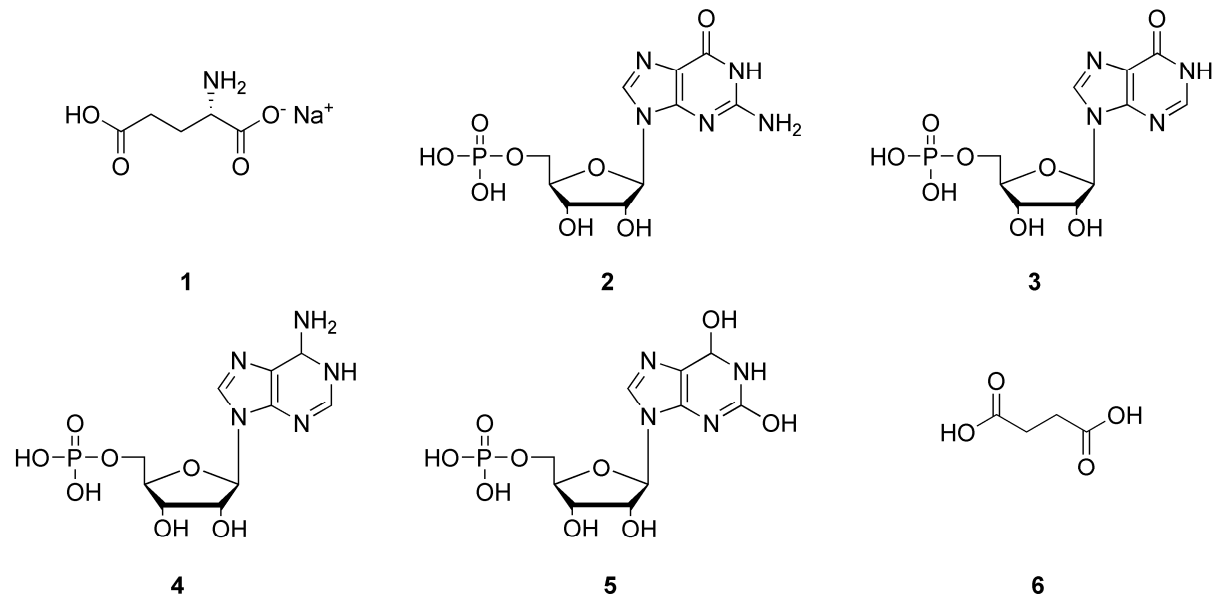


Abbildung 4. Chemische Strukturen der natürlich vorkommenden umamiaktiven bzw. umamiverstärkenden Verbindungen Mononatrium-L-Glutamat (1), Guanosin-5'-monophosphat (2), Inosin-5'-monophosphat (3), Adenosin-5'-monophosphat (4), Xanthosin-5'-monophosphat (5) und Bernsteinsäure (6).

1.3 Geschmacksverstärkende Nukleotide

Wie bereits erwähnt nehmen die Purin-5'-nukleotide aufgrund ihrer Modulatorfunktionalität eine Sonderstellung in der Gruppe der umamiaktiven Verbindungen ein. Neben den natürlich vorkommenden Substanzen wie 5'-GMP (2) oder 5'-IMP (3) wurden verschiedene Studien zur chemischen Modifikation der Nukleotidstruktur durchgeführt, um deren geschmacksverstärkenden Eigenschaften zu maximieren. Insbesondere das 5'-IMP-Derivat 2-Mercaptoinosin-5'-monophosphat (7, **Abbildung 5**) erwies sich als vielversprechender Kandidat, dessen Aktivität um ein vielfaches höher war als die des natürlich vorkommenden Purinnukleotids ^[23-25]. Weitere strukturelle Modifikation der freien Mercaptofunktion ergab eine maximale Aktivität für 2-Furfuryl-thioinosin-5'-monophosphat (8, **Abbildung 5**), welches im Vergleich zu 5'-IMP (3) eine 17-fach höhere umamiverstärkende Aktivität aufwies ^[23].

*N*²-Mono- (9, **Abbildung 5**) und dimethylierte Derivate von 5'-GMP (2) zeigten hingegen nahezu keinen erhöhten geschmacksverstärkenden Effekt im Vergleich mit dem Ausgangsmolekül ^[25-27].

Um einen genaueren Einblick in die Bedeutung des Phosphatrestes und die Anwesenheit von Schwefel im Molekül zu untersuchen wurden ebenfalls die 5'-Monosulfate von Inosin (5'-IMS) und Guanosin (5'-GMS) sowie 6-Thioguanosin-5'-monophosphat hergestellt und sensorisch evaluiert. Dabei zeigte die Verbindungen 5'-IMS und 5'-GMS (10, **Abbildung 5**) einen intrinsischen Bittergeschmack und keinen synergistischen Effekt auf MSG (1) ^[28].

Hingegen erwies sich 6-Thio-5'-GMP (**11**, **Abbildung 5**) sowohl im Geschmack als auch in der Geschmacksverstärkung als doppelt so aktiv wie das 6-oxoanalogue 5'-GMP (**2**)^[28].

Während es sich bei den zuvor genannten Verbindungen um rein synthetische Derivate handelt, gelang im Jahr 2007 erstmals die Identifizierung des modifizierten Nukleotids *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**, **Abbildung 5**) in Bonito, einem getrockneten japanischen Thunfischprodukt^[29]. Die sensorische Aktivität dieses Purins wurde als um ein Vielfaches stärker beschrieben als diejenige des unmodifizierten Nukleotids^[30]. Darüber hinaus wurde über das entsprechende *N*²-Acetylderivat (**13**, **Abbildung 5**) berichtet, dessen sensorische Aktivität ausgeprägter als die des Laktamides war^[30]. Allerdings konnte das natürliche Vorkommen dieser Verbindung bisher noch nicht bestätigt werden.

Eine systematische Studie aus dem Jahr 2008 beschäftigte sich mit der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen *N*²-alkylierter- und *N*²-acylierter 5'-GMP (**2**)-Derivate^[31]. Dabei zeigten humansensorische Untersuchungen eine Korrelation zwischen den geschmacksverstärkenden Eigenschaften und der Kettenlänge des Substituenten sowie der Anwesenheit einer α -Carbonylfunktion und der An- bzw. Abwesenheit sowie Position eines Schwefelatoms^[31]. Generell wiesen die alkylierten Derivate eine höhere Aktivität als die acylierten Verbindungen auf. *N*²-(3-Methylthiopropyl)-guanosin-5'-monophosphat (**14**, **Abbildung 5**) und *N*²-(Thien-2-yl)-acetyl-guanosin-5'-monophosphat (**15**, **Abbildung 5**) wiesen als aktivste unter den synthetisierten Verbindungen die 5,7- bzw. 5,0-fache Aktivität von 5'-IMP (**3**) auf^[31].

Aufbauend auf diese Untersuchungen beschäftigte sich eine jüngst erschienene Publikation mit dem Einfluss des Schwefelatoms in der *N*²-Seitenkette auf die sensorischen Attribute der *N*²-Alkyl- und *N*²-Alkanoylderivate^[32]. Die Sulfide wurden in die entsprechenden Sulfoxide überführt, deren organoleptische Bewertung jedoch vergleichsweise niedrigere Aktivitäten offenlegte^[32].

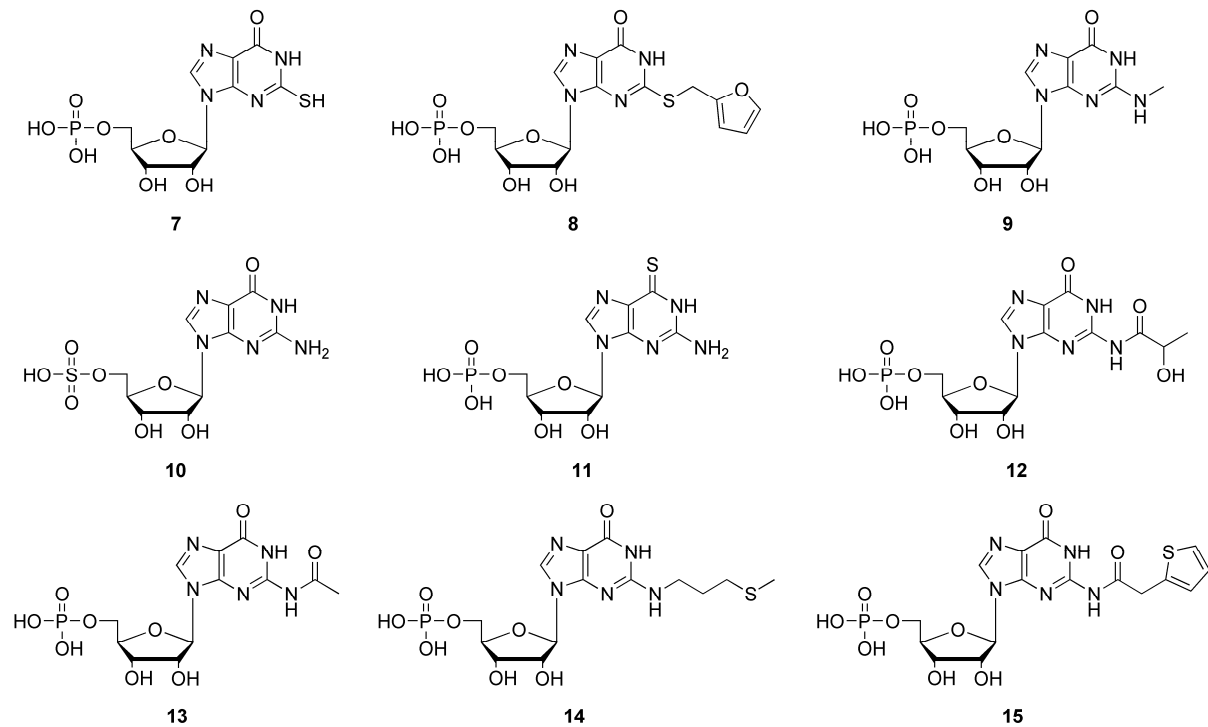


Abbildung 5. Strukturformeln ausgesuchter Purinnukleotide, die in der Literatur aufgrund ihrer geschmacklichen bzw. geschmacksmodulierenden Attribute beschrieben wurden: 2-Mercaptoinosin-5'-monophosphat (**7**)^[23-25], 2-Furfuryl-thioinosin-5'-monophosphat (**8**)^[23], *N*²-Methyl-guanosin-5'-monophosphat (**9**)^[25-27], Guanosin-5'-monosulfat (**10**)^[28], 6-Thioguanosin-5'-monophosphat (**11**)^[28], *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**)^[29], *N*²-Acetyl-guanosin-5'-monophosphat (**13**)^[30], *N*²-(3-Methylthiopropyl)-guanosin-5'-monophosphat (**14**)^[31], *N*²-(Thien-2-yl)-acetyl-guanosin-5'-monophosphat (**15**)^[31].

1.4 Die *Maillard*-Reaktion

Unter der *Maillard*-Reaktion versteht man die nach seinem Entdecker *Louis Camille Maillard* benannte und bei der thermischen Verarbeitung von Lebensmitteln ablaufende Reaktionskaskade zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und freien Aminosäuren^[33].

Bis heute stellt die Erforschung dieser Reaktion eine der Kerndisziplinen der Lebensmittelchemie dar, da diese aufgrund des verbreiteten Vorkommens von reduzierenden Kohlenhydraten und Aminosäuren bzw. Proteinen bei der Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln eine entscheidende Rolle einnimmt.

Weiterhin erlangte die *Maillard*-Reaktion aufgrund negativer Begleiterscheinungen während des Prozessierens von Lebensmitteln steigende Aufmerksamkeit. So kommt es zum einen im Zuge der Reaktion der ϵ -Aminofunktion der essentiellen Aminosäure L-Lysin zu einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit, zum anderen wurde vermehrt die Bildung potentiell toxischer Verbindungen (z.B. Acrylamid) mit voranschreitender *Maillard*-Reaktion beschrieben^[8].

Nicht zuletzt spielt die *Maillard*-Reaktion auch im lebenden Organismus unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle und kann durch die Veränderung von Proteinen und Nukleinsäuren zu Alterungsprozessen beitragen oder zu Komplikationen bei Erkrankungen wie Diabetes führen ^[34].

Die *Maillard*-Reaktion lässt sich in Anlehnung an *Mauro* ^[35] in drei Phasen unterteilen, wobei die Primärphase durch die Bildung von *N*-Glykosiden und den entsprechenden *Amadori*- bzw. *Heyns*-Produkten gekennzeichnet ist. Mit voranschreitender Reaktionsdauer kommt es zur Bildung äußerst reaktiver α -Dicarbonylintermediate, die wiederum verschiedensten Folgereaktionen wie Enolisierungen, Eliminierungen, Zyklisierungen oder Fragmentierungen unterliegen. Die Endphase ist charakterisiert durch die Polymerisation und Kondensation der reaktiven Intermediate zu hochmolekularen, z.T. schlecht wasserlöslichen Farbstoffen, den sogenannten Melanoiden.

1.4.1 Bildung von *N*-Glykosiden, *Amadori*- und *Heyns*-Produkten

Der erste Schritt der *Maillard*-Reaktion zeichnet sich durch die Umsetzung der Aminokomponenten mit der Carbonylfunktion des reduzierenden Kohlenhydrates aus. Bei den Aminokomponente handelt es sich zumeist um die ubiquitär vorkommenden freien Aminosäuren, Peptide oder Proteine, wobei allerdings auch andere Verbindungen mit freien Aminogruppen, wie einige Vitamine, Phospholipide oder Nukleinsäurebestandteile als Reaktanden in Frage kommen ^[36-39].

Abbildung 6 skizziert schematisch die initiierenden Schritte der *Maillard*-Reaktion ausgehend von einer offenkettigen Aldose (**I**), die sich in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit der weniger reaktiven pyranoiden (**II**) bzw. furanoiden (**III**) Form befindet. Nach nukleophiler Addition der Aminokomponente und anschließender Wassereliminierung erhält man die Schiff'sche Base (**IV**, **Abbildung 6**), die durch Ringschluss in das *N*-Glykosylamin (**V**, **Abbildung 6**) umgelagert wird. Während die *N*-glykosylierten Verbindungen aromatischer und heterozyklischer Amine wie z.B. im Falle der DNA und RNA eine vergleichsweise hohe Stabilität aufweisen, erweisen sich die *N*-Glykoside freier Aminosäuren als äußerst instabil. Zum einen können diese über das offenkettige Imin hydrolytisch in die Ausgangsmaterialien gespalten werden, oder über das Enaminol (**VI**, **Abbildung 6**) in die *Amadori*-Verbindung (**VII**, **Abbildung 6**) umlagern ^[40-42]. Diese Verbindung liegt im Gleichgewicht mit der Pyranose (**VIII**) und der Furanose (**IX**) vor, wobei den *Amadori*-Verbindungen aufgrund ihrer zyklischen Molekülstrukturen höhere Stabilitäten als dem Imin gegeben sind (**Abbildung 6**) ^[8].

Analog zu den *Amadori*-Verbindungen bilden sich aus der Reaktion von Ketosen mit den Aminokomponenten die korrespondierenden Aminoaldosen, die nach ihrem Entdecker *Heyns*-Verbindungen genannt werden ^[43].

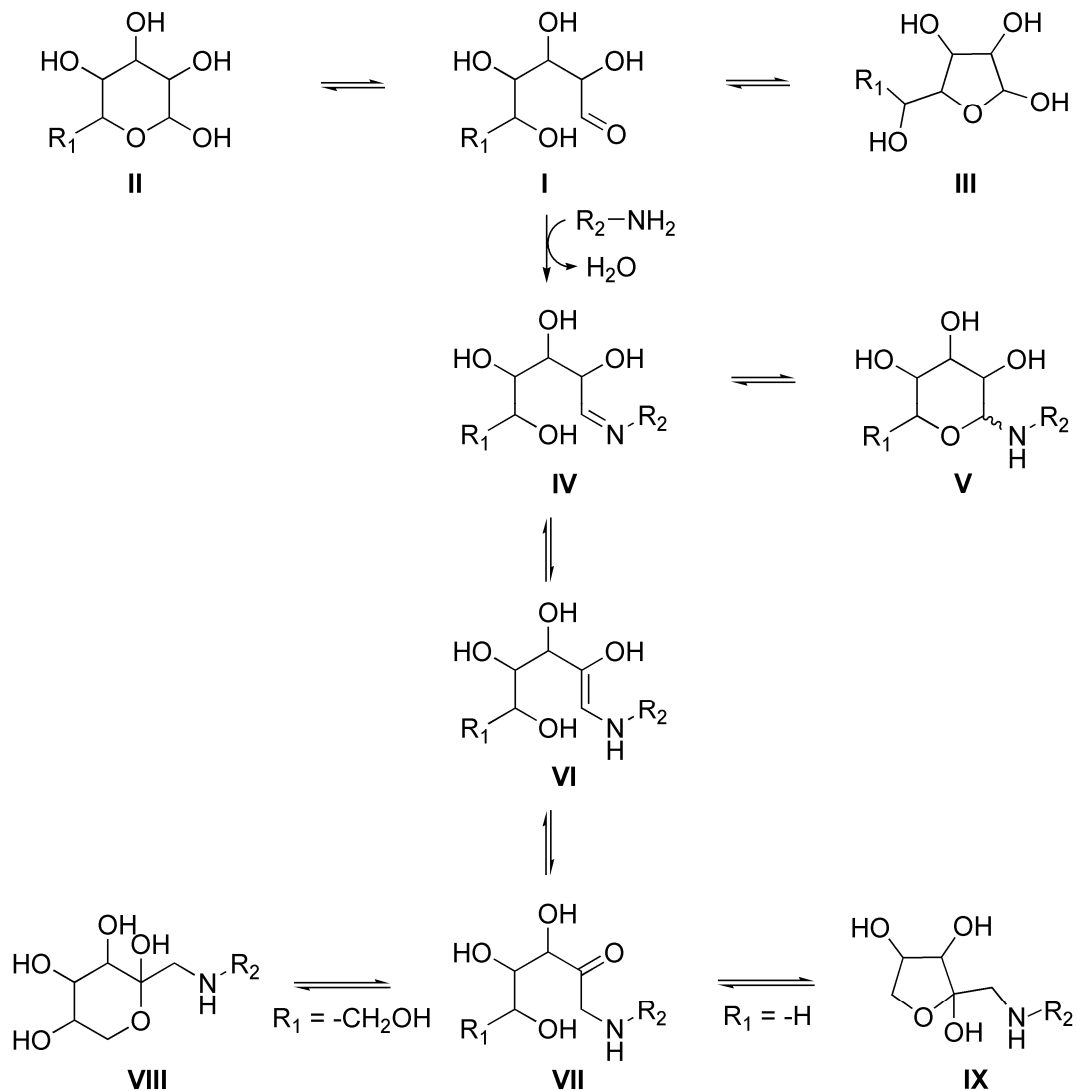


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Bildung der *Amadori*-Verbindungen **VII**, **VIII** und **IX** aus der offenkettigen Aldose **I** in der Primärphase der *Maillard*-Reaktion (Pentose: **R**₁ = -H; Hexose: **R**₁ = -CH₂-OH).

1.4.2 Bildung von α -Dicarbonylverbindungen

Die Bildung von α -Dicarbonylen aus dem Abbau der *Amadori*- und *Heyns*-Produkte spielt eine wichtige Rolle im Zuge der voranschreitenden *Maillard*-Reaktion, da diese hochreaktive Intermediate darstellen, die an einer Reihe von Folgereaktionen beteiligt sind.

Zunächst erfolgt dabei die Umlagerung der *Amadori*-Verbindung (**I**) in das 1,2-Enaminol (**II**), dessen allylständige Hydroxyfunktion in einer säure- oder basenkatalysierten Reaktion abgespalten wird, bevor in einer hydrolytischen Desaminierung die 3-Desoxy-1,2-diulose (3-Desoxyoson, **III**) gebildet wird (**Abbildung 7**)^[44, 45]. Erfolgt im ersten Schritt eine Enolisierung der *Amadori*-Verbindung (**I**, **Abbildung 7**) in das entsprechende 2,3-Enaminol (**IV**, **Abbildung 7**), so kommt es im Zuge einer *retro-Michael*-Reaktion zur Bildung der 1-Desoxy-

2,3-diulose (1-Desoxyoson, **V**, **Abbildung 7**)^[46] bzw. unter Abspaltung der Hydroxyfunktion an C(4) zur Bildung der 4-Desoxy-2,3-diulose (4-Desoxyoson, **VI**, **Abbildung 7**). Letztere unterliegt im Gegensatz zu den vorher genannten Verbindungen keiner Abspaltung des Amins. Alle drei Desoxyosone liegen in verschiedenen zyklischen Halbacetal- und Halbketalformen vor.

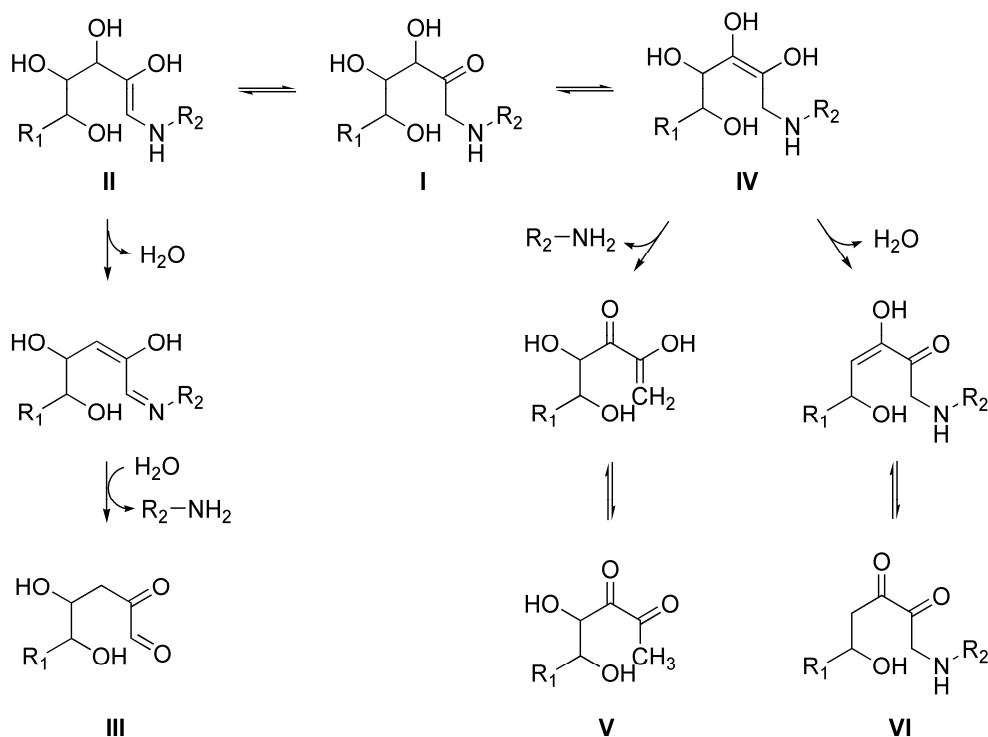


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Bildung der α -Dicarbonylverbindungen 3-Desoxy-1,2-diulose (**III**), 1-Desoxy-2,3-diulose (**V**) und 4-Desoxy-2,3-diulose (**VI**) aus der *Amadori*-Verbindung (**I**) (Pentose: $R_1 = -H$; Hexose: $R_1 = -CH_2-OH$).

Als α -Dicarbonyle unterliegen die Desoxyosone aufgrund ihrer hohen Reaktivität einer Vielzahl weiterer Reaktionen. Aufgrund der Komplexität des Produktspektrums wird im Folgenden ausschließlich auf die Bildung kurzkettiger Dicarbonyle detaillierter eingegangen, die im weiteren Verlauf der Arbeit von besonderer Relevanz sind.

Aus der Fragmentierung der Desoxyosonen gehen durch *retro-Aldol*-, oxidative- oder Diketospaltungen kurzkettige α -Dicarbonyl- oder α -Hydroxycarbonylstrukturen wie z.B. Methylglyoxal oder Glycolaldehyd hervor. Diese wurden erfolgreich in thermisch behandelten Aminosäure/Kohlenhydrat-Mischungen nachgewiesen^[47-49].

Die Bildung von Methylglyoxal (**II**) kann dabei, wie in **Abbildung 8** anhand des Beispiels der Desoxyglucosone dargestellt, durch eine C(3)-C(4) *retro-Aldol*spaltung aus dem 3-Desoxyglucoson (**I**) und dem 1-Desoxyglucoson (**IV**) erfolgen, wobei als Nebenprodukt 2,3-Dihydroxypropanal (**III**) entsteht^[50]. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit aus dem

intermediär gebildeten Hydroxybutandion (**VI**), das neben Glykolaldehyd (**V**) aus der C(4)-C(5) Spaltung von **IV** resultiert, durch Abspaltung von Formaldehyd (**VII**) das α -Dicarbonyl **II** freizusetzen (**Abbildung 8**).

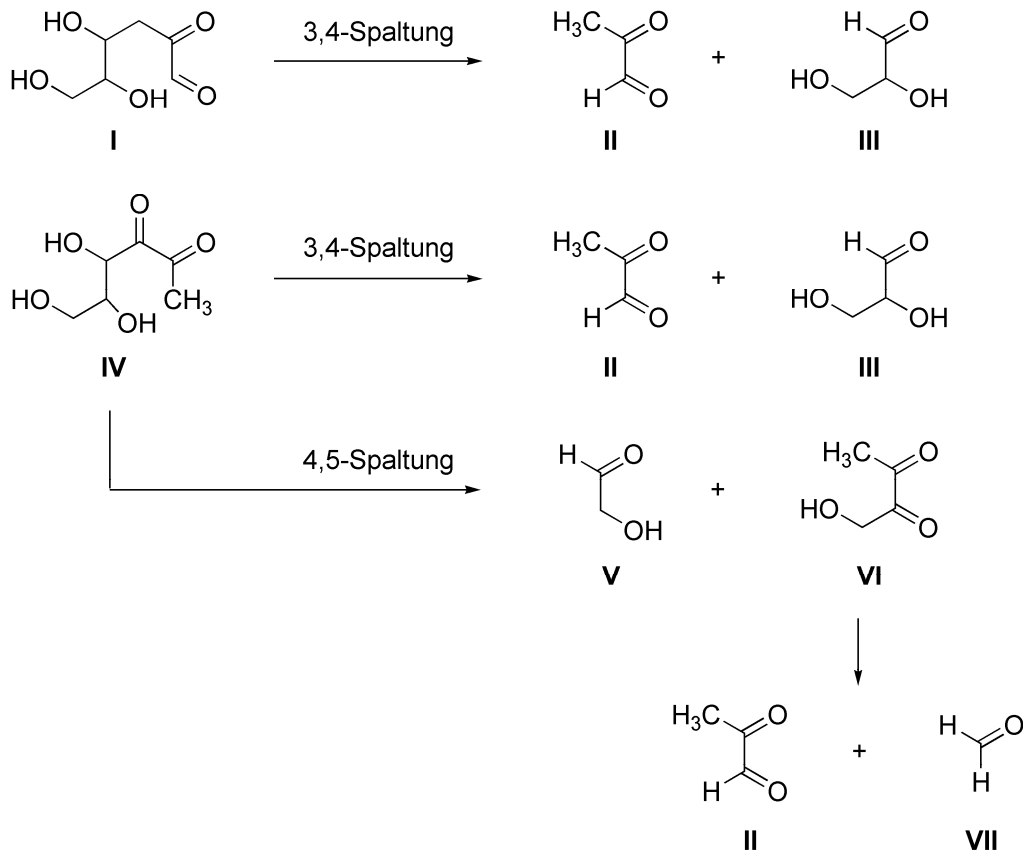


Abbildung 8. Bildung von Methylglyoxal (**II**) durch *retro-Aldol*-Reaktionen aus dem 3-Desoxyglucoson (**I**) und dem 1-Desoxyglucoson (**IV**).

Weitere alternative Bildungswege von Methylglyoxal (**II**, **Abbildung 8**) umfassen die Oxidation von Hydroxy-2-propanon^[51] oder die direkte Degradation der *Amadori*-Verbindung^[52].

Neben Methylglyoxal (**II**, **Abbildung 8**) spielt insbesondere das in der frühen Phase der *Maillard*-Reaktion gebildete Glyoxal (**IV**, **Abbildung 9**) als reaktives Intermediat eine bedeutsame Rolle für die folgenden Reaktionsabläufe im Zuge der nichtenzymatischen Bräunung. Dabei kann die Bildung (**Abbildung 9**) ausgehend von der Schiff'schen Base (**I**) erfolgen, die nach *retro-Aldol*-Reaktion ein Glycolaldehydimin (**II**) freisetzt, das anschließend zum Glyoxalmonoimin (**III**) oxidiert wird. Anschließende hydrolytische Spaltung des Amins resultiert in der Bildung von freiem Glyoxal (**IV**, **Abbildung 9**)^[53].

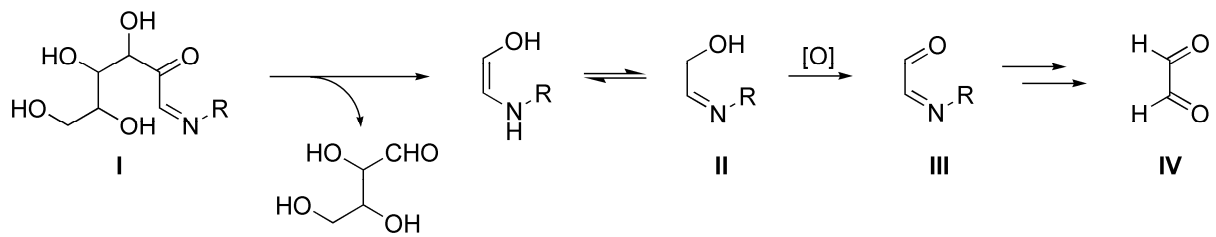


Abbildung 9. Bildung von Glyoxal (IV) ausgehend von der Schiff'schen Base (I) über das intermediäre Glycolaldehydimin (II) und dem nach Oxidation erhaltenen Glyoxalmonoimin (III).

Eine alternative Bildung von Glyoxal (IV) ist in **Abbildung 10** dargestellt. Dabei erfolgt eine Oxidation des Enaminols (I) zum Glucosonimin (II), das anschließend hydrolytisch desaminiert wird. Das resultierende Glucoson (III) setzt nach einer C(2)-C(3) Spaltung die α -Dicarbonylverbindung Glyoxal (IV) frei (**Abbildung 10**). Diese mechanistische Überlegung stellt eine Erklärung für die sauerstoffabhängige Bildung von Glyoxal (IV, **Abbildung 10**) im Zuge der frühen *Maillard*-Reaktion dar ^[54].

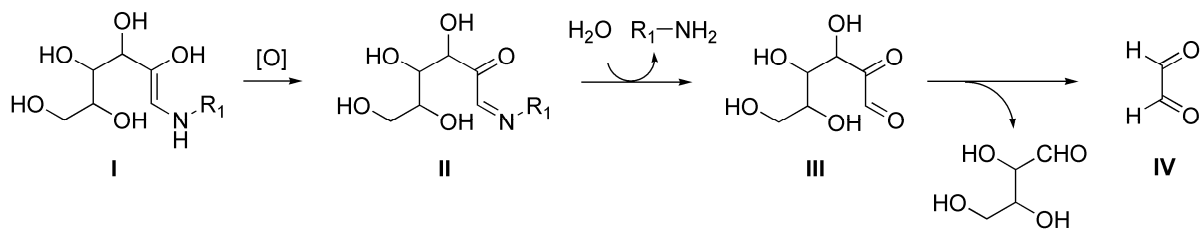


Abbildung 10. Bildung von Glyoxal (IV) ausgehend vom 1,2-Enaminol (I) über das intermediäre Glucoson (III) (nach Hofmann et al., 1999 ^[54]).

1.4.3 Geschmacksstoffe aus der *Maillard*-Reaktion

Während die fundamentale Bedeutung der *Maillard*-Reaktion im Rahmen der Bildung von Aromastoffen und Bräunungsprodukten bereits seit langem bekannt ist, sind die Kenntnisse zur Bildung oder prozessbedingten Veränderung von Lebensmittelgeschmacksstoffen vergleichsweise eingeschränkt. Ein Fokus liegt dabei auf der thermisch bedingten Ausbildung von Bitterkomponenten, die beim starken Erhitzen von Lebensmitteln wie z.B. Kaffee, Brot oder Fleisch auftreten.

Eine Vielzahl der Studien beschäftigte sich dabei mit der Untersuchung vereinfachter Modellsysteme, wobei sich die Aminosäure L-Prolin als potente Bitterstoffvorstufe erwies ^[55-57]. Dabei gelang es verschiedene Strukturen aus L-Prolin/Kohlenhydrat-Mischungen zu isolieren und strukturell zu charakterisieren ^[56-59]. Darüber hinaus beschäftigten sich einige Untersuchungen in den vergangenen Jahren mit der *Maillard*-Reaktion von L-Alanin mit Pentosen ebenfalls im Hinblick auf die Bildung von Bitterstoffen ^[60-62]. **Abbildung 11** zeigt ausgewählte *Maillard*-generierte Bitterstoffe, wobei die Verbindungen I-III aus Prolin-haltigen

Modellsystemen stammten, während **IV** aus einem Ansatz von L-Alanin und Xylose isoliert wurde.

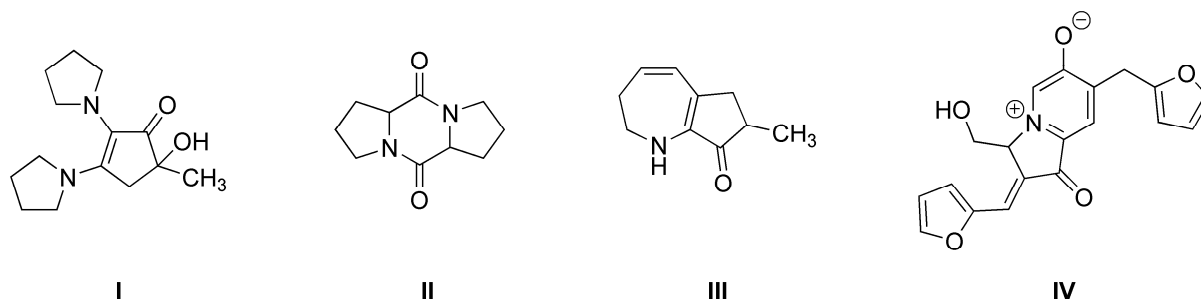


Abbildung 11. Strukturen der thermisch generierten Bitterstoffe Bispyrrolidinohexoseredukton (**I**), (2*S*,6*S*)-Octahydro-dipyrrolo[1,2- α ,1',2'- α']pyrazin-5,10-dion (**II**), 7-Methyl-2,3,6,7-tetrahydrocyclopenta[*b*]azepin-8(1*H*)-on (**III**) und 3-(2-Furyl)-8-[(2-furyl)-methyl]-4-hydroxymethyl-1-oxo-1*H*,4*H*-quinolizinium-7-olat (Quinizolat, **IV**).

In einer systematische Studie zu Geschmacksstoffen im Saft von geschmortem Rinderbraten konnten neben *N*-(1-Methyl-3-oxo-imidazolidin-2-yliden)-alanin (**I**, **Abbildung 12**) zusätzlich die strukturell verwandten Verbindungen *N*-(1-Methyl-3-oxo-imidazolidin-2-yliden)-glycin und *N*-(1-Methyl-3-oxo-imidazolidin-2-yliden)-2-amino-4,5,6-trihydroxyhexansäure (**II** und **III**, **Abbildung 12**) als bis dato unbekannte Geschmacksmodulatoren identifiziert werden ^[63]. Die Autoren beschrieben dabei den Geschmack der drei Substanzen als sauer und mundaustrocknend und zeigten weiterhin durch adäquate Modellexperimente, dass diese im Zuge der *Maillard*-Reaktion von Kreatinin mit Glukose gebildet werden ^[63].

In Rinderbrühe sowie in einer thermisch prozessierten Mischung von Glukose und L-Alanin gelang die Identifizierung des inneren *N*-(1-Carboxyethyl)-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-pyridiniumsalzes, das von den Entdeckern Alapyridain genannt wurde ^[64, 65]. Weiterführende Untersuchungen zeigten dabei, dass ausschließlich das (*S*)-Isomer (**IV**, **Abbildung 12**) einen sensorischen Effekt aufwies. Dieser bestand aus einer Erniedrigung der Geschmacksschwellen sowohl süßer ^[65, 66], als auch umami-artiger und salziger Stimuli ^[66].

Im Rahmen der Untersuchung einer thermisch behandelten Mischung aus Glukose und L-Prolin gelang es verschiedene Verbindungen mit einem physiologischen Kühleffekt, wie 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (**V**, **Abbildung 12**), zu isolieren ^[67]. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Verbindungen bei der Herstellung von Röstmalz gebildet wurden ^[67].

Auf der Suche nach umamigeschmacksaktiven Verbindungen aus der *Maillard*-Reaktion gelang es aus einem Gemisch von Glukose und L-Glutaminsäure das instabile *N*-(D-Glukos-1-yl)-L-glutamat zu isolieren, das unter sauren Bedingungen in das korrespondierende, vergleichsweise stabilere *Amadori*-Produkt *N*-(1-Desoxyfructos-1-yl)-L-glutamat umgelagert

wird (**VI**, **Abbildung 12**)^[68]. Sensorische Analysen zeigten, dass die Schwellenwerte für das *N*-Glykosylamin (1,6 mmol/L) und das *Amadori*-Produkt (1,8 mmol/L) vergleichbar mit dem der freien Aminosäure **1** (1,5 mmol/L) waren^[68].

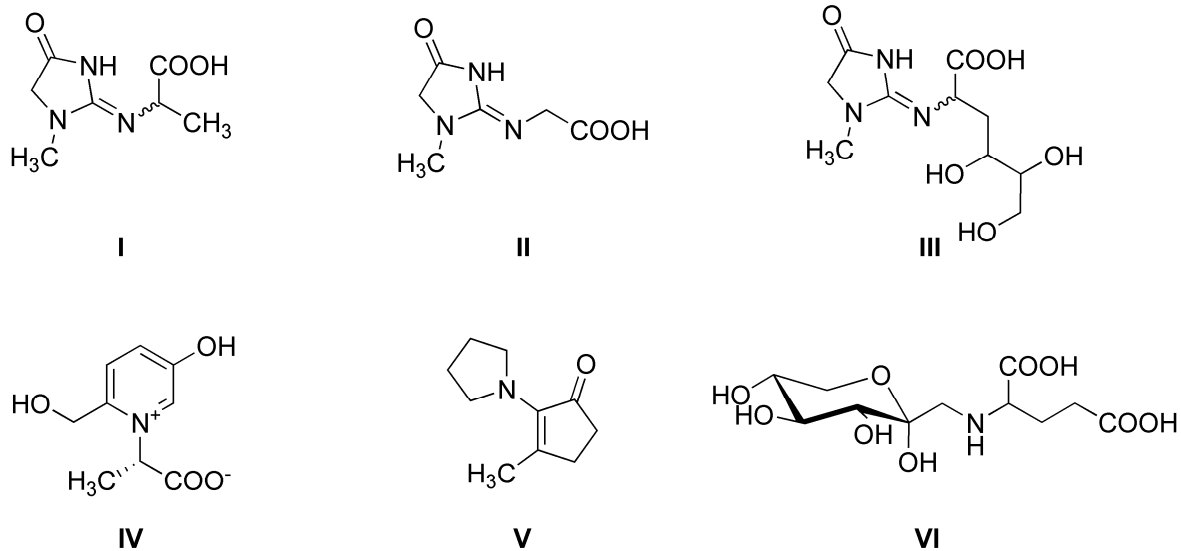


Abbildung 12. Strukturen der thermisch generierten Geschmacksmodulatoren *N*-(1-Methyl-3-oxoimidazolidin-2-yliden)-alanin (**I**), *N*-(1-Methyl-3-oxoimidazolidin-2-yliden)-glycin (**II**), *N*-(1-Methyl-3-oxoimidazolidin-2-yliden)-2-amino-4,5,6-trihydroxyhexansäure (**III**), (+)-*S*-1-(1-Carboxyethyl)-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-pyridinium inneres Salz (**IV**), der kühlenden Verbindung 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (**V**) und des Umamigeschmacksstoffes *N*-(1-Desoxyfructos-1-yl)-*L*-glutamat (**VI**).

Diese Beispiele veranschaulichen das Potential der *Maillard*-Reaktion neben Aromastoffen und Bräunungsprodukten auch Verbindungen zu generieren, die zum Geschmack thermisch prozessierter Lebensmittel beitragen können.

1.5 Geschmackswahrnehmung

Die Zunge stellt ein Schlüsselorgan für die Wahrnehmung des Geschmacks dar. Auf deren Oberfläche befinden sich die Geschmackspapillen, die optisch als kleine Erhebungen erkennbar sind. Diese beinhalten die an den Wänden und Gräben der Papillen lokalisierten Geschmacksknospen, die neben Basal- und Trägerzellen auch die Geschmackssinneszellen tragen und somit das eigentliche Sinnesorgan darstellen. Dabei weisen die Geschmackssinneszellen unterschiedliche Spezifitäten auf.

Bislang unterscheidet man in der menschlichen Geschmackswahrnehmung zwischen fünf Grundgeschmacksarten, für die spezifische, chemische Rezeptoren identifiziert werden konnten: süß, sauer, salzig, bitter und umami. Darüber hinaus existiert eine Reihe von

Sinneswahrnehmungen wie z.B. Schärfe oder Adstringenz, deren Detektion im gesamten Mundraum durch die Sinneszellen des *Nervus trigeminus* erfolgt.

Die Signaltransduktion der fünf Grundgeschmacksarten erfolgt auf verschiedenen Wegen, wobei eine grobe Unterteilung zwischen ionotroper- (sauer und salzig) und metabotroper Vermittlung (süß, bitter und umami) getroffen werden kann.

Die Vermittlung des Sauergeschmacks ist bisher noch unzureichend geklärt, allerdings existiert eine Vielzahl von potentiellen Rezeptorkandidaten. Dabei kann der Einstrom von Protonen in den intrazellulären Raum über z.B. $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Tauscher ^[69] erfolgen. In Geschmackszellen von Hamstern konnte darüber hinaus eine Beteiligung der epithelialen Natriumkanäle (ENaC) am Protonentransfer verifiziert werden ^[70]. Eine weitere Reihe von säuresensitiven Ionenkanälen bildet die Gruppe der ASICs (*acid-sensing ion channels*), deren Bedeutung bis heute nicht abschließend geklärt ist ^[71, 72]. Kürzlich wurde über Proteine der PKD (*polycystic kidney disease*)-Familie berichtet, die ebenfalls zur Mediation des Sauergeschmacks beitragen sollen ^[73]. Einer Vielzahl dieser Studien ist gemein, dass ein Forschungsschwerpunkt auf die Proteine zur Vermittlung der Protonen nach extrazellulärer Stimulation gesetzt wurde, wohingegen das eigentliche Aktivierungsziel vermutlich auf der intrazellulären Seite zu suchen ist ^[74].

Auch die Wahrnehmung des Salzgeschmacks ist bis heute nicht vollständig geklärt. Dabei erweist sich der amiloridsensitive *Epithelial Sodium Channel* (ENaC) als vielversprechender Kandidat, der in den Geschmacksknospen von Ratten identifiziert wurde ^[75, 76]. Weitere potentielle Rezeptorkandidaten stellen ein amiloridinsensitiver V1R-artiger Vanilloidrezeptor ^[77] sowie ein Cetylpyridiumchlorid-sensitiver (CPC) Kationenkanal dar ^[78].

Die Vermittlung der Geschmackseindrücke süß, bitter und umami erfolgt metabotrop über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Während die Rezeptoren für Süß- und Umamigeschmack zur hTAS1R-Familie gehören, existiert eine Vielzahl von hTAS2R-Rezeptoren die sich für die Wahrnehmung des Bittergeschmacks verantwortlich zeigen. Bisher sind etwa 25 GPCRs der hTAS2R-Rezeptorfamilie bekannt, die an der Detektion des Bittergeschmacks partizipieren ^[79-83]. Für eine Vielzahl der Rezeptoren gelang es Agonisten zu identifizieren, wobei es sich zumeist um toxische Alkaloide, Arzneimittel oder synthetische Bitterstoffe handelte, während erst in den letzten Jahren ein verstärktes Augenmerk auf lebensmittelrelevante Agonisten für verschiedenste hTAS2Rs gesetzt wurde ^[81, 84-93].

Die Wahrnehmung des Süßgeschmacks erfolgt mittels GPCRs der Klasse C. Dabei gelang es sowohl bei Nagetieren, als auch beim Menschen die heterodimere Kombination T1R2/T1R3 als universellen Süßrezeptor zu identifizieren ^[94, 95]. In den vergangenen Jahren wurden fundamentale Kenntnisse über die verschiedenen Bindungsstellen der strukturell stark divergierenden Agonisten gewonnen (*reviewed in Temussi, 2009* ^[96]). In Analogie zum Umamigeschmack gelang es jüngst positiv allosterische Modulatoren sowie einen

synergistischen Effekt am Rezeptor mit den daran beteiligten Bindungsstellen zu verifizieren [97, 98].

Während Süß, Bitter, Sauer und Salzig bereits seit langem als Grundgeschmacksarten anerkannt sind, dauerte es von der ersten Beschreibung des Umamigeschmacks [15] bis zur weltweiten Akzeptanz fast ein Jahrhundert. Einen entscheidenden Beitrag dazu leistete die Entdeckung eines spezifischen Aminosäurerezeptors im Jahre 2002 [94, 99]. Durch Expressionsstudien wurde gezeigt, dass die Proteine T1R1 und T1R3 einen funktionellen, heterodimeren Rezeptor für L-Aminosäuren bilden, wenn die Untereinheiten von Mäusen verwendet wurden [99]. Stammten diese allerdings vom Menschen so erwies sich der Rezeptor als spezifisch für L-Glutamat (1) [94]. Die T1R1-Untereinheit des Heterodimers erwies sich als Schlüsselement für die Interaktion mit dem L-Glutamat (1)-Molekül, was durch die Klonierung eines chimären Rezeptors, bestehend aus einer humanen T1R1 und einer Nager T1R3-Untereinheit und dessen Selektivität für diese Aminosäure gezeigt werden konnte [99]. Die Bindungsstellen des Agonisten wurden kürzlich erfolgreich identifiziert, wobei diese sich in der *venus flytrap* Domäne des Rezeptors befinden [100].

Schematisch besteht diese Dömane aus einem oberen und unteren Lappen, die an einem flexiblen Scharnier miteinander verbunden sind (**Abbildung 13**). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des T1R1 und des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem das L-Glutamat (1)-Molekül nahe der Scharnierregion bindet und ein Schließen der *venus flytrap* Domäne bewirkt, was zur Rezeptoraktivierung führt (**Abbildung 13**) [100].

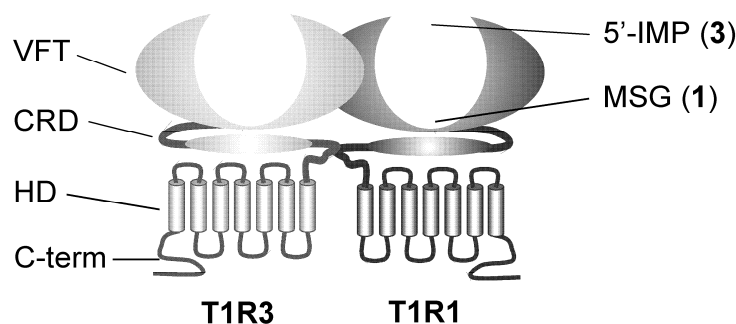


Abbildung 13. Schematische Darstellung des G-Protein-gekoppelten Umamirezeptors T1R1/T1R3. Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen extrazellulären *venus flytrap* Domäne (VFT), welche über die Cystein-reiche Domäne (CRD) mit der heptahelikalen Domäne (HD) verbunden ist sowie einem intrazellulären C-Terminus (C-term). Die Bindung des Agonisten Mononatrium-L-Glutamat (MSG, 1) erfolgt nahe der VFT-Scharnierregion der T1R1-Einheit. Geschmacksverstärkende Nukleotide wie Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP, 3) bewirken eine Fixierung der geschlossenen aktiven Konformation des Rezeptors. Grafik mit freundlicher Genehmigung von Dr. Anne Brockhoff, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke.

Darüber hinaus weist der heterodimere T1R1/T1R3 Rezeptor ein weiteres typisches Charakteristikum des Umamigeschmacks auf, nämlich die synergistische Verstärkung des Glutamat-*Response* in der Gegenwart der Purin-5'-ribonukleotide 5'-GMP (**2**) bzw. 5'-IMP (**3**) [20, 100]. Molekularbiologische Untersuchungen deuteten dabei auf ein kooperatives Ligandenbindungsmodell hin, in dem **3** die geschlossene, aktive Konformation des Rezeptors bei Anregung durch L-Glutamat stabilisiert (**Abbildung 13**) [100]. Damit gilt das Dimer T1R1/T1R3 nach derzeitigem Wissensstand als generell akzeptierter Umamirezeptor.

1.6 Analytik von Geschmacksstoffen

Um einen Geschmacksstoff aus einer komplexen Matrix zu isolieren sowie strukturell und sensorisch zu charakterisieren bedarf es der Anwendung präparativer, analytischer sowie humansensorischer Techniken. Um die Bedeutung einzelner Geschmacksstoffe für den Gesamtgeschmack eines Lebensmittels zu bestimmen, wurde von *Warmke et al. (1996)* der Geschmacksaktivitätswert entwickelt [101]. Dieser berechnet sich in Anlehnung an den Aromawert [102] als Quotient aus der Konzentration des Geschmacksstoffes und der zugehörigen Geschmacksschwelle, die für die chemische Reinsubstanz in einer adäquaten sensorischen Matrix bestimmt wird [101].

Allerdings stellt eine ausschließliche Beurteilung des Geschmacksbeitrages der individuellen Verbindungen auf Basis des Geschmacksaktivitätswertes eine starke Vereinfachung dar, da dieser weder additive noch synergistische Effekte sowie Interaktionen mit der komplexen Lebensmittelmatrix berücksichtigt. Weiterhin ist weder von einem strikt linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Geschmacksintensität auszugehen, noch eine Interaktion zwischen einzelnen Geschmacksstoffen auszuschließen. Darum führten *Scharbert und Hofmann (2005)* den sogenannten *Dose-over-Threshold* (DoT)-Faktor als wertneutralen Begriff ein, der ausschließlich ein Maß darstellt um den eine Verbindung über deren Schwellenwert im Lebensmittel präsent ist [103].

$$\text{Dose-over-Threshold (DoT) [-]} = \frac{\text{Konzentration des Geschmacksstoffs}}{\text{Schwellenwert des Geschmacksstoffs}}$$

Beiden Konzepten ist gemein, dass diese nur auf Verbindungen anwendbar sind, die bereits als Geschmacksstoffe zuvor identifiziert wurden. Um allerdings in der komplexen Lebensmittelmatrix bislang unbekannte Verbindungen zu charakterisieren bedarf es eines aktivitätsorientierten Fraktionierungsansatzes.

Zu diesem Zwecke wurde die Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) entwickelt, welche eine Kombination präparativer Trennoperationen und humansensorischer Techniken darstellt [62]. Dazu wird ein Extrakt, der aus dem zu untersuchenden Lebensmittel oder

Modellreaktionsansatz gewonnen wird, mittels chromatographischer Trennung (z.B. Gelpermeations- oder Hochleistungsflüssigchromatographie) in einzelne Subfraktionen separiert. Diese werden anschließend von Lösungsmitteln befreit, lyophilisiert und nach Lösen in Wasser schrittweise verdünnt. Die Verdünnungen werden sensorisch gegen das reine Solvens evaluiert und der Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) bestimmt. Dieser ist definiert als der Verdünnungsfaktor, bei dem ein sensorischer Unterschied zwischen gelöster Probe und reinem Lösungsmittel gerade noch detektiert wird ^[62]. Da alle Fraktionen in ihren natürlichen Konzentrationen untersucht werden erlaubt der Vergleich der GV-Faktoren die Gewichtung des Beitrags individueller Fraktionen zum Gesamtgeschmack des untersuchten Lebensmittelextraktes. Die darauf folgende Isolierung und Strukturaufklärung sowie eventuelle Entwicklung quantitativer Methoden wird anschließend auf die identifizierten geschmacksaktiven Fraktionen und die darin enthaltenen Substanzen fokussiert. Durch erfolgreiche Anwendung der GVA ergab sich in den letzten Jahren die strukturelle Charakterisierung einer Reihe von bis dato unbekanntem Geschmacksstoffen bzw. -modulatoren ^[16, 62, 65, 67, 104-106].

Um nach der Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Schlüsselgeschmacksstoffe zu überprüfen ob alle relevanten Substanzen erfasst wurden, werden im letzten Schritt Rekombinations- und Omissionsexperimente durchgeführt ^[101, 107, 108]. Dazu wird ein biomimetisches Rekombinat erstellt, das alle im Ausgangslebensmittel quantifizierten Geschmacksstoffe in deren natürlichen Konzentrationen enthält. Die sensorischen Eigenschaften dieses Geschmacksstoffgemisches werden anschließend mit dem Geschmacksprofil des authentischen Lebensmittels verglichen. Eine Übereinstimmung der ermittelten Daten deutet darauf hin, dass alle Schlüsselgeschmacksstoffe erfolgreich bestimmt wurden. Durch das sukzessive Weglassen einzelner Substanzen oder Substanzgruppen kann in folgenden Omissionsexperimenten deren individueller Beitrag zum Geschmack des Lebensmittels geklärt werden. Dies dient weiterhin dazu synergistische und additive Effekte aufzudecken, da gegebenenfalls auch das Weglassen von Substanzen mit einem DoT-Faktor < 1 einen signifikanten Einfluss auf das sensorische Profil haben kann. Mit Hilfe dieses Ansatzes gelang es in den vergangenen Jahren erfolgreich die Schlüsselgeschmacksstoffe in einer Vielzahl von Lebensmitteln, unter anderem schwarzem Tee ^[103], Morcheln ^[17], Rotwein ^[109] oder Gouda Käse ^[110] zu identifizieren.

In der Literatur werden darüber hinaus vermehrt rezeptorbasierte Messungen genutzt, um einerseits neuartige geschmacksaktive Substanzen in *high throughput screenings* zu identifizieren ^[98, 100] und andererseits Agonisten für bisher orphanen Rezeptoren zu finden ^[87, 89]. Darüber hinaus bietet die Kombination von humansensorischen Untersuchungen mit *in vitro* Messungen die Möglichkeit Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu evaluieren sowie diese auf molekulare Ebene zu klären. So wurde gezeigt, dass im Falle ausgewählter

Bierbitterstoffe die Absorption an die orale Mucosa zu einer Reduktion der Verfügbarkeit des Agonisten am Rezeptor führt ^[89].

2 Problemstellung und Zielsetzung

Aufgrund ihrer sensorischen Eigenschaften werden Hefeextrakte in einer Vielzahl von kommerziell erhältlichen Lebensmitteln eingesetzt.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es ein tieferes Verständnis über geschmacksaktive Verbindungen in Hefeextrakten zu gewinnen sowie deren Bildungswege zu studieren. Dabei besteht die Möglichkeit, dass diese als Metabolite während des enzymatischen Verdaus des Hefezellmaterials entstehen oder im Zuge der *Maillard*-Reaktion während des thermischen Prozessierens des Rohproduktes gebildet werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollen daher die in Hefeextrakten beschriebenen, sensorisch aktiven Verbindungen quantitativ erfasst werden. Dabei werden zwei auf unterschiedliche Weise hergestellte Hefeextrakte vergleichend untersucht, um den Einfluss der Herstellungsverfahren sowohl auf die sensorischen Attribute als auch die Komposition und Konzentration der Sensometabolite zu bestimmen. Auf Basis der quantitativen Resultate sollen Rekombinate erstellt werden, um zu überprüfen inwiefern die Schlüsselgeschmacksstoffe bereits erfasst wurden oder ob zusätzlich bislang unbekannte Verbindungen einen entscheidenden Beitrag zum orosensorischen Profil der Hefeprodukte leisten.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein nukleotidreicher Hefeextrakt unter Anwendung eines aktivitätsorientierten Fraktionierungsansatzes auf die Präsenz bislang unbekannter geschmacksmodulierender Verbindungen untersucht werden. Die isolierten Verbindungen sollen strukturell sowie humansensorisch charakterisiert und anschließend mögliche Bildungswege der identifizierten Verbindungen untersucht werden.

Im letzten Teil soll die *Maillard*-Reaktion von Nukleotiden genauer beleuchtet werden, da diese als wertgebende Bestandteile von Hefeextrakten seit langem bekannt sind. Unter Verwendung entsprechender Modellsysteme sollen Transformationsprodukte generiert und diese nach erfolgreicher Isolierung in ihrer Struktur sowie in ihren sensorischen Eigenschaften untersucht werden. Vielversprechende Kandidaten sollen zudem mittels eines zellbasierten Rezeptorassays analysiert werden, um die humansensorischen Daten zu verifizieren.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Geschmacksaktive Verbindungen in Hefeextrakten

Die Untersuchungen wurden an einem Hefeextrakt durchgeführt, der durch Zugabe eines Malzkeimlingsextraktes mit aktiver Phosphodiesterase hergestellt wurde (Hefeextrakt 2). Als Referenzmaterial diente ein zweiter Hefeextrakt, der mittels Autolyse durch hefeeigene Enzyme hergestellt wurde (Hefeextrakt 1).

Um erste Einblicke in die geschmacklichen Eigenschaften der Hefeextrakte 1 und 2 zu erlangen, wurden diese in Wasser gelöst (1 g/100 mL, pH 6,0) und einer Geschmacksprofilanalyse unterzogen. Dazu wurden die Geschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, bitter, umami und adstringierend auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet. Die Daten der sensorischen Evaluationen sind in **Abbildung 14** dargestellt.

Hefeextrakt 1 (**Abbildung 14, A**) zeichnete sich neben einer dominierenden Umaminote (1,7) durch einen süßen und salzigen Geschmack aus, der von den Panelisten äquivalent bewertet wurde (1,0). Säure und Bitterkeit wurden nur marginal wahrgenommen (0,5), Adstringenz war nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu wies Hefeextrakt 2 (**Abbildung 14, B**) eine deutlich ausgeprägtere Umamiintensität (3,4) auf. Ebenso wurde die Salzigkeit und Süße höher als bei Hefeextrakt 1 bewertet, wobei diese Geschmacksempfindungen gleiche Intensitätsbewertungen (1,5) erhielten. Säure (0,5) und Bitterkeit (0,7) wurden nur mäßig ausgeprägt wahrgenommen, eine Adstringenz war nicht zu beobachten.

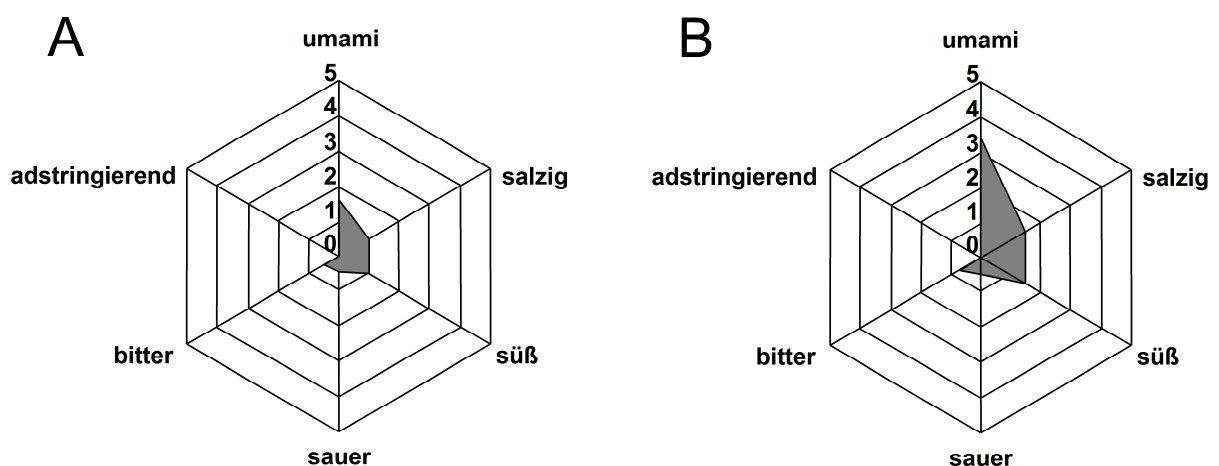


Abbildung 14. Geschmacksprofile wässriger Lösungen (1 g/100 mL, pH 6,0) von Hefeextrakt 1 (**A**) und Hefeextrakt 2 (**B**).

3.1.1 Quantifizierung der Basisgeschmacksstoffe und Bestimmung der *Dose-over-Threshold (DoT)*-Faktoren

Um den sensorisch beobachteten, ausgeprägten Unterschied in den Umamiintensitäten auf molekularer Ebene zu klären sollten zunächst die in der Literatur beschriebenen Geschmacksstoffe in beiden Hefeextrakten mittels diverser analytischer Methoden identifiziert und quantifiziert werden (**Abbildung 15**).

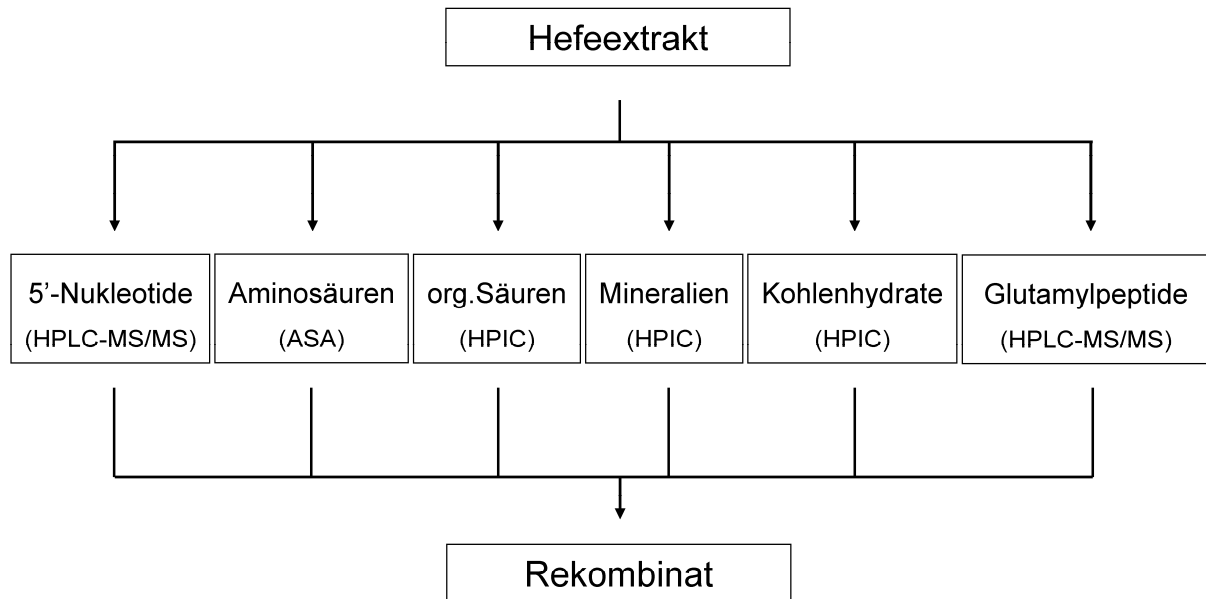


Abbildung 15. Schematische Darstellung der verwendeten Methodiken zur Quantifizierung der Basisgeschmacksstoffe zur Erstellung eines Hefeextraktrekombinates.

Die Quantifizierung der 5'-Nukleotide erfolgte mittels hydrophiler Interaktionsflüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (HILIC-MS/MS) im *multiple reaction monitoring* (MRM)-Modus (**Abbildung 16**). Dieses selektive Detektionsverfahren wurde gewählt da vorherige Untersuchungen zeigten, dass die Gehalte in den zu untersuchenden Hefeextrakten vergleichsweise gering waren. Während in Hefeextrakt 1 ausschließlich Spuren einiger 5'-Nukleotide detektiert werden konnten, wies Hefeextrakt 2 im Schnitt höhere Gehalte auf. Einige Nukleotide, insbesondere das geschmacksverstärkende Guanosin-5'-monophosphat (5'-GMP, **2**) war ausschließlich in Hefeextrakt 2 detektierbar (**Tabelle 1**).

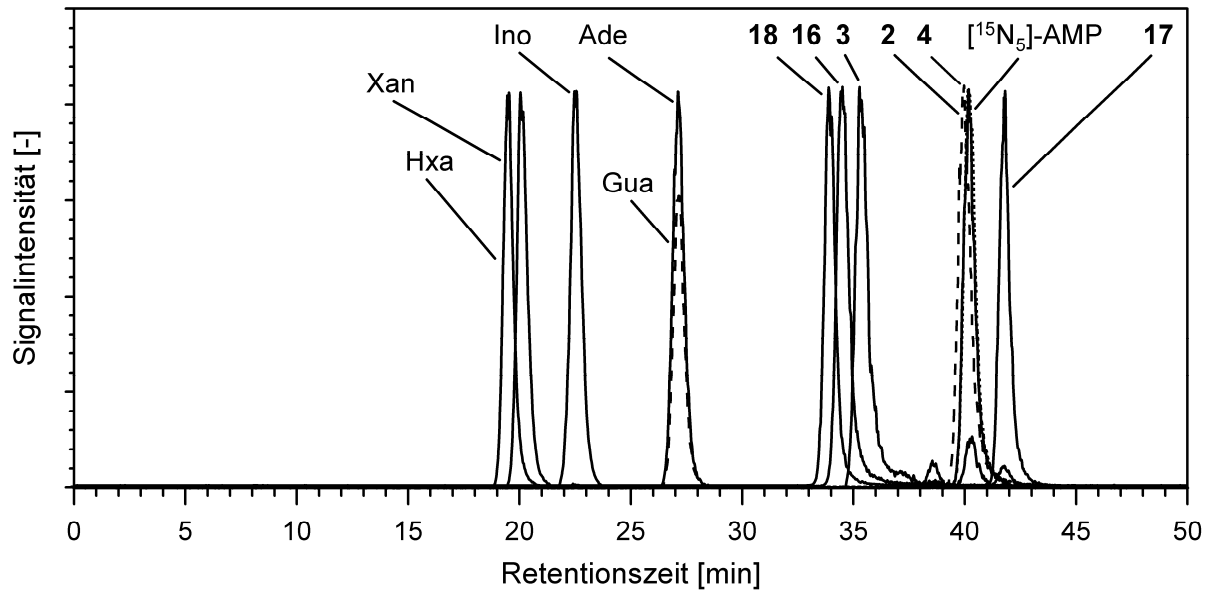


Abbildung 16. Ausschnitt aus der HILIC-MS/MS (MRM, ESI⁻) Analyse einer Standardlösung zur Quantifizierung der 5'-Nukleotide, Nucleoside sowie ausgewählter Derivate (Hxa: Hypoxanthin; Xan: Xanthin; Ino: Inosin; Gua: Guanosin; Ade: Adenosin; **18**: zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat; **16**: Uridin-5'-monophosphat; **3**: Inosin-5'-monophosphat; **2**: Guanosin-5'-monophosphat; **4**: Adenosin-5'-monophosphat; [¹⁵N₅]-AMP: [¹⁵N₅]-Adenosin-5'-monophosphat; **17**: Cytidin-5'-monophosphat). Die Signalintensität jedes Massenübergangs ist normalisiert.

Die freien Aminosäuren wurden mittels Aminosäureanalysator (ASA) quantitativ erfasst und stellen mengenmäßig eine Hauptgruppe der Hefeextraktbestandteile dar. Dabei wurden im Falle von Hefeextrakt 1 in Summe 34 % freie Aminosäuren bestimmt, während der Gesamtgehalt für Hefeextrakt 2 bei 26 % lag. Interessanterweise wies Hefeextrakt 1 trotz seines weniger ausgeprägten Umamigeschmacks höhere Gehalte an den aziden Aminosäuren L-Asparagin- und L-Glutaminsäure auf (**Tabelle 1**). Das Verteilungsprofil der individuellen Aminosäuren war in beiden Fällen sehr ähnlich, wobei L-Glutaminsäure (**1**) und L-Alanin die höchsten Werte zeigten (**Tabelle 1**).

Die Quantifizierung der organischen Säuren mittels Hochleistungsionenchromatographie (HPIC) ergab nahezu identische Werte für beide Hefeextraktprodukte, wobei die ermittelten Gehalte insgesamt sehr niedrig waren. Die umamischmeckende Dicarbonsäure Bernsteinsäure wurde in beiden Extrakten mit Werten zwischen 40-50 mmol/kg detektiert (**Tabelle 1**).

Die Gehalte an Mineralstoffen, die ebenfalls zu einer der mengenmäßig dominierenden Gruppen in den untersuchten Proben gehörten, waren in beiden Produkten ausgesprochen ähnlich, wobei Natrium bei den Kationen und Chlorid bei den Anionen in beiden Fällen dominierten (**Tabelle 1**). Weiterhin wurden vergleichsweise hohe Gehalte an Kalium und Phosphat bestimmt (**Tabelle 1**).

Die Kohlenhydrate stellen Minorkomponenten in den Extrakten dar, was eine möglichst empfindliche Quantifizierungsmethode notwendig machte, weshalb die HPIC als Methode der Wahl verwendet wurde. Die Quantifizierung zeigte in beiden Produkten das Vorhandensein niedriger Gehalte von Glukose sowie dem Polyol Glycerin (**Tabelle 1**).

Die jüngst als geschmacksmodulierend identifizierten γ -Glutamylpeptide^[104, 111] zeichnen sich weniger durch einen intrinsischen Geschmack aus, als vielmehr durch ihren modulierenden Einfluss auf das Gesamtgeschmacksprofil. Dieser so genannte Kokumigeschmack^[112] wird insbesondere durch γ -Glutamylpeptide wie z.B. Glutathion^[113] hervorgerufen. Die Quantifizierung erfolgte mittels HILIC-MS/MS um eine möglichst sensitive Bestimmung zu gewährleisten (**Abbildung 17**). Ebenfalls wurden ausgewählte α -Glutamylpeptide mitbestimmt für die in der Literatur zum Teil ein Umamigeschmackseindruck beschrieben wurde. Die Quantifizierung von Glutathion erfolgte nach vorheriger Derivatisierung mit *N*-Methyl-4-vinylpyridinium ebenfalls mittels HPLC-MS/MS.

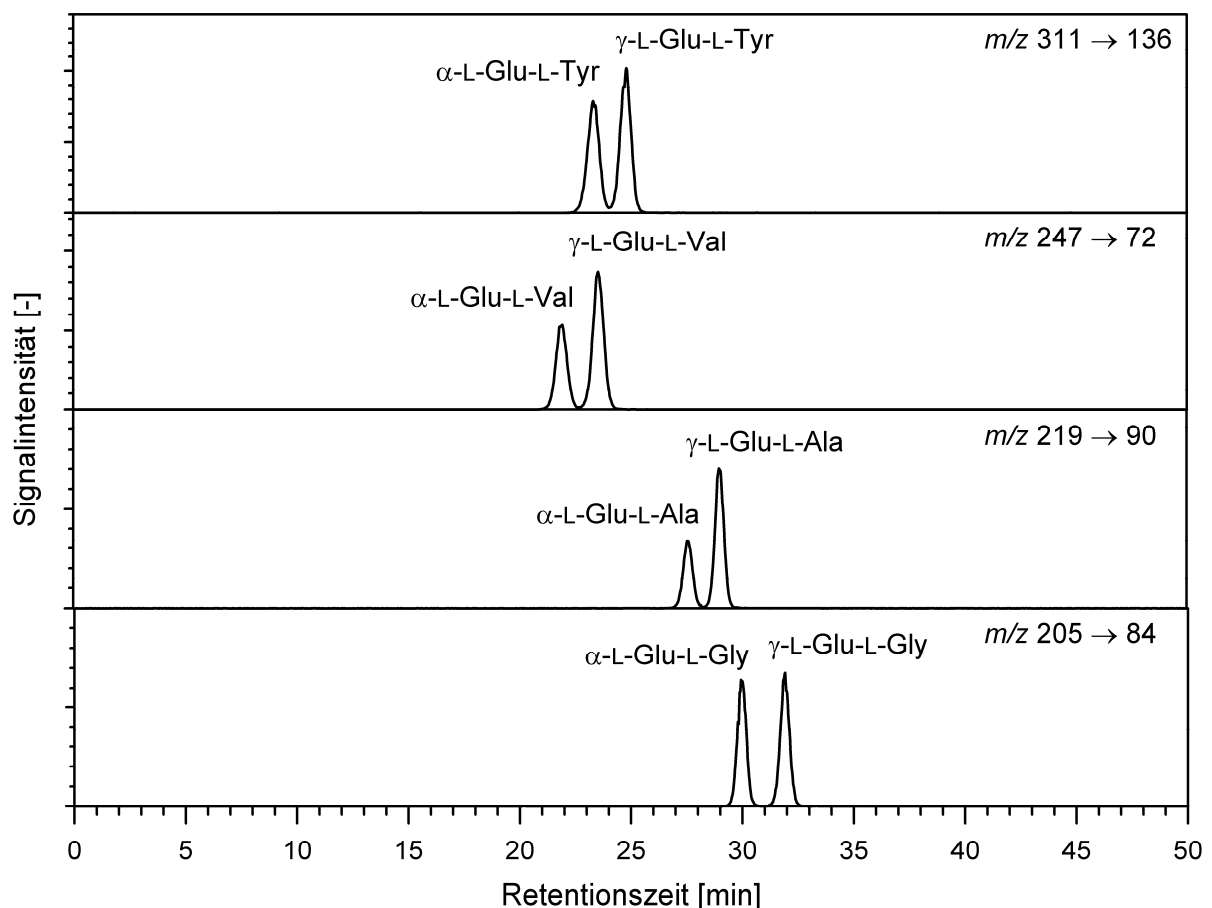


Abbildung 17. Ausgesuchte Massenübergänge aus der HILIC-MS/MS (MRM, ESI) Analyse einer Standardlösung zur Quantifizierung der L-Glutamylpeptide.

Dabei wurden insgesamt in Hefeextrakt 1 vier, in Hefeextrakt 2 acht α -Glutamylpeptide bestimmt (**Tabelle 1**). Allerdings waren deren Gehalte derart niedrig, dass ein Einfluss auf das Geschmacksprofil zu vernachlässigen schien. Im Falle der γ -Glutamylpeptide stellte γ -Glutamylglutamin in beiden Fällen die Hauptverbindung dar (**Tabelle 1**). Weiterhin konnten in beiden Extrakten sechs weitere γ -Glutamylpeptide quantifiziert werden, wobei generell die höheren Gehalte in Hefeextrakt 1 detektierbar waren (**Tabelle 1**).

Um eine erste Gewichtung der Einzelverbindungen zu erzielen, wurden die *Dose-over-Threshold* (DoT)-Faktoren der quantifizierten Basisgeschmacksstoffe als der Quotient der Konzentration und des Schwellenwerts einer Verbindung bestimmt. Dies ermöglichte eine erste Abschätzung der Bedeutung einzelner Verbindungen zum Geschmacksprofil, da ein DoT-Faktor > 1 einen Beitrag zum Geschmack nahe legt.

Tabelle 1 zeigt die ermittelten Gehalte der identifizierten Geschmacksstoffe in beiden Hefeextrakten und die daraus errechneten DoT-Faktoren, wobei die Substanzen nach ihrem Geschmack in verschiedene Gruppen eingeteilt wurden.

Die Bestimmung der DoT-Faktoren zeigte für die umami-artig schmeckenden Verbindungen den bedeutsamen Einfluss der L-Glutaminsäure, deren DoT-Faktoren > 1 in den beiden untersuchten Produkten darauf hindeuteten, dass diese einen entscheidenden Beitrag zum Geschmack beider Hefeextrakte leistet. Interessanterweise zeigte Hefeextrakt 1 höhere Gehalte und somit auch höhere DoT-Faktoren für die aziden Aminosäuren, obwohl dieser in den sensorischen Voruntersuchungen mit einer geringeren Umamiintensität bewertet wurde. Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, dass diese Substanzen nicht alleine ursächlich für die in den humansensorischen Experimenten festgestellten Differenzen im Umamigeschmack der untersuchten Produkte waren. Alle anderen Substanzen dieser Gruppe wiesen DoT-Faktoren < 1 auf. Da allerdings dieses Konzept ungeeignet für Substanzen ist, die ein additives oder synergistisches Verhalten zeigen, war ein Beitrag der 5'-Nukleotide, bekannt für ihren ausgeprägten Synergismus in Gegenwart von MSG (1), nicht endgültig auszuschließen und musste durch folgende Rekombinationsexperimente geprüft werden.

In der Gruppe der süßschmeckenden Verbindungen wurde keine Substanz mit einem DoT-Faktor > 1 quantifiziert. Lediglich L-Alanin wies in beiden Extrakten einen Faktor $> 0,1$ auf.

Innerhalb der Gruppe der bitteren Substanzen konnten insgesamt 14 Verbindungen identifiziert und quantifiziert werden, die entweder zu den Aminosäuren oder Purinalkaloiden gehörten. Durchgehend wurden DoT-Faktoren $< 0,1$ bestimmt, was gut mit den sensorischen Daten übereinstimmte, da in beiden Fällen ausschließlich eine marginale Bitterkeit verzeichnet wurde. Rein mengenmäßig dominierend zeigten sich innerhalb dieser Gruppe die Aminosäuren L-Leucin und L-Valin.

Erste sensorische Untersuchungen zeigten, dass neben dem Umamigeschmack insbesondere der Salzgeschmack für die Geschmacksprofile der beiden Hefeprodukte von Relevanz war. Innerhalb dieser Gruppe bestätigte sich der herausragende Beitrag von Natrium und Chlorid, die mit Abstand die höchsten DoT-Faktoren aufwiesen. Weiterhin zeigten Kalium, Ammonium und Phosphat DoT-Werte $> 0,1$, während Calcium und Magnesium in den geringsten Mengen detektiert und DoT-Werte $< 0,1$ errechnet wurden. Die leicht erhöhten Werte von Hefeextrakt 2 deckten sich gut mit den sensorischen Voruntersuchungen, in denen dieser als stärker salzig bewertet wurde.

In der Gruppe der sauren Verbindungen erwiesen sich Essigsäure sowie die Bernsteinsäure, die ebenfalls einen Umamigeschmack aufweist, als mengenmäßig dominierend. Deren Gehalte überschritten allerdings beide die Geschmacksschwellenwertkonzentration nicht und wiesen somit DoT-Faktoren < 1 auf. Milch- und Zitronensäure wurden in äußerst niedrigen Konzentrationen quantifiziert und blieben mit DoT-Faktoren $< 0,1$ weit unterhalb ihrer entsprechenden Schwellenwerte.

Nur in Spuren wurden α - sowie γ -Glutamylpeptide nachgewiesen. Trotz ihrer DoT-Faktoren $< 0,1$ war ein Geschmacksbeitrag der γ -Verbindungen jedoch nicht auszuschließen, da frühere Studien zeigten, dass diese Substanzen in komplexen Matrices bereits eine Aktivität weit unterhalb ihres Schwellenwertes in wässriger Lösung aufwiesen ^[104, 111].

Tabelle 1. Konzentrationen, Schwellenwerte und ermittelte *Dose-over-Threshold* (DoT)-Faktoren der identifizierten, geschmacksaktiven Verbindungen in Hefeextrakten

Verbindung	Hefeextrakt 1 ^a		Hefeextrakt 2 ^a		Schwellenwert ^b [mmol/L]
	[mmol/L]	DoT	[mmol/L]	DoT	
Gruppe I: umami-artige Verbindungen					
L-Glu	4,08	3,7	3,20	2,9	1,1 ¹
L-Asp	1,44	0,5	0,79	0,3	4,0 ²
5'-GMP (2)	n.d. ^c	---	0,02	0,1	0,3 ³
5'-IMP (3)	$< 0,01$	0,1	n.d. ^c	---	5,0 ⁴
5'-AMP (4)	$< 0,01$	$< 0,1$	0,04	$< 0,1$	4,0 ²
5'-XMP (5)	0,01	$< 0,1$	$< 0,01$	0,1	35,0 ⁴
5'-UMP (16)	$< 0,01$	$< 0,1$	0,02	$< 0,1$	17,0 ⁴
5'-CMP (17)	n.d. ^c	---	0,01	0,1	40,0 ⁴
α -Glu-Glu	n.d. ^c	---	0,42	$< 0,1$	2,5 ⁶
Gruppe II: süße Verbindungen					
L-Ala	3,50	0,4	3,42	0,4	8,0 ⁴

Verbindung	Hefeextrakt 1 ^a		Hefeextrakt 2 ^a		Schwellenwert ^b
	[mmol/L]	DoT	[mmol/L]	DoT	[mmol/L]
Gly	1,67	< 0,1	1,07	< 0,1	25,0 ⁴
L-Ser	1,90	< 0,1	1,34	< 0,1	30,0 ⁴
L-Thr	2,35	< 0,1	1,74	< 0,1	40,0 ⁴
L-Pro	0,73	< 0,1	0,53	< 0,1	26,0 ⁴
L-Met	0,50	< 0,1	0,42	< 0,1	5,0 ⁴
Glycerin	0,08	< 0,1	0,64	< 0,1	81,0 ⁵
Glucose	0,82	< 0,1	0,59	< 0,1	18,0 ⁵
Gruppe III: bittere Verbindungen					
L-Phe	1,20	< 0,1	0,92	< 0,1	58,0 ⁴
L-Tyr	0,16	< 0,1	0,16	< 0,1	5,0 ⁴
L-Leu	2,55	< 0,1	2,02	< 0,1	12,0 ⁴
L-Ile	1,45	< 0,1	1,04	< 0,1	11,0 ⁴
L-His	0,68	< 0,1	0,45	< 0,1	48,0 ⁴
L-Arg	0,86	< 0,1	0,53	< 0,1	75,0 ⁴
L-Val	1,95	< 0,1	1,57	< 0,1	35,0 ⁴
L-Lys	1,22	< 0,1	0,70	< 0,1	85,0 ⁴
Xanthin	0,11	< 0,1	0,07	< 0,1	60,0 ⁴
Hypoxanthin	0,01	< 0,1	0,03	< 0,1	44,0 ⁴
Inosin	0,01	< 0,1	0,01	< 0,1	96,0 ⁴
Adenosin	0,26	< 0,1	0,16	< 0,1	77,0 ⁴
Guanosin	0,04	< 0,1	0,03	< 0,1	63,0 ⁴
3'-5'-cAMP (18)	< 0,01	< 0,1	0,03	< 0,1	100,0 ⁴
Gruppe IV: salzige Verbindungen					
Natrium	35,0	9,0	37,6	9,6	3,9 ¹
Kalium	7,04	0,5	8,06	0,6	13,0 ¹
Ammonium	1,08	0,2	1,11	0,2	5,0 ⁴
Calcium	0,42	< 0,1	0,43	< 0,1	7,5 ⁴
Magnesium	0,42	< 0,1	0,32	< 0,1	4,0 ⁴
Chlorid	32,2	8,3	34,3	8,8	3,9 ¹
Phosphat	3,98	0,8	3,25	0,7	5,0 ¹

Verbindung	Hefeextrakt 1 ^a		Hefeextrakt 2 ^a		Schwellenwert ^b
	[mmol/L]	DoT	[mmol/L]	DoT	[mmol/L]
Gruppe V: saure Verbindungen					
Essigsäure	1,10	0,6	0,97	0,5	2,0 ⁴
Bernsteinsäure	0,41	0,5	0,50	0,6	0,9 ⁴
Zitronensäure	0,16	< 0,1	n.d. ^c	---	2,6 ⁴
Milchsäure	0,14	< 0,1	0,28	< 0,1	14,0 ⁴
Gruppe VI: kokumi-aktive Verbindungen					
γ-Glu-Leu	0,03	< 0,1	0,02	< 0,1	9,4 ^{6,d}
γ-Glu-Val	0,03	< 0,1	0,02	< 0,1	3,3 ^{6,d}
γ-Glu-Ala	< 0,01	< 0,1	< 0,01	< 0,1	0,9 ^{6,d}
γ-Glu-Lys	< 0,01	---	< 0,01	---	n.b. ^e
γ-Glu-Gln	0,09	< 0,1	0,07	< 0,1	2,5 ^{6,d}
γ-Glu-Phe	0,08	< 0,1	0,05	< 0,1	2,5 ^{6,d}
Glutathion	0,04	---	0,04	---	n.b. ^e
Gruppe VII: sonstige Verbindungen					
α-Glu-Ala	n.d. ^c	---	< 0,01	< 0,1	10,0 ^{6,d}
α-Glu-Thr	< 0,01	< 0,1	< 0,01	< 0,1	6,6 ^{6,d}
α-Glu-Val	n.d. ^c	---	< 0,01	< 0,1	5,0 ^{6,d}
α-Glu-Asp	0,01	< 0,1	< 0,01	< 0,1	1,3 ^{6,d}
α-Glu-Trp	n.d. ^c	---	< 0,01	< 0,1	5,0 ^{6,d}
α-Glu-Gly	< 0,01	< 0,1	< 0,01	< 0,1	2,5 ^{6,d}
α-Glu-Lys	< 0,01	---	< 0,01	---	n.b. ^e

^a Konzentrationen und DoT-Faktoren berechnet für Hefeextraktlösungen (1 g/100 mL).

^b Schwellenwerte in wässrigen Lösungen wurden den folgenden Literaturstellen entnommen:

¹ Toelstede und Hofmann, 2008 ^[110]; ² Rotzoll et al., 2005 ^[17]; ³ Kaneko et al., 2006 ^[114]; ⁴ Dunkel und Hofmann, 2009 ^[16]; ⁵ Hufnagel und Hofmann, 2008 ^[109]; ⁶ Toelstede et al., 2009 ^[111].

^c nicht detektierbar. ^d Schwellenwert für unspezifischen, leicht adstringierenden Geschmackseindruck. ^e nicht bestimmt.

3.1.2 Geschmacksrekombinationsexperimente

Um die Ergebnisse der quantitativen Analysen zu bestätigen und den Beitrag der identifizierten Verbindungen zum Geschmacksprofil der Hefeextrakte zu verifizieren, wurden Geschmacksrekombinationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Geschmacksstoffe

in ihren natürlichen Konzentrationen in Wasser gelöst und nach Einstellen des pH-Wertes (pH 6,0) sensorisch beurteilt. Als Referenzen dienten dabei die wässrigen Hefeextraktlösungen, deren Geschmacksprofile zu Vergleichszwecken vorgegeben wurden. Die Ergebnisse der humansensorischen Evaluationen sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Die ermittelten Daten für die Vollrekombinate zeigten eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Geschmacksstoffrekombinaten und den Hefeextrakten. Für Hefeextrakt 1 wurde in der Profilanalyse eine Umamiintensität von 1,7 bestimmt, wohingegen das Rekombinat mit einer Intensität von 1,6 nur geringfügig unterschiedlich bewertet wurde. Auch die anderen sensorischen Deskriptoren, mit Ausnahme der Bitterkeit, wurden mit leicht geringeren Intensitäten bewertet, wobei die Abweichungen jedoch marginal waren. Insgesamt zeigte das Ergebnis der vergleichenden Profilsensoriken, dass der Geschmack von Hefeextrakt 1 vollständig durch die artifizielle Geschmacksstoffmischung (Rekombinat 1) rekombinierbar war (**Tabelle 2**).

Ein ähnliches Bild ergab sich beim Vergleich von Hefeextrakt 2 und dem entsprechenden Vollrekombinat. Die Umamiintensität der Geschmacksstoffmischung wurde im Vergleich zum nativen Extrakt leicht erhöht und die Salzigkeit geringfügig schwächer beurteilt. Auch die anderen Geschmacksattribute wurden mit sehr ähnlichen Werten beurteilt, was den Schluss zuließ, dass auch in Hefeextrakt 2 alle wertgebenden Geschmacksstoffe vollständig erfasst wurden (**Tabelle 2**).

Tabelle 2. Vergleich der humansensorisch evaluierten Intensitäten (\pm Standardabweichung) für die einzelnen Geschmacksqualitäten der Hefeextrakte und der entsprechenden Rekombinate

Geschmacksqualität	Hefeextrakt 1 ^a	Rekombinat 1	Hefeextrakt 2 ^a	Rekombinat 2
umami	1,7	1,6 (\pm 0,2)	3,4	3,5 (\pm 0,2)
salzig	0,9	0,7 (\pm 0,2)	1,3	1,2 (\pm 0,4)
süß	0,9	0,8 (\pm 0,2)	1,3	1,3 (\pm 0,1)
sauer	0,4	0,3 (\pm 0,1)	0,4	0,6 (\pm 0,2)
bitter	0,4	0,4 (\pm 0,1)	0,6	0,4 (\pm 0,1)
adstringierend	0	0 (\pm 0)	0	0 (\pm 0)

^a wässrige Hefeextraktlösung (1 g/100 mL).

3.1.3 Sensorische Bedeutung ausgewählter 5'-Nukleotide

Um die Bedeutung einiger Ribonukleotide auf den Umamigeschmack der Hefeextrakte 1 und 2 zu untermauern, wurden ausgewählte Substanzen im Folgenden genauer sensorisch beurteilt. Da der Eigengeschmack dieser Substanzklasse von untergeordnetem Interesse war, wurde vielmehr deren synergistisches Verhalten gegenüber MSG (**1**) beleuchtet. In Analogie zum DoT-Konzept sollte der Quotient der Konzentration und des Schwellenwerts

für den Verstärkungseffekt bestimmt werden, der in diesem Fall als Aktivitätsfaktor (AF) definiert wurde. Dazu wurde zunächst die Geschmacksverstärkungsschwelle in einer Lösung von MSG (**1**, 3,5 mM, pH 6,0) bestimmt, wobei sich die gewählte Konzentration als Konsens aus den natürlich vorkommenden Gehalten an **1** in den untersuchten Produkten ergab. Untersucht wurden die beiden mengenmäßig dominierenden Purinnukleotide 5'-AMP (**4**) und 5'-GMP (**2**), das zyklische Adenosin-3',5'-monophosphat (3',5'-cAMP, **18**) sowie das Pyrimidinnukleotid Uridin-5'-monophosphat (5'-UMP, **16**).

Die sensorische Evaluation der Nukleotide zeigte, dass die Schwellenwerte in MSG (**1**)-Matrix im Vergleich zur rein wässrigen Lösung deutlich absanken (**Tabelle 3**). So ging der Schwellenwert der Verbindung **2** von 300 µmol/L auf 3,3 µmol/L zurück. Ab dieser Konzentration waren die Panelisten in der Lage eine eindeutige Verstärkung der Umamiwahrnehmung in der Matrix festzustellen. Auch das zweite Purinnukleotid **4** zeigte einen vergleichsweise niedrigen Schwellenwert von 11,6 µmol/L in einer MSG (**1**)-Lösung, während die untersuchte Pyrimidinverbindung **16** einen um etwa Faktor acht erhöhten Wert (95,4 µmol/L) gegenüber **4** aufwies.

Während das Panel noch in der Lage war für die binären Mischung aus **1** und **16** eindeutig eine Umamiverstärkung zu beschreiben, konnte für das zyklische Monophosphat **18** ausschließlich eine Wahrnehmungsschwelle bestimmt werden, da der Geschmack der Mischung als unspezifisch und nicht eindeutig umamiverstärkt beschrieben wurde.

Bestimmt man nun mit den ermittelten Daten die Aktivitätsfaktoren (**Tabelle 3**), so ergibt sich ein im Vergleich zur Berechnung der DoT-Werte (**Tabelle 1**) abweichendes Bild.

Tabelle 3. Schwellenwerte für die Umamiverstärkung in Mononatrium-L-Glutamat-Lösung (3,5 mM, pH 6,0), Konzentrationen und Aktivitätsfaktoren (AF) ausgesuchter Nukleotide in Hefeextrakten

Verbindung	Schwellenwert ^b	Hefeextrakt 1 ^a		Hefeextrakt 2 ^a	
	[µmol/L]	[µmol/L]	AF ^c	[µmol/L]	AF ^c
5'-GMP (2)	3,3	n.d. ^d	---	22,0	6,7
5'-AMP (4)	11,6	0,5	< 0,1	36,7	3,2
5'-UMP (16)	95,4	0,6	< 0,1	16,6	0,2
3',5'-cAMP (18)	143,6 ¹	7,4	< 0,1	34,1	0,2

^a Konzentrationen und Aktivitätsfaktoren (AF) berechnet für Hefeextraktlösungen (1 g/100 mL).

^b Schwellenwert für den Umamiverstärkungseffekt in 3,5 mM MSG (**1**)-Lösung (pH 6,0).

^c Aktivitätsfaktor, berechnet als Quotient aus Schwellenwert für den Umamiverstärkungseffekt und Konzentration in den Hefeextraktlösungen. ^d nicht detektierbar. ¹ Wahrnehmungsschwelle, unspezifischer Geschmack.

Während die Purine allesamt DoT-Faktoren $< 0,1$ aufwiesen, wurden Aktivitätsfaktoren von 6,7 für **2** und 3,2 für **4** in Hefeextrakt 2 berechnet. Dies belegte deren Beitrag zum Umamigeschmack des Hefeextraktes. Das Pyrimidin- (**16**) sowie das zyklische Nukleotid (**18**) wiesen hingegen in beiden Extrakten AF-Faktoren < 1 auf, was einen Beitrag zum Gesamtgeschmack der Produkte unwahrscheinlich erscheinen ließ.

3.1.4 Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit wurden intensive Untersuchungen zu den geschmacksaktiven Verbindungen in Hefeextrakten durchgeführt. Zunächst wurden zwei Extrakte ausgewählt die sich sowohl in den Herstellungsverfahren als auch den sensorischen Charakteristika unterschieden. Es zeigte sich hierbei, dass der Zusatz von Malzkeimlingsextrakt mit Phosphodiesteraseaktivität in der Herstellung von Hefeextrakt 2 mit einer deutlich ausgeprägteren Umaminote im Vergleich zu Hefeextrakt 1 einherging.

Mittels Kombination analytischer und humansensorischer Experimente gelang es anschließend die geschmacksgebenden Verbindungen in Hefeextrakten zu quantifizieren und den Geschmack der Hefeprodukte erfolgreich zu rekombinieren.

Dabei zeigte die Berechnung der DoT-Faktoren, dass in beiden Extrakten ausschließlich L-Glutaminsäure, Natrium und Chlorid als Primärgeschmacksstoffe vorlagen. Um allerdings genauere Erkenntnisse über eventuell vorhandene additive oder synergistische Effekte zu gewinnen, wurden darauf folgend Rekombinationsexperimente (46 Verbindungen für Hefextrakt 1, 47 Verbindungen für Hefeextrakt 2) durchgeführt. Diese bestätigten, dass die wichtigsten Verbindungen, die zum Geschmack der untersuchten Hefeextrakte beitrugen, erfolgreich quantifiziert wurden. Ebenso implizierten die Ergebnisse, dass in beiden Extrakten keine bisher unbekanntenen Verbindungen einen nennenswerten Beitrag zum Geschmacksprofil leisteten. Weiterhin ergaben sich bereits erste Hinweise auf die herausragende Bedeutung der Nukleotide, da diese den augenscheinlichsten Unterschied in der Komposition der quantifizierten Sensometabolite bildeten. Diese wiesen sowohl in Hefextrakt 1 als auch in Hefeextrakt 2, der in ersten sensorischen Untersuchungen trotz geringerer Gehalte an L-Glutamat (**1**) deutlich intensiver im Umamigeschmack bewertet wurde als Hefeextrakt 1, durchgängig DoT-Faktoren < 1 auf. Allerdings wurde durch die Verwendung einer MSG (**1**)-Matrix gezeigt, dass Nukleotide durch ihren Synergismus mit L-Glutamat (**1**) in der Lage sind einen entscheidenden Beitrag zum Umamigeschmack zu leisten und als ursächlich für den sensorischen Unterschied der untersuchten Produkte betrachtet werden konnten. Um dieses wissenschaftlich zu verifizieren wurden für ausgesuchte Verbindungen die Aktivitätsfaktoren bestimmt, die sich als Quotient der Konzentration im untersuchten Lebensmittel und deren Schwellenwert für den Verstärkungseffekt in MSG (**1**)-Lösung errechneten. Hierbei zeigten sich insbesondere die

Purinnukleotide 5'-GMP (**2**) und 5'-AMP (**4**) mit Aktivitätsfaktoren von 6,7 und 3,2 für Hefeextrakt 2 als wichtigste Vertreter, während in Hefeextrakt 1 kein Nukleotid einen Faktor > 1 aufwies.

Somit wurde mittels humansensorischer Experimente gezeigt, dass ausgewählte Purinnukleotide zwar nicht durch ihren intrinsischen Geschmack, allerdings durch ihre geschmacksverstärkenden Eigenschaften in der Lage sind bereits in niedrigen Konzentrationen einen entscheidenden Beitrag zum Umamigeschmack von Hefeextrakten zu leisten. Deshalb nehmen diese eine herausragende Rolle innerhalb der wertgebenden Inhaltsstoffe von Hefeextrakten ein.

3.2 Umamigeschmacksstoffe und -modulatoren in nukleotidreichen Hefeextrakten

Nachdem im vorherigen Abschnitt bereits die besondere Relevanz der Purin-5'-Nukleotide im Hinblick auf die Umamiverstärkung gezeigt wurde und die zahlreichen Synthesearbeiten zur Herstellung modifizierter Nukleotide (**Kapitel 1.3**) die Existenz noch potenterer Derivate vermuten ließ, sollte im Folgenden gezielt nach bislang unbekanntem umamiverstärkenden Nukleotiden gesucht werden.

Aus zahlreichen kommerziell verfügbaren Produkten wurde ein Hefeextrakt 3 für diese Arbeiten ausgesucht, da dieser durch eine intensive Umaminote und hohe Nukleotidgehalte auffällig war. Die Produktion verlief ähnlich wie für Hefeextrakt 2, allerdings erfolgte vor der Zugabe des Malzkeimlingsextraktes die Deaktivierung der hefeeigenen RNA-degradierenden Enzyme. Dies resultiert im Abbau der RNA ausschließlich durch die im Malzkeimling enthaltene 5'-Phosphodiesterase was sich in einem erhöhten Gehalt an freien 5'-Nukleotiden im finalen Produkt bemerkbar macht.

3.2.1 Sensorische Voruntersuchungen

Um zunächst zu überprüfen welchen Einfluss der erhöhte Gehalt an 5'-Nukleotiden auf die sensorischen Eigenschaften des Hefeextraktes 3 hatte, wurde dieser einer Profilsensorik unterzogen, wobei den Panelisten als Referenzen wässrige Lösungen von Hefeextrakt 1 und 2 mit den evaluierten Intensitäten der verschiedenen Geschmacksqualitäten gereicht wurden.

Die sensorische Analyse ergab für Hefeextrakt 3 einen sehr ausgeprägten Umamigeschmack, der mit der höchstmöglichen Intensität von 5.0 bewertet wurde (**Tabelle 4**).

Tabelle 4. Geschmacksprofil von Hefeextrakt 3 im Vergleich zu Hefeextrakt 1 und 2

Geschmacksqualität	Hefeextrakt 1 ^a	Hefeextrakt 2 ^a	Hefeextrakt 3 ^a
umami	1,7	3,4	5,0
salzig	0,9	1,3	1,5
süß	0,9	1,3	1,6
sauer	0,4	0,4	0,5
bitter	0,4	0,6	0,6
adstringierend	0	0	0

^a wässrige Hefeextraktlösung (1 g/100 mL, pH 6,0).

Des Weiteren beschrieben die Panelisten die Umamiqualität als deutlich längeranhaltend und komplexer als die der anderen beiden Hefeprodukte. Die übrigen Geschmacksdeskriptoren wiesen keine bedeutsamen Unterschiede zu den anderen Produkten auf. Die Daten legten nahe, dass sich Hefeextrakt 3 als Ausgangsmaterial zur Identifizierung potentieller neuartiger Umamigeschmacksstoffe besonders eignete.

3.2.2 Aktivitätsorientierte Fraktionierung des Hefeextraktes 3 mittels RP-MPLC

Um einen ersten Einblick in die Polarität der Geschmacksstoffe bzw. –modulatoren zu erhalten, wurde der Gesamtextrakt mittels Mitteldruckflüssigchromatographie an RP-18 Material (RP-MPLC) unter Verwendung eines wässrigen Ameisensäure-Methanol Gradienten in insgesamt zehn Fraktionen getrennt (**Abbildung 18**). Die Ausbeuten der individuellen Fraktionen wurden gravimetrisch nach Gefriertrocknung bestimmt (**Tabelle 5**).

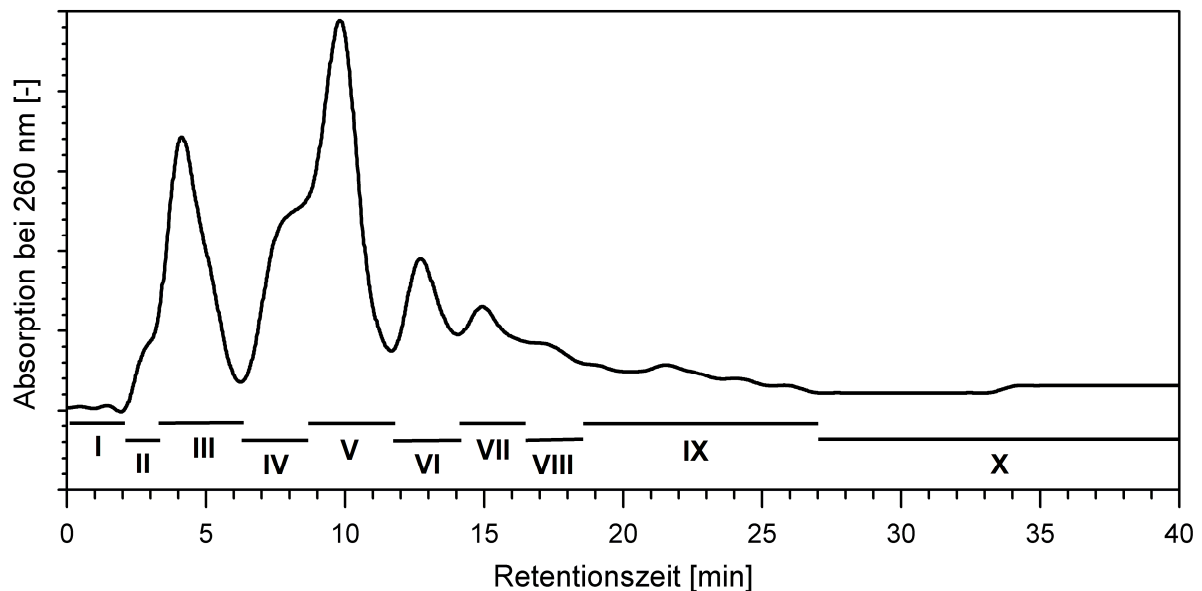


Abbildung 18. Chromatogramm ($\lambda = 260 \text{ nm}$) der präparativen Trennung von Hefeextrakt 3 mittels RP-MPLC.

Tabelle 5. Ausbeuten der RP-MPLC Fraktionen von Hefeextrakt 3

Fraktion (Nr.)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Ausbeute [%] ¹	28,2	24,0	24,5	3,9	7,7	2,8	1,8	2,4	3,3	1,4

¹ gravimetrisch nach Lyophilisation.

Dabei zeigten sich die polaren Fraktionen mengenmäßig dominierend. So machten die Fraktionen I-III in der Summe etwa 77 % der Gesamtausbeute aus. Während die Fraktionen IV und V ebenfalls vergleichsweise hohe Ausbeuten von 3,9 bzw. 7,7 % aufwiesen,

zeichneten sich die unpolaren Fraktionen durch niedrige Anteile zwischen 1,4 und 3,3 % am Gesamtextrakt aus.

Um die erhaltenen Fraktionen anschließend in ihrem Geschmacksbeitrag zu gewichten, wurden diese mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) analysiert. Um den Hefeextrakt nach potentiellen Geschmacksstoffen bzw. -modulatoren zu untersuchen, erfolgte die Separation der RP-MPLC Fraktionen in zwei Aliquote, die anschließend sensorisch evaluiert wurden. Dazu wurde ein Teil in Sensorikwasser gelöst und schrittweise 1+1 verdünnt. Die resultierende Verdünnungsreihe wurde gegen reines Wasser als Blindlösung verkostet und der so genannte Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) bestimmt, der derjenigen Verdünnungsstufe entsprach, bei der gerade noch ein Unterschied zwischen Probenlösung und Blindlösung erkennbar war ^[62].

Neben dem intrinsischen Umamigeschmack wurde ebenfalls das geschmacksverstärkende Potential der Einzelfraktionen in einer matrixsimulierten Geschmacksverdünnungsanalyse (mGVA) untersucht. Das Vorgehen erfolgte wie bereits zuvor beschrieben, jedoch fand statt Wasser eine MSG (1)-Matrix (3 mM, pH 6,0) Verwendung. Wie **Abbildung 19, A** verdeutlicht, bewirkte die Variation der Matrix von Wasser zu einer MSG (1)-Lösung für alle Fraktionen einen unterschiedlich starken Anstieg der GV-Faktoren (**Abbildung 19, B**). So zeigten die polaren Fraktionen I und II in Wasser bereits einen ausgeprägten Umamigeschmack mit GV-Faktoren von 64, allerdings verdoppelten sich diese in einer MSG (1)-Lösung auf 128. Im Gegensatz dazu konnten drei Fraktionen (IV, VI und VII) identifiziert werden, deren Aktivitäten in MSG (1)-Matrix sogar 16-fach höher waren als in Wasser, was auf die Anwesenheit geschmacksverstärkender Verbindungen hindeutete. Die Fraktionen III, V und VIII zeigten ebenfalls einen ausgeprägten Anstieg um einen Faktor von 8, während die Fraktionen IX und X in Wasser gar keinen Geschmack aufwiesen, aber in der Lage waren die durch MSG (1) hervorgerufene Umamiwahrnehmung zu verstärken.

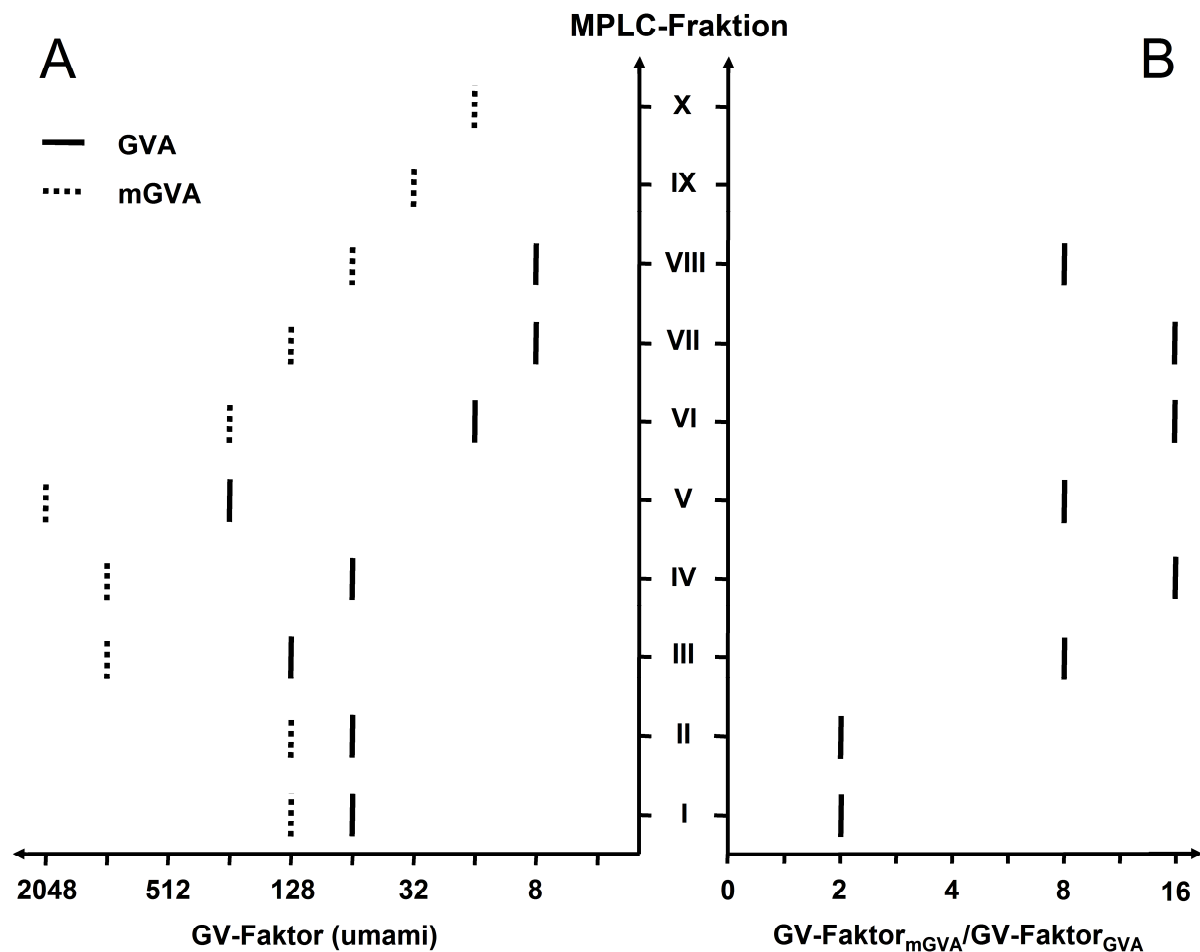


Abbildung 19. Geschmacksverdünnungsfaktoren (GV-Faktoren) der RP-MPLC Fraktionen, ermittelt mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) und matrixsimulierter Geschmacksverdünnungsanalyse (mGVA) (A) sowie Quotient der bestimmten GV-Faktor aus GVA und mGVA (B).

Im weiteren Verlauf der Arbeit war es notwendig die folgende Isolierungs- und Strukturaufklärungsarbeit auf diejenigen Fraktionen zu konzentrieren, bei denen eine ausgeprägte geschmacksmodulierende Aktivität festgestellt wurde, die nicht auf die bereits in der Literatur beschriebenen Verbindung zurückgeführt werden konnte. Mittels analytischer Untersuchungen (HPLC-DAD, HPLC-MS) gelang es in den Fraktionen III, IV und V die bekannten Geschmacksverstärker 5'-GMP (2) und 5'-IMP (3) zu identifizieren. Da deren geschmacksmodulierendes Potential bereits vielfach beschrieben wurde, wurde im Folgenden der Fokus auf die RP-MPLC Fraktionen VI und VIII gelegt, in denen keiner der bekannten Geschmacksverstärker in nennenswerten Konzentrationen detektiert wurde.

3.2.3 Identifizierung geschmacksaktiver Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VI

Mittels humansensorischer Evaluation wurde für RP-MPLC Fraktion VI ein starker geschmacksmodulierender Effekt in der MSG (1)-Matrix, bei gleichzeitigem schwachem

intrinsischen Geschmack beobachtet. Im Folgenden sollten die für dieses sensorische Phänomen verantwortlichen Modulatoren genauer untersucht werden. Dazu wurde Fraktion VI mittels HPLC an einer Pentafluorphenylpropylsäule weiter aufgetrennt und in 15 Subfraktionen (VI-1 bis VI-15) unterteilt (**Abbildung 20, A**). Diese wurden getrennt voneinander gesammelt, vom Lösungsmittel befreit und schließlich gefriergetrocknet. Nach folgender Rekonstitution in einer MSG (**1**)-Lösung (3 mM, pH 6,0) wurden diese sensorisch in einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse gegen die reine Matrixlösung verkostet. Dabei wurde die wahrgenommene Umamiintensität auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet, wobei der Matrix ohne zugesetztes Additiv ein Wert von 1 zugeordnet wurde.

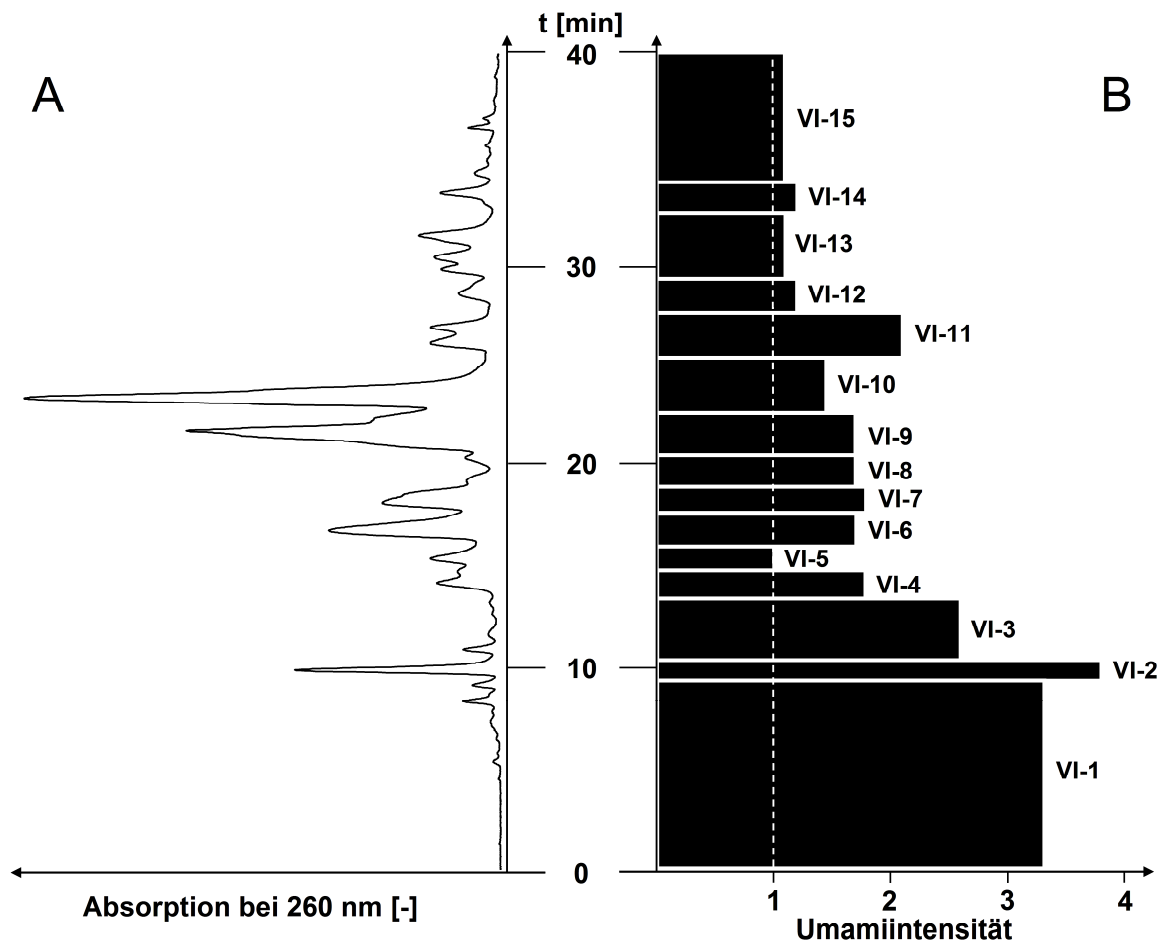


Abbildung 20. HPLC-Trennung ($\lambda = 260 \text{ nm}$) von Fraktion VI (**A**) und wahrgenommene Umamiintensitäten bei einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse (**B**). Die weiße, gestrichelte Linie kennzeichnet die Intensität der verwendeten MSG (**1**)-Matrixlösung (3 mM, pH 6,0).

Wie in **Abbildung 20, B** zu erkennen, verzeichnete das Panel im Schnitt bei einer Vielzahl von Fraktionen eine gesteigerte Umamiintensität. Insbesondere die polaren Fraktionen VI-1-4 wurden mit besonders hohen Werten evaluiert, wohingegen für die unpolaren Fraktionen

VI-12-15 nur eine geringe sensorische Aktivität festgestellt wurde. Die Übersicht in **Tabelle 6** zeigt neben den bestimmten Intensitäten mit den zugehörigen Standardabweichungen auch den prozentualen Anteil der Prüfer die eine Verstärkung des Geschmacks wahrnehmen konnten sowie die sensorische Qualität des Umamigeschmacks. Während die ausgeprägten geschmacksverstärkenden Eigenschaften in den polaren Fraktionen VI-1-3 mit der Anwesenheit von Spuren der literaturbekannten 5'-Nukleotide wie 5'-GMP (**2**) und 5'-IMP (**3**) assoziiert wurde, zeigten sich insbesondere die Fraktionen VI-6, VI-7 und VI-11 von Interesse.

Tabelle 6. Übersicht der evaluierten Umamiintensitäten und Geschmacksqualitäten sowie des prozentualen Anteils der Prüfer, die eine erhöhte Intensität für die mittels HPLC isolierten Subfraktionen aus RP-MPLC Fraktion VI detektierten

Fraktion (Nr.)	Umamiintensität ^a (± Standardabweichung)	Prüfer ^b [%]	Qualität ^c
VI-1	3,3 (± 0,7)	100	nukleotid-artig
VI-2	3,8 (± 0,9)	100	nukleotid-artig
VI-3	2,6 (± 1,0)	100	nukleotid-artig
VI-4	1,8 (± 0,6)	75	nukleotid-artig
VI-5	1,0 (± 0,4)	25	k. A. ^d
VI-6	1,5 (± 0,2)	100	k. A. ^d
VI-7	1,8 (± 0,3)	100	nukleotid-artig
VI-8	1,7 (± 0,6)	87,5	nukleotid-artig
VI-9	1,7 (± 0,5)	87,5	nukleotid-artig
VI-10	1,5 (± 0,5)	75	k. A. ^d
VI-11	2,1 (± 0,4)	100	nukleotid-artig
VI-12	1,2 (± 0,4)	37,5	MSG-artig
VI-13	1,1 (± 0,5)	25	MSG-artig
VI-14	1,2 (± 0,2)	25	MSG-artig
VI-15	1,2 (± 0,2)	50	MSG-artig

^a Evaluiert in einer wässrigen 3 mM MSG (**1**)-Lösung (pH 6,0). Bewertet auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar), wobei die Intensität der reinen Matrixlösung als 1 definiert wurde. ^b Prozentualer Anteil der Prüfer (n = 8), der eine verstärkte Umamiintensität wahrgenommen hat. ^c Qualität des Umamigeschmacks, bestimmt durch sensorischen Vergleich mit einer Lösung von MSG (**1**, 3 mM) für den MSG-artigen, oder einer binären Mischung von MSG (**1**, 3 mM) und 5'-GMP (**2**, 0,1 mM) für einen nukleotid-artigen Geschmackseindruck. ^d keine Aussage, da die Geschmacksqualität von weniger als 50 % der Teilnehmer eindeutig zugeordnet wurde.

Diese wiesen einen modulierenden Effekt auf den Umamigeschmack von MSG (**1**) auf, der von 100 % der Panelisten beobachtet wurde. Deshalb konzentrierten sich die folgenden Arbeiten auf diese Fraktionen (**Tabelle 6**).

Identifizierung des Geschmacksmodulators in HPLC-Fraktion VI-6

Die aus HPLC Fraktion VI-6 isolierte Verbindung wurde zunächst mittels HPLC-DAD auf eine entsprechende Reinheit überprüft und anschließend mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) genauer untersucht. Dabei ergab sich ein Molekülion mit m/z 628,0692, was einer berechneten Summenformel von $[C_{18}H_{24}N_5O_{16}P_2]^-$ entsprach. Diese Zusammensetzung gab bereits einige wichtige Hinweise auf die mögliche Struktur, da zum einen die Anwesenheit zweier Phosphoratome gegen ein Nukleosidmonophosphatderivat sprach, und zum anderen die Zusammensetzung mit der erhöhten Kohlenstoffzahl die Präsenz eines Nukleosiddiphosphates ausschloss. Vielmehr implizierten die massenspektrometrischen Daten die Anwesenheit eines Dimers aus Pyrimidinnukleotiden. Um die Struktur endgültig zu klären, wurden verschiedene NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Dabei wurden im 1H -NMR-Spektrum elf Signale mit Intensitäten zwischen einem und drei Protonen identifiziert (**Abbildung 21**), von denen vier Signale als aromatische Protonen mit Dublettsignalstrukturen erkannt wurden. Durch den Vergleich mit den Referenzspektren der kommerziell erhältlichen Nukleotide 5'-UMP (**16**) und 5'-CMP (**17**) wurde das Signalpaar bei 8,13 und 6,21 ppm mit Kopplungskonstanten von jeweils 8,0 Hz für die vicinale Kopplung den Protonen H-C(6) und H-C(5) der Cytosin-Base zugeordnet, während jene bei 7,82 und 5,84 ppm mit vicinalen Kopplungskonstanten von 8,1 Hz als H-C(6'') und H-C(5'') der Uracil-Base identifiziert wurden. Weiterhin wurden zwei nicht aromatische Protonen bei 5,86 ppm (H-C(1'), H-C(1''')) beobachtet, deren chemische Verschiebung in guter Übereinstimmung mit der des anomeren Riboseprotons waren. Die Signale zwischen etwa 4,60-4,00 ppm mit einer Gesamtprotonenzahl von zehn resultierten aus den verbliebenen Protonen zweier Ribosemoleküle.

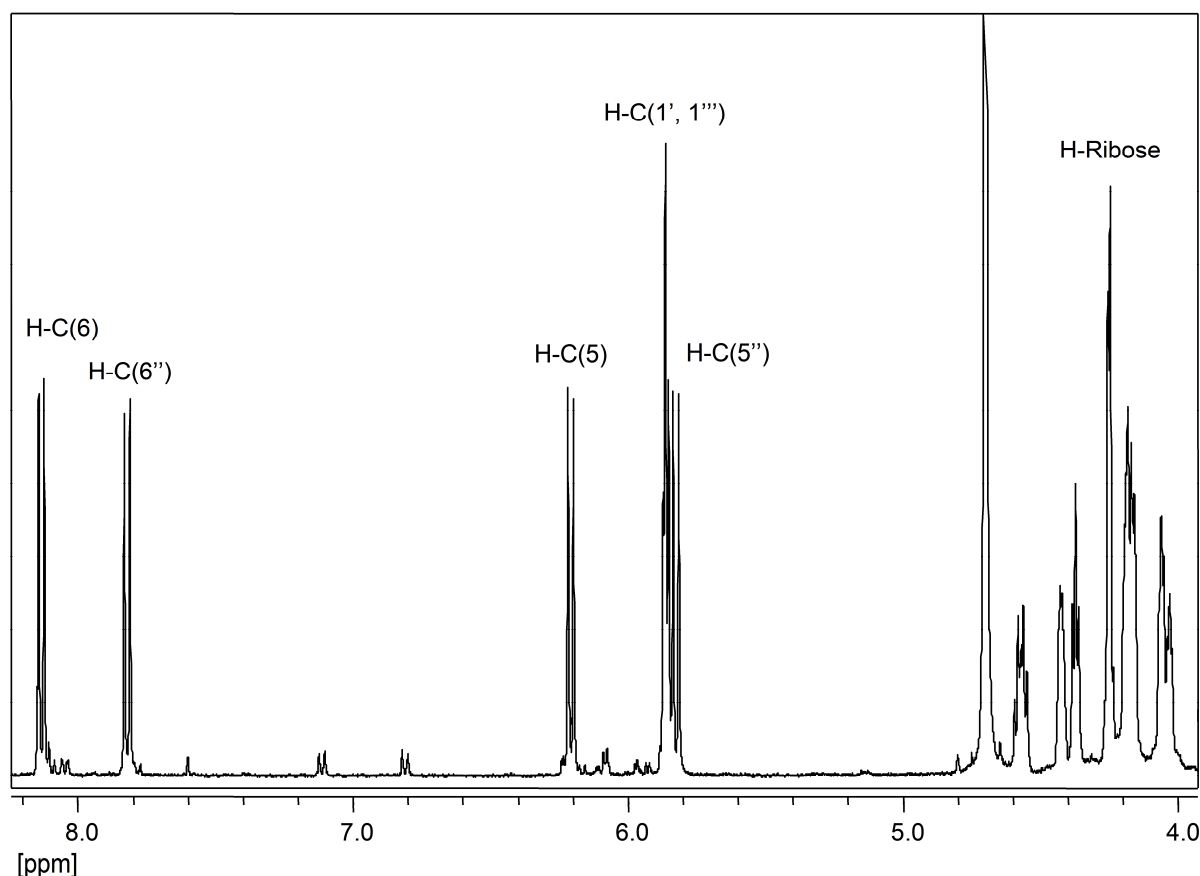


Abbildung 21. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) der unbekanntes Verbindung **19** isoliert aus Fraktion VI-6. Die Nummerierung der Protonen bezieht sich auf die Struktur in **Abbildung 23**.

Zur exakten Bestimmung der Verknüpfungen zwischen den verschiedenen Molekülteilen erwies sich neben 2-dimensionalen Experimenten insbesondere das ^{13}C -Spektrum als besonders hilfreich (**Abbildung 22**). Dieses zeigte die Anwesenheit acht aromatischer Kohlenstoffatome, von denen sechs als stark tieffeldverschobene Signale zwischen 169,1 (C(4'')) und 144,6 ppm (C(6'')) detektiert wurden, während zwei Signale im höheren Feld bei 105,5 (C(5'')) und 98,3 ppm (C(5)) observiert wurden. Die anomeren Kohlenstoffatome der beiden Ribosemoleküle wurden bei 92,6 (C(1''')) und 92,0 ppm (C(1')) beobachtet, während die verbleibenden Signale des Zuckerrestes zwischen 85,9 (C(4''')) und 66,5 ppm (C(5')) erschienen. Von diesen acht Signalen spalteten fünf zu einem Dublett auf (C(2'), C(3'), C(5'), C(4'''), C(5''')) und eins zum Doppeldublett (C(4')). Zwei Signale zeigten keine Aufspaltung. Die Anwesenheit der aufgespaltenen Signale ergab sich durch heteronukleare 2J - und 3J -Kopplungen zwischen den ^{13}C - und benachbarten ^{31}P -Kernen und gab somit wertvolle Informationen zur Verknüpfungsposition der Phosphatreste an den jeweiligen Riboseeinheiten der Mononukleotide.

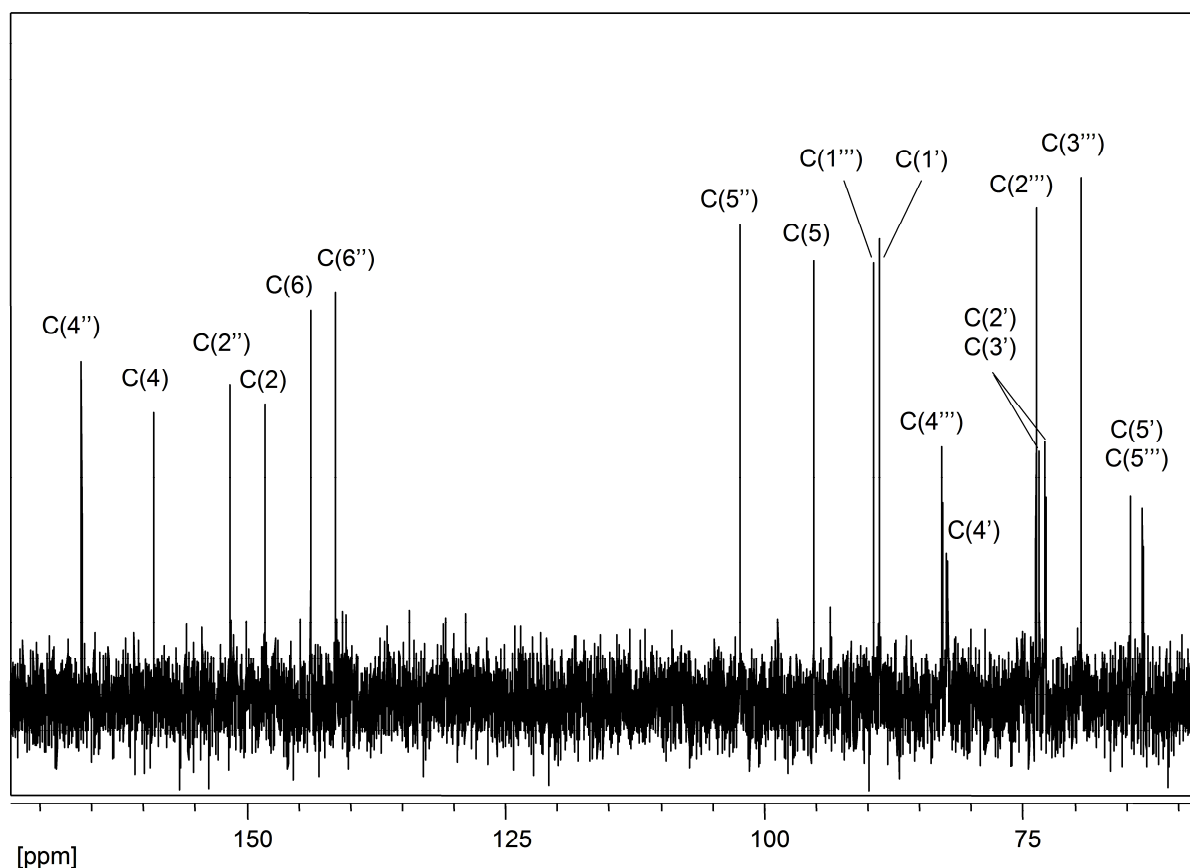


Abbildung 22. Ausschnitt aus dem ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, D₂O) der unbekanntes Verbindung **19** isoliert aus Fraktion VI-6. Die Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die Struktur in **Abbildung 23**.

Um die exakte Verknüpfung zu verifizieren, wurde ausgehend von H-C(6) mittels HMBC-Experiment das entsprechende Kohlenstoff C(1') bei 92,0 ppm identifiziert, dem daraufhin mittels HMQC das Kohlenstoff gebundene Proton H-C(1') mit einer chemischen Verschiebung von 5,85 ppm zugeordnet wurde. Dieses wies nun seinerseits eine homonukleare H,H-Kopplung zu H-C(2') bei 4,37 ppm auf, dessen Kohlenstoff mit einer chemischen Verschiebung von 76,6 ppm im ¹³C-NMR als Dublett aufgespalten erschien. Dies bedeutete, dass an Position C(3') bei 85,4 ppm die Verknüpfung einer Phosphatgruppe erfolgt war. Weiterhin wurde diese Tatsache durch ein aufgespaltenes Signal für C(3') bei 76,0 ppm bestätigt. Im Einklang mit den bisherigen Beobachtungen wies C(4') eine Doppeldublettmultiplizität auf, die aus einer ²J_{C,P}- und einer ³J_{C,P}-Kopplung mit Kopplungskonstanten von 8,9 und 5,5 Hz resultierte. Die Protonen H-C(5') bei 4,14-4,21 ppm wiesen eine direkte Kopplung zum Dublett von C(5') bei 66,5 ppm auf.

In Analogie zur zuvor beschriebenen Herangehensweise erfolgte die Zuordnung der verbleibenden Protonen und Kohlenstoffe ausgehend vom aromatischen Proton H-C(6'') der Nukleobase Cytosin. Im Einklang mit den spektroskopischen Daten wurde die unbekanntes,

aus Fraktion VI-6 isolierte, umamiverstärkende Verbindung als Cytidylyl-(5'→3')-uridin 5'-monophosphat (**19**, **Abbildung 23**) identifiziert.

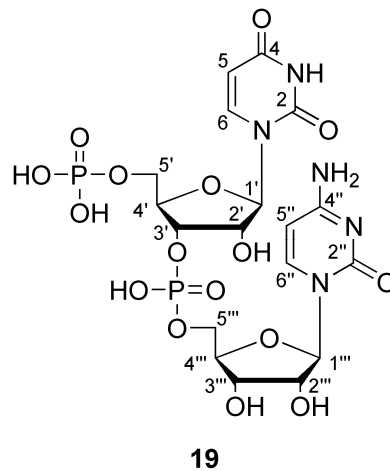


Abbildung 23. Chemische Struktur des in Fraktion VI-6 identifizierten Geschmacksmodulators Cytidylyl-(5'→3')-uridin 5'-monophosphat (**19**).

Identifizierung des Geschmacksmodulators in HPLC-Fraktion VI-7

Die massenspektrometrische Untersuchungen der aus Fraktion VI-7 isolierten Verbindung zeigten eine Analogie zu der in Fraktion VI-6 eluierenden Verbindung **19**. Dabei wurde mit m/z 628,0691 das Pseudomolekülion identifiziert, was wiederum einer berechneten Summenformel von $[C_{18}H_{24}N_5O_{16}P_2]^-$ entsprach. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Isolat um ein Isomer zu der in Fraktion VI-6 identifizierten Verbindung **19** handelte. Dieses wurde durch die nahezu identischen spektroskopischen Daten bestätigt, welche in **Kapitel 4.3.3** dargestellt sind.

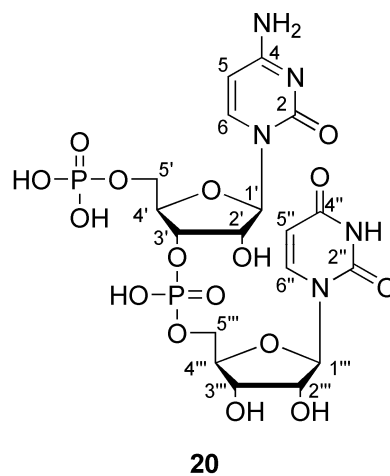


Abbildung 24. Chemische Struktur des in Fraktion VI-7 identifizierten Geschmacksmodulators Uridylyl-(5'→3')-cytidin 5'-monophosphat (**20**).

Als Resultat der spektroskopischen Untersuchungen wurde die unbekannte, aus Fraktion VI-7 isolierte, umamiverstärkende Verbindung als Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat (**20**, **Abbildung 24**) identifiziert.

Zuletzt wurde versucht die in Fraktion VI-11 eluierende, geschmacksmodulierende Verbindung in ihrer Struktur zu klären. Allerdings gelang es trotz verschiedenster Trennoperationen nicht eine Substanz in ausreichender Reinheit für spektroskopische Experimente zu erhalten.

3.2.4 Sensorische Untersuchung der identifizierten, geschmacksaktiven Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VI

Erste sensorische Untersuchungen zeigten, dass der intrinsische Geschmack der isolierten Verbindungen Cytidylyl-(5'→3')-uridin-5'-monophosphat (**19**) und Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat (**20**) vergleichsweise wenig ausgeprägt war. Deshalb wurde in Ermangelung ausreichender Substanzmengen auf die Aufnahme der Umamigeschmacksschwellen verzichtet. Vielmehr sollte das geschmacksmodulierende Potential der Verbindungen evaluiert werden, weshalb in Analogie zu den vorherigen Untersuchungen der Schwellenwert für den Umamiverstärkungseffekt in einer Lösung von MSG (**1**, 3,5 mM, pH 6,0) bestimmt wurde (**Tabelle 7**).

Die beiden Dinukleotidderivate erwiesen sich im Vergleich zum Mononukleotid 5'-UMP (**16**) als aktivere Verbindungen. Während **16** einen Schwellenwert von 95,4 µmol/L für die Umamiverstärkung aufwies, lagen diejenigen von **19** und **20** bei 18,8 bzw. 21,2 µmol/L.

Tabelle 7. Geschmacksschwellenwerte des umamiverstärkenden Effektes der isolierten Dinukleotide Cytidylyl-(5'→3')-uridin-5'-monophosphat (**19**), Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat (**20**) sowie von Uridin-5'-monophosphat (**16**)

Verbindung (Nr.)	19	20	16
Schwellenwert ^a (µmol/L)	18,8	21,2	95,4

^a Schwellenwert für den Umamiverstärkungseffekt in 3,5 mM MSG (**1**)-Lösung (pH 6,0).

3.2.5 Identifizierung geschmacksaktiver Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VIII

Die unpolare Fraktion VIII zeichnete sich durch einen schwachen Umamieigengeschmack aus, während bei der mGVA in der MSG (**1**)-Matrix eine ausgeprägte Geschmacksverstärkung wahrgenommen werden konnte (**Abbildung 19**). Da in dieser Fraktion keine der in der Literatur beschriebenen, geschmacksverstärkenden 5'-Nukleotide detektiert werden konnte, wurden Versuche unternommen die geschmacksmodulierenden Verbindungen zu isolieren und strukturell zu charakterisieren. Die Fraktion ließ sich mittels klassischer RP-18 Chromatographie kaum auftrennen und erwies sich als äußerst komplex

(Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde dem Eluenten Triethylammoniumacetat zugesetzt, das als Ionenpaarreagenz eine bessere Auftrennung höher geladener Substanzen ermöglichen sollte (**Abbildung 25**).

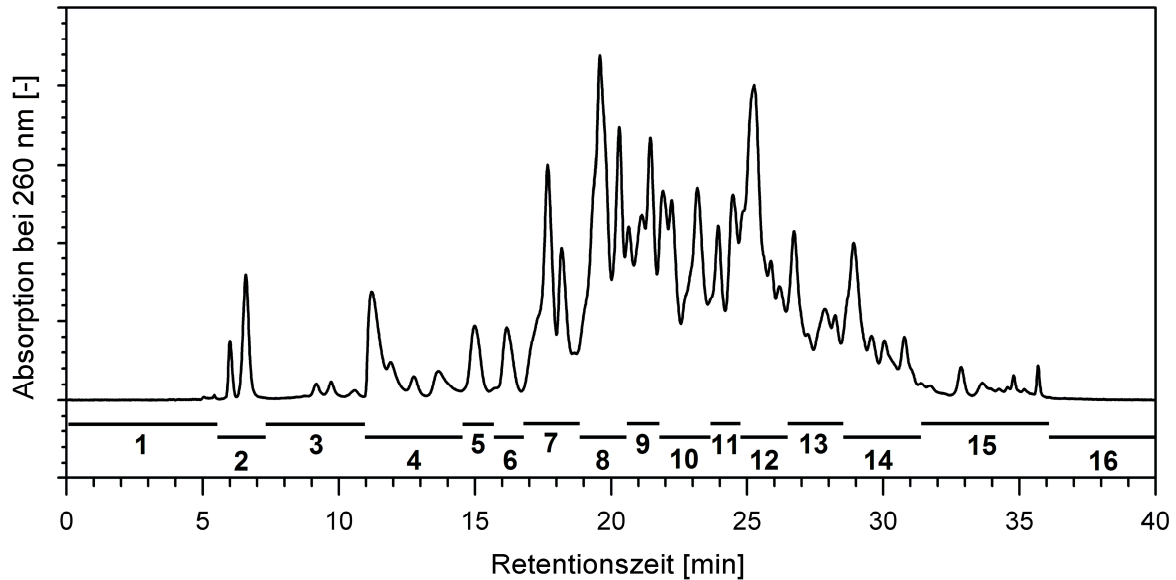


Abbildung 25. Semipräparative IP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260 \text{ nm}$) von RP-MPLC Fraktion VIII.

Zwar ermöglichte die Applikation der Ionenpaar (IP)-Chromatographie keine direkte Isolierung von Reinsubstanzen, jedoch konnte die Fraktion in einzelne Subfraktionen unterteilt werden, die mittels weiterer Trennoperationen aufgereinigt wurden. Aufgrund der zeitintensiven Aufreinigung und des Zusatzes des Ionenpaarbildners, der einen sensorisch geleiteten Identifizierungsprozess erschwerte, wurden die 16 Subfraktionen zunächst mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei Substanzen die das GuanosinGrundgerüst enthielten, da sich zum einen 5'-GMP (**2**) als potentester Geschmacksverstärker unter den natürlich vorkommenden Nukleotiden auszeichnet und weiterhin in der jüngsten Literatur über strukturell modifizierte 5'-GMP (**2**)-Derivate hoher Aktivität berichtet wurde ^[29, 30]. Die Analyse der 16 IP-HPLC Fraktionen zeigte in Fraktion VIII-8 die Anwesenheit einer Verbindung, die das typische UV-Spektrum des 5'-GMP (**2**)-Grundgerüsts mit einem Maximum bei 255 nm und einer Schulter bei etwa 280 nm aufwies. Um die Verbindung zur strukturellen Charakterisierung zu isolieren, wurde die Fraktion VIII-8 an einer Umkehrphase mit einem Gradient aus wässriger Ameisensäure und Acetonitril getrennt (**Abbildung 26**).

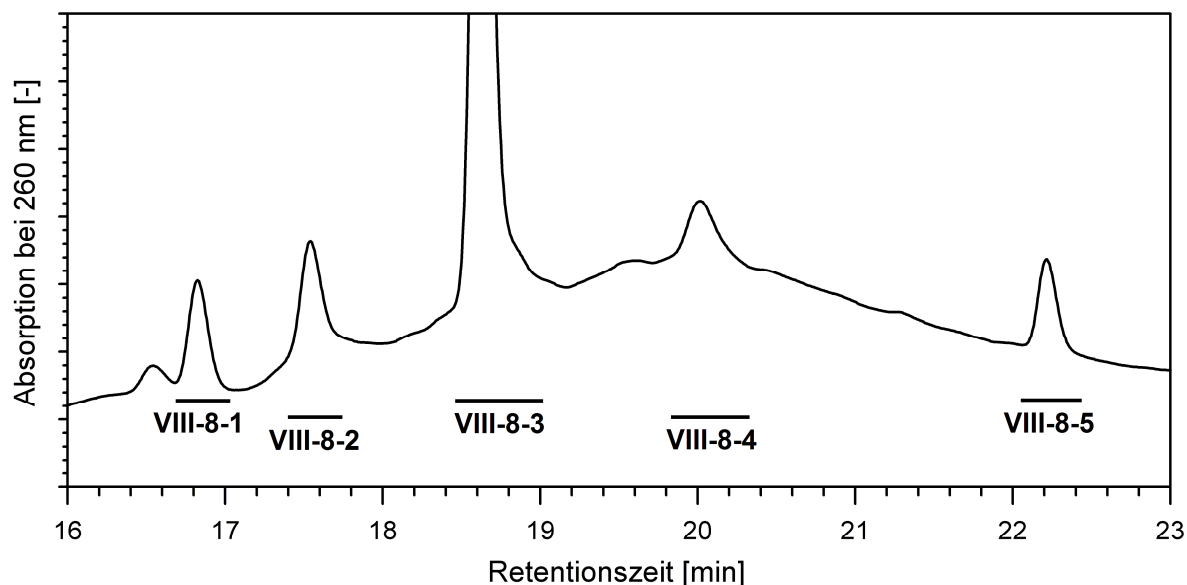


Abbildung 26. Ausschnitt aus der RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) der präparativen Nachreinigung von Fraktion VIII-8.

Nach der Rechromatographie wurden die erhaltenen Fraktionen erneut mittels analytischer RP-HPLC überprüft, wobei sich zeigte, dass die gesuchte Verbindung mit dem 5'-GMP (**2**) ähnlichen UV-Spektrum in Unterfraktion VIII-8-5 bei etwa 22 min eluierte. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender Lyophilisation, wurde die unbekannte Substanz in Form eines amorphen weißen Pulvers erhalten, das zur Strukturaufklärung mittels MS- und NMR-Experimenten untersucht wurde. Die Bestimmung der exakten Masse mittels TOF-MS ergab ein Pseudomolekülion $[M-H]^-$ mit m/z 434,0705, was eine sehr gute Übereinstimmung mit einer Molekularzusammensetzung von $[C_{13}H_{17}N_5O_{10}P]^-$ zeigte. Weitere Untersuchungen mittels LC-MS/MS im ESI⁻ Modus illustrierten eine Fragmentierung von m/z 434 auf m/z 336, was auf die Abspaltung eines Phosphorsäurerestes hindeutete. Diese Interpretation wurde weiterhin durch die Detektion eines Fragmentions von m/z 97 untermauert, das der deprotonierten Säure $[H_2PO_4]^-$ entspricht.

Die exakte Struktur der Zielverbindung wurde schließlich durch die Anwendung verschiedener NMR-Techniken geklärt. Das ¹H-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung (**Abbildung 27**) zeigte acht Resonanzsignale mit Integralen zwischen eins und drei. Durch Vergleich des Spektrums mit dem des Dinatriumsalzes von 5'-GMP (**2**) wurden die Signale des Nukleotidgrundgerüsts zugeordnet. Charakteristisch waren das Singulett bei 8,17 ppm für das aromatische Proton H-C(8) des Purins sowie das Dublett bei 6,02 ppm mit einer Kopplungskonstante von 5,2 Hz, das dem anomeren Proton H-C(1') der Ribose zugeordnet wurde. Durch Anwendung eines COSY-Experiments konnten die weiteren Signale des Zuckers eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich wurden zwei Signale detektiert, die nicht vom 5'-GMP (**2**) stammten und zum einen als Quartett bei 4,27 ppm (H-C(2'')) mit einer

Kopplungskonstante von 7,2 Hz (**Abbildung 27, A**), zum anderen als Dublett im hohen Feld bei 1,45 ppm (H-C(3'')) ebenfalls mit einer Kopplungskonstante von 7,2 Hz (**Abbildung 27, B**) beobachtet wurden. Diese Protonen wurden zusätzlich mittels COSY-Spektroskopie als direkte Kopplungspartner bestätigt.

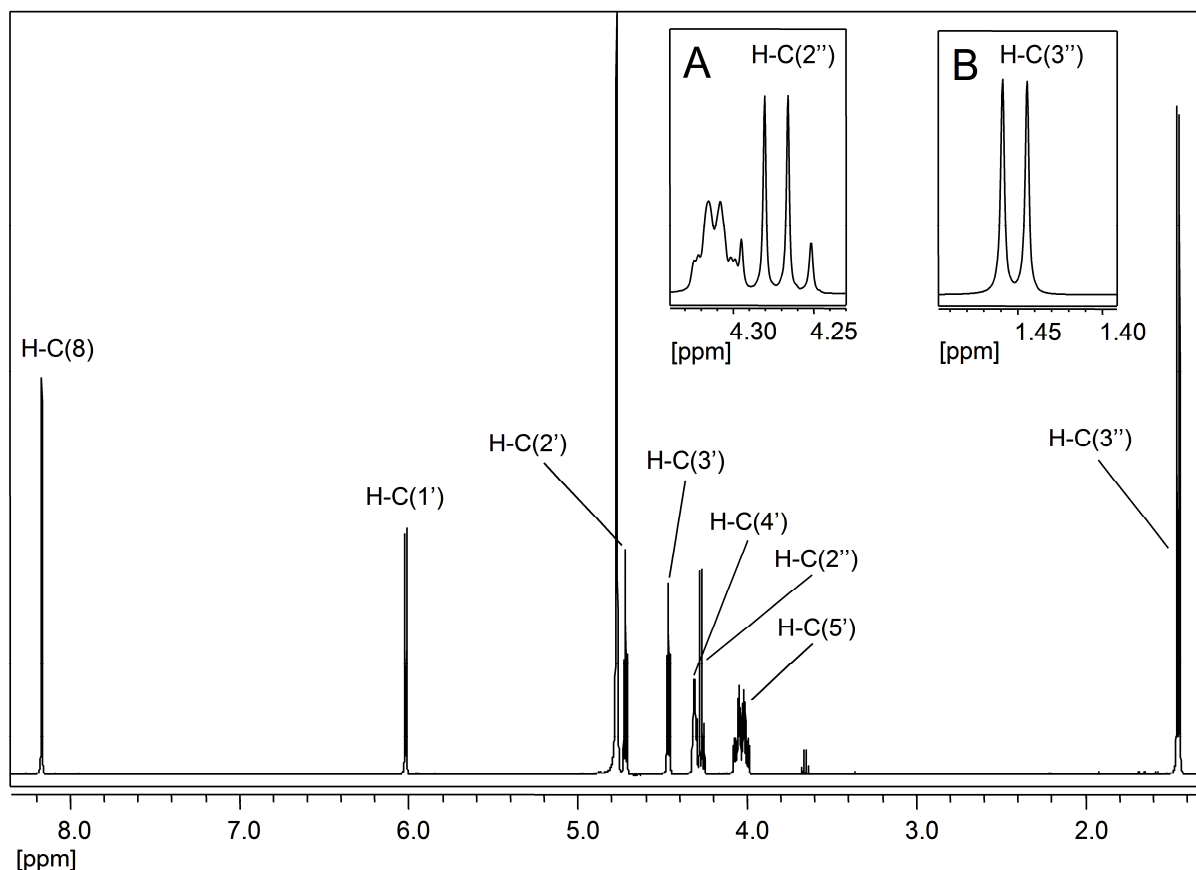


Abbildung 27. ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O/NaOD) der unbekanntes Verbindung **21** aus Fraktion VIII-8-5 sowie vergrößerte Ausschnitte der Signale um 4,27 ppm (**A**) und 1,45 ppm (**B**). Die Nummerierung der Protonen bezieht sich auf die Struktur in **Abbildung 29**.

Um nun zu überprüfen wie das Nukleotid mit den zusätzlichen Strukturelementen verbrückt war, wurden heteronukleare Korrelationsexperimente durchgeführt. Durch die Anwendung des HMBC-Experiments wurde verifiziert, dass es sich bei dem Substituenten um einen C₃-Körper handelt, da sowohl das Proton H-C(2'') als auch das Proton H-C(3'') neben den Kopplungen zu den jeweiligen Kohlenstoffatomen C(3'') bzw. C(2'') eine weitere Kopplung zu einem quartären Kohlenstoffatom bei 184,2 ppm zeigten (**Abbildung 28**).

Weiterhin wurde die Bindungsstelle zwischen dem Puringrundkörper und dem Substituenten bestimmt, da H-C(2'') eine zusätzliche Kopplung zum aromatischen Kohlenstoff C(2) aufwies (**Abbildung 28**). Die Anwesenheit des intakten Phosphatrestes stützte sich neben den massenspektrometrischen Daten auf das ¹³C-NMR, das für C(4'') und C(5'') eine Aufspaltung der ¹³C-Signale zu Dubletts zeigte. Hierbei wurde die größere Kopplungskonstante von

8,7 Hz für die $^3J_{C,P}$ Kopplung von C(4') beobachtet, während die $^2J_{C,P}$ Kopplung von C(5') einen Wert von 4,6 Hz aufwies. Auch wenn die Daten eine gute Übereinstimmung mit denen des in der Literatur publizierten *N*²-Laktoyl-5'-GMP (**12**)^[29, 30] aufwiesen, implizierte die chemische Verschiebung von C(2'') mit 55,4 ppm eher eine α -Aminosäurestruktur, als die eines Laktamides, dessen α -Kohlenstoffatom Resonanz bei 70,7 ppm zeigt^[29, 30].

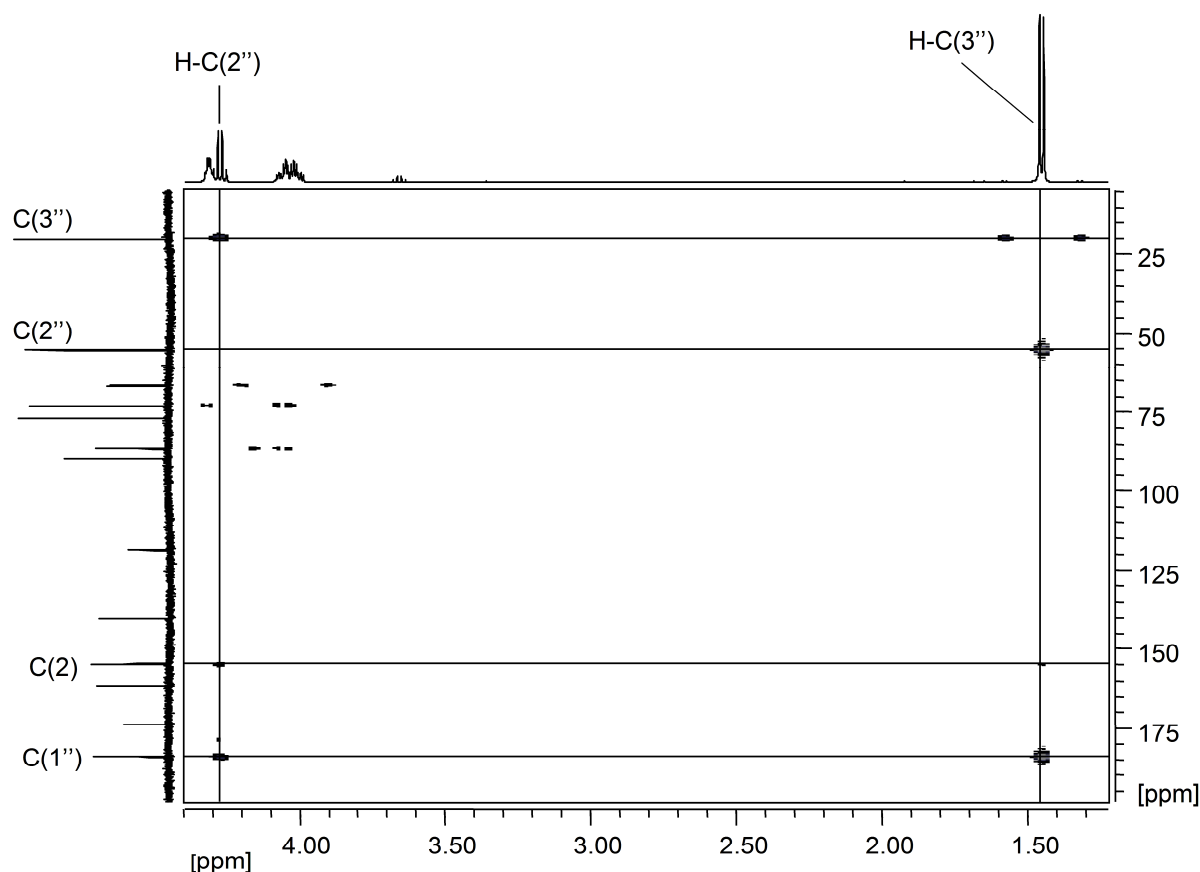


Abbildung 28. Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (125 MHz, D₂O/NaOD) der unbekanntes Verbindung VIII-8-5. Die Nummerierung der Protonen und Kohlenstoffatome bezieht sich auf die Struktur in **Abbildung 29**.

Ein Indiz zur Unterstützung dieser These ergab die Messung von L-Alanin als Referenz, dessen α -Kohlenstoffatom eine chemische Verschiebung von 53,4 ppm aufwies und somit sehr nahe an dem ermittelten Wert für C(2'') lag. Anhand der erhaltenen spektroskopischen Daten wurde die unbekannte Substanz als das in der Literatur zuvor nicht beschriebene (*R*- oder (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**) identifiziert (**Abbildung 29**).

Um allerdings einen unwiderlegbaren Beweis für die vorgeschlagene Struktur in **Abbildung 29** zu erhalten, sollte diese Verbindung sowie vergleichsweise das literaturbeschriebene Laktamid synthetisch hergestellt werden. Weiterhin sollte die Stereochemie an C(2'') geklärt werden, da die NMR-Daten keine Aussage über die Konfiguration an C(2'') zuließen.

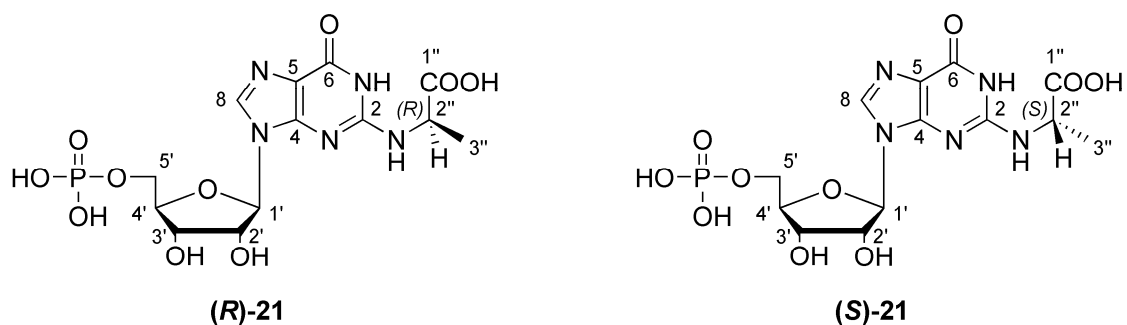


Abbildung 29. Mögliche Strukturen für die aus Fraktion VIII-8-5 isolierte Verbindung: (*R*)- oder (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**).

3.2.6 Synthese von (*R*)-, (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat und (*S*)-*N*²-Laktöyl-guanosin-5'-monophosphat

Um die Struktur von (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**21**) abzusichern sowie beide Stereoisomere sensorisch zu charakterisieren, sollten diese im Folgenden in ausreichenden Mengen synthetisiert werden. Obwohl die Verbindung in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde, existieren Berichte über das strukturanaloge *N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosin (**22**). Diese als *Advanced Glycation Endproduct* (AGE) bereits seit längerem bekannte Verbindung wurde aus Modellinkubationen der DNA-Base 2'-Desoxyguanosin (**23**) mit DL-Glycerinaldehyd oder höheren Kohlenhydraten isoliert^[115].

Um zu prüfen, ob für die isolierte Verbindung ebenfalls eine Triose als Präkursor fungiert, wurde 5'-GMP (**2**) in Phosphatpuffer mit DL-Glycerinaldehyd bei 40 °C für 10 Tage inkubiert und der Reaktionsverlauf mittels analytischer RP-HPLC in regelmäßigen Abständen überprüft. Dabei zeigte sich bereits nach kurzer Zeit die Bildung zweier Verbindungen, die an einer Umkehrphase eine längere Retentionszeit aufwiesen als das native Nukleotid. Nach zehn Tagen war die Ausgangsverbindung quantitativ abgebaut (**Abbildung 30**) und die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden mittels präparativer RP-HPLC isoliert.

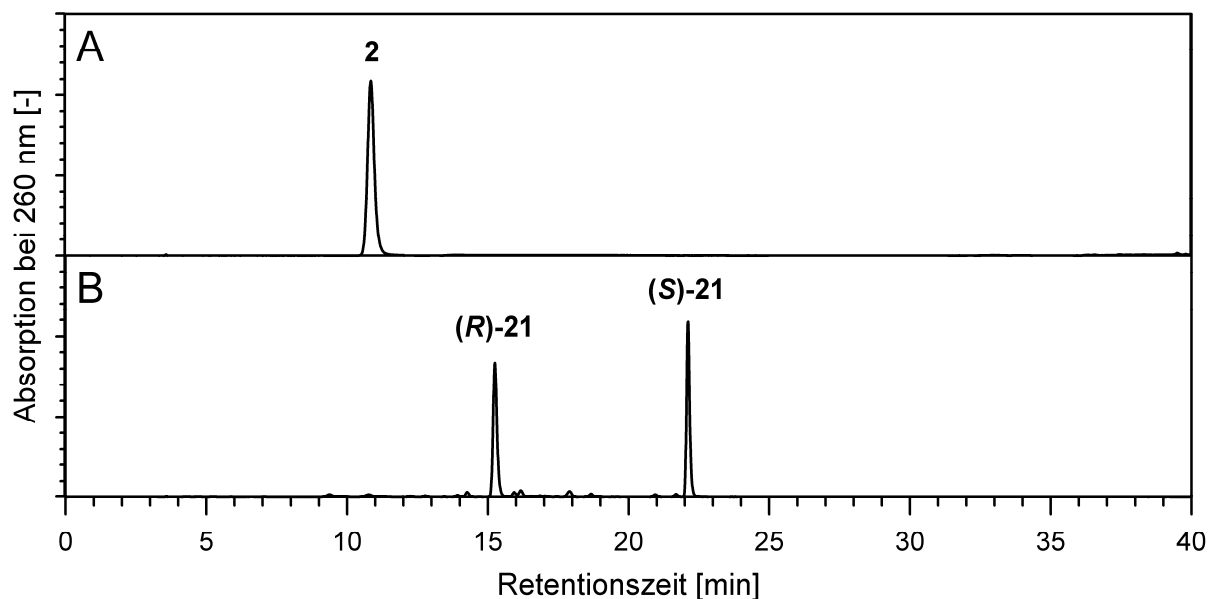


Abbildung 30. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) der Reaktionsmischung von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 2 mmol) und DL-Glycerinaldehyd (6 mmol) nach (A) 0 Tagen und (B) 10 Tagen bei 40 °C in Phosphatpuffer (5 mL, 1 mol/L, pH 7,0).

Die beiden isolierten Hauptprodukte zeigten nahezu identische spektroskopische Daten, was auf die Bildung von Diastereomeren hindeutete. Insbesondere die Auswertung der NMR-Spektren ergab, dass es sich bei den im Modellansatz generierten Verbindungen tatsächlich um (*R*)- und (*S*)-**21** handelte. Ein möglicher Bildungsmechanismus wurde bereits für das 2'-Desoxyguanosinderivat postuliert^[115] und ist in adaptierter Form in **Abbildung 31** illustriert. Dabei wird im ersten Schritt DL-Glycerinaldehyd (**I**) nach Umlagerung in das Enol (**II**) in die vinyloge Verbindung (**III**) dehydriert (**Abbildung 31**). Das intermediär gebildete Methylglyoxal (**IV**, **Abbildung 31**) wird im wässrigen Medium spontan an der Aldehydfunktion rehydriert (**V**, **Abbildung 31**), was in einer verminderten Reaktivität an dieser Position resultiert. Dementsprechend wird bevorzugt die Ketofunktion des Dicarbonyls unter Bildung einer Schiff'schen Base (**VI**, **Abbildung 31**) substituiert. Nach Umlagerung über das Enamin (**VII**, **Abbildung 31**) resultiert als stabiles Endprodukt eine α -Aminocarbonsäure (**21**). Da der letzte Schritt nicht stereoselektiv verläuft, ergibt sich die Bildung eines C(2'')-Diastereomerengemisches (**Abbildung 29**).

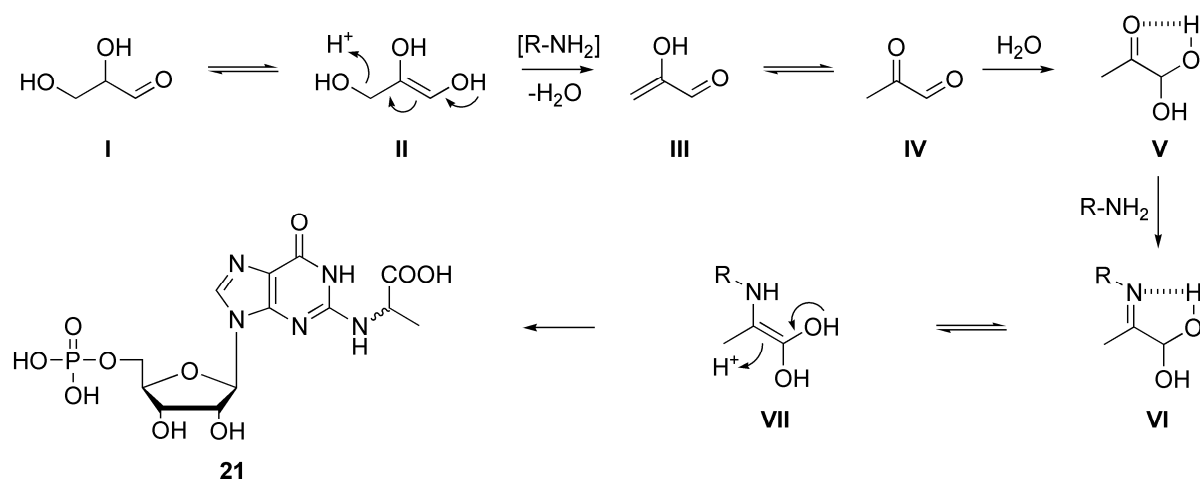


Abbildung 31. Postulierter Mechanismus für die Bildung des Diastereomerenpaares (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**).

Um die isolierte Struktur *N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) eindeutig von dem kürzlich publizierten Laktamid (**12**)^[29] abzugrenzen sowie Letzteres für folgende sensorische Experimente zur Verfügung zu haben, sollte dieses chemisch synthetisiert und spektroskopisch untersucht werden. Der in der Literatur beschriebene Synthesansatz (**Abbildung 32**) beinhaltet zunächst die Umsetzung von Guanosin (**I**) mit Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) in das persilylierte Derivat (**II**) um die Löslichkeit in den organischen Lösungsmitteln zu erhöhen. Weiterhin berichteten *Fan et al.* (2004), dass die Silylierung von *O*⁶ vor folgender Acylierung die Bildung polarer Verunreinigungen sowie eine starke Färbung der Lösung verhindert^[116]. Weiterhin bewirkt die Silylierung eine Beschleunigung der Aminoacylierung, was eine Reduzierung des benötigten Acylierungsreagenzes ermöglicht^[116]. Die in der Literatur^[29] beschriebene Umsetzung zum Milchsäureamid erfolgt mit 5-Methyl-1,3-dioxolan-2,4-dion (**III**, **Abbildung 32**), einem aktivierten Milchsäurederivat, das zuvor durch die Reaktion von Milchsäure (**IV**, **Abbildung 32**) und Trichlormethylchlorformiat (Diphosgen) synthetisiert wird^[117]. Nach Entfernung der TMS-Schutzgruppen durch Umesterung in Methanol und anschließender Phosphorylierung mittels Phosphoroxychlorid wird *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**) als Reinsubstanz erhalten.

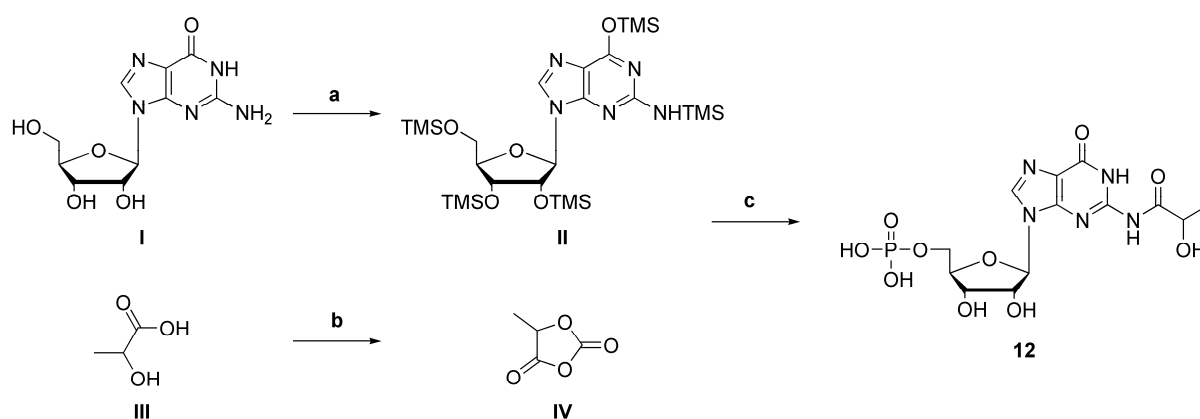


Abbildung 32. Synthese von *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**) nach *de Rijke et al., 2007*^[29]; Reagenzien: **a**) Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl), Pyridin, Dichlormethan; **b**) Trichlormethylchlorformiat, THF; **c**) **1**) MeOH; **2**) POCl₃, (MeO)₃PO.

Um die Verwendung des hochgradig toxischen Diphosgens zu vermeiden, wurde die Synthese wie in **Abbildung 33** dargestellt modifiziert. Anstelle von 5-Methyl-1,3-dioxolan-2,4-dion wurde das kommerziell erhältliche (*S*)-(-)-2-Acetoxypropionylchlorid als Acylierungsreagenz verwendet und mit dem zuvor persilylierten Guanosin (**II**, **Abbildung 33**) zur Reaktion gebracht. Nach Methanolyse wurde der Rohansatz mittels RP-MPLC aufgereinigt und *N*²-(*S*)-*O*-Acetyl-laktoyl-guanosin (**III**, **Abbildung 33**) als Zwischenprodukt erhalten. Dieses wurde zunächst zum *N*²-(*S*)-*O*-Acetyl-laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**24**) umgesetzt und dann mittels RP-HPLC aufgereinigt, um abschließend vorsichtig in wässrig-methanolischer K₂CO₃-Lösung zum *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**) hydrolysiert zu werden. Diese modifizierte Synthese bot darüber hinaus den Vorteil, dass für folgende sensorische Untersuchungen neben dem Laktamid auch das *O*-geschützte Derivat (**24**) zur Verfügung stand.

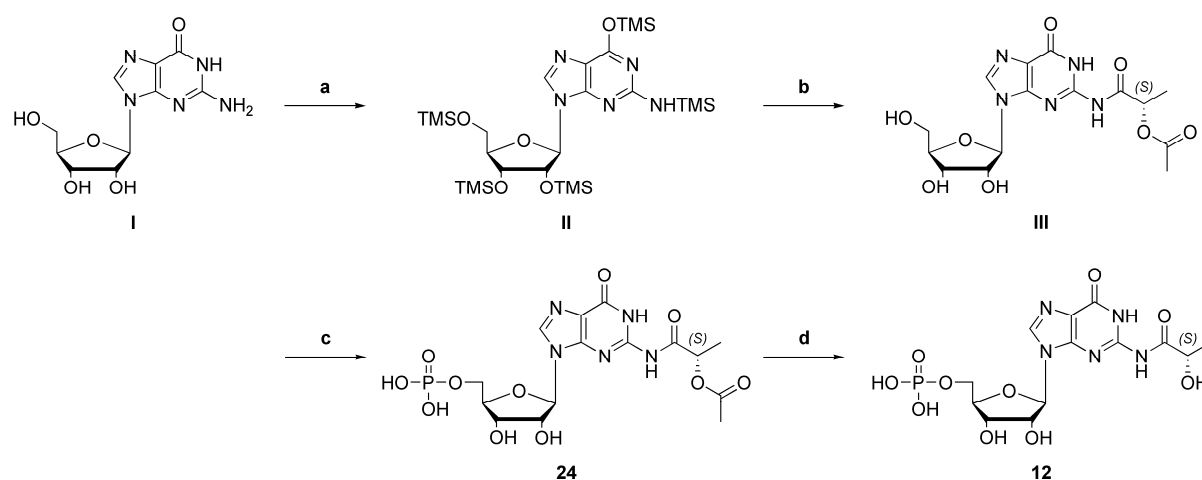


Abbildung 33. Modifizierte Synthese von N^2 -Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**), über das intermediäre *O*-acetylierte Derivat (**24**); Reagenzien: **a**) Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl), Pyridin, Dichlormethan; **b**) **1**) (*S*)-(-)-2-Acetoxypropionylchlorid; **2**) MeOH; **c**) POCl₃, (EtO)₃PO; **d**) K₂CO₃, MeOH, H₂O.

Das nach alkalischer Hydrolyse erhaltene Produkt **12** wurde nach entsprechender Aufreinigung mittels präparativer HPLC an einer Umkehrphase für die spektroskopischen Experimente verwendet. Dabei wurde der Syntheserfolg zunächst mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden bestätigt. So deutete die Bestimmung der exakten Masse durch TOF-MS auf ein Molekülion mit m/z 434,0716 hin. Das entsprach einer Elementarzusammensetzung von [C₁₃H₁₇N₅O₁₀P]⁻ die im Einklang mit der erwarteten Struktur stand. Die NMR-Daten zeigten eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur publizierten Daten ^[29].

Wie zu erwarten war, wiesen sowohl die Amid- als auch die α -Aminocarbonsäurestruktur nahezu identische massenspektrometrische- als auch ¹H-NMR-Daten auf. Eine Unterscheidung der beiden strukturell sehr ähnlichen Moleküle war jedoch über das ¹³C-NMR möglich.

Die Resonanzsignale der Zuckerkohlenstoffe wurden für beide Verbindungen bei ähnlichen chemischen Verschiebungen beobachtet. Während die Signale der Kohlenstoffe C(4') und C(5') aufgrund der Nachbarschaft des Phosphorkerns in beiden Fällen eine Aufspaltung zu einer Dublettmultiplizität aufwiesen, zeigten sich deutliche Unterschiede für die Verschiebung von C(2'') (**Abbildung 34, A** und **B**). Im Falle von (*S*)- N^2 -Laktoyl-5'-GMP (**12**) wurde das Resonanzsignal von C(2'') im tiefen Feld bei 70,8 ppm beobachtet (**Abbildung 34, A**). Dieses Kohlenstoffatom wies im Falle der α -Aminocarbonsäure (**(R)**-**21**) eine Verschiebung von 55,5 ppm auf (**Abbildung 34, B**). Eine ähnliche chemische Verschiebung wurde, wie zuvor bereits erwähnt, auch im Falle der Aminosäure L-Alanin beobachtet (δ C(2'') =

53,4 ppm), die in einer Messung der kommerziell erhältlichen Referenz bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen stellten einen finalen Beweis dar, dass es sich bei der aus dem Hefeextrakt isolierten Substanz eindeutig um eine Verbindung mit einem α -Aminocarbonsäurestrukturelement und nicht um das bereits publizierte Laktamid ^[29] (**12**) handelte.

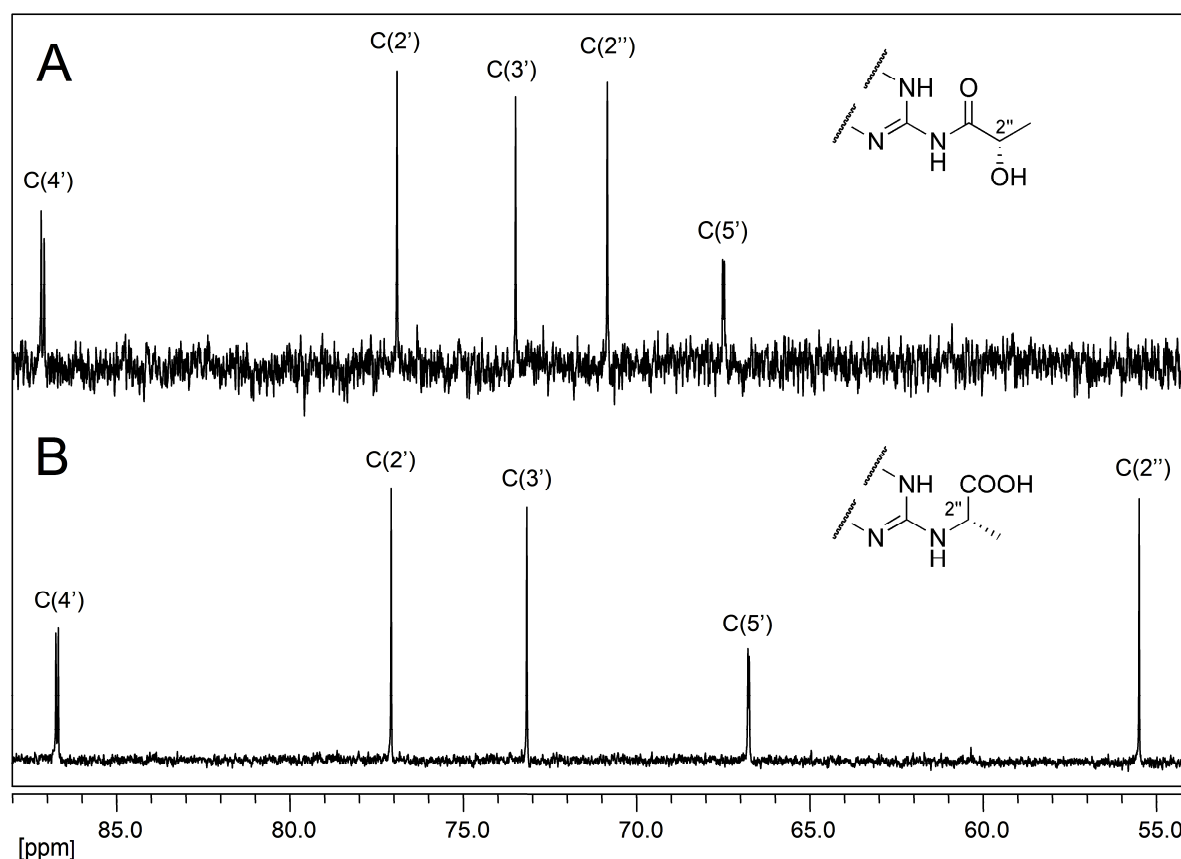


Abbildung 34. Ausschnitte aus den ^{13}C -NMR-Spektren von **A**: (*S*)- N^2 -Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (100 MHz, D_2O), **12** und **B**: (*R*)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$), (*R*)-**21** (**B**).

3.2.7 Stereochemische und sensorische Untersuchungen zu (*R*)- und (*S*)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat

Mit dem Ziel die absolute Stereochemie am chiralen Zentrum $\text{C}(2'')$ des Isolates (**21**) aus dem Hefeextrakt sowie der *Maillard*-Reaktionsprodukte zu klären, sollten diese mittels stereoselektiver Synthese hergestellt werden. Allerdings erwiesen sich die Versuche als wenig erfolgreich, weshalb ein indirekter Ansatz zur Bestimmung gewählt wurde. Dazu wurden zunächst das (*R*)- und (*S*)-Isomer von N^2 -(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**) hergestellt, die in der Literatur bereits erfolgreich synthetisiert und in ihrer

Absolutkonfiguration geklärt wurden ^[118]. Die in **Abbildung 35** dargestellte Synthese erfolgte dabei ausgehend von 2'-Desoxyguanosin (**I**), das zunächst an der Ketofunktion O^6 mittels Trimethylsilylethanol geschützt und anschließend mittels Fluorierung aktiviert wurde. Dieses reaktive Intermediat (**II**, **Abbildung 35**) wurde im letzten Schritt mit D- oder L-Alanin umgesetzt. Nach Hydrolyse der Schutzgruppe wurden die reinen Diastereomere (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**) erhalten.

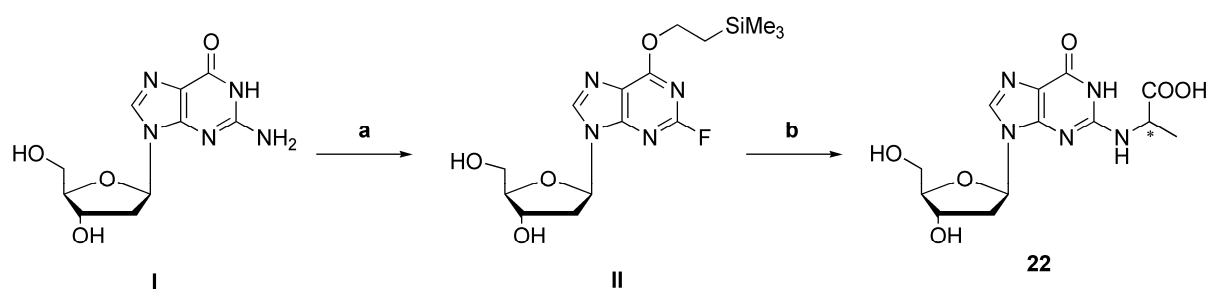


Abbildung 35. Stereospezifische Synthese von (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**) nach *Cao et al.*, 2007 ^[118]; Reagenzien: **a**) 1) (CH₃CO)₂, DMAP, Pyridin; 2) Ph₃P, Diethylazodicarboxylat, 2-Trimethylsilylethanol; 3) MeONa, MeOH; 4) HF, Pyridin, t-Butylnitrit; **b**) 1) L- oder D-Alanin, Diisopropylethylamin, DMSO; 2) Essigsäure (5 %-ig).

Zur Herstellung wurde, analog zu den 5'-GMP-Derivaten (**21**), 2'-Desoxyguanosin mit einer Triose, in diesem Falle 1,3-Dihydroxyaceton, umgesetzt. Nach erfolgreicher Isolierung der Zielverbindungen mittels präparativer HPLC wurden diese unter Anwendung verschiedener MS- und NMR-Techniken strukturell charakterisiert, wobei sich eine gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten ergab ^[115].

Anschließend erfolgte die Aufnahme der CD-Spektren der Einzelsubstanzen (*R*)- und (*S*)-**22** und ein Vergleich der erhaltenen Spektren (**Abbildung 36, A**) mit den in der Literatur publizierten Daten ^[118]. Es zeigte sich, dass unter den zur HPLC-Analyse gewählten Bedingungen das (*R*)- vor dem (*S*)-Isomer eluierte.

Trotz fehlender Phosphatgruppe und dem Fehlen des zusätzlichen chiralen Zentrums an C(2') des Ribosegrundgerüsts, wurden die CD-Spektren der isolierten Verbindungen (*R*)- und (*S*)-**21** (**Abbildung 36, B**) mit denen der 2'-Desoxyguanosinderivate (**22**) verglichen, um Hinweise auf die mögliche Konfiguration zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass das unter den gewählten HPLC-Bedingungen früher eluierende Diastereomer des 5'-GMP (**2**)-Ansatzes eine analoge Orientierung der CD-Kurve wie (*R*)-**22** aufwies, mit einem positiven Absorptionsmaximum bei 249 nm und einem negativen Maximum bei 282 nm. Das später eluierende Diastereomer zeigte dagegen eine spiegelverkehrte Orientierung mit einem negativen Maximum bei 249 nm und einem positiven bei 282 nm (**Abbildung 36, B**).

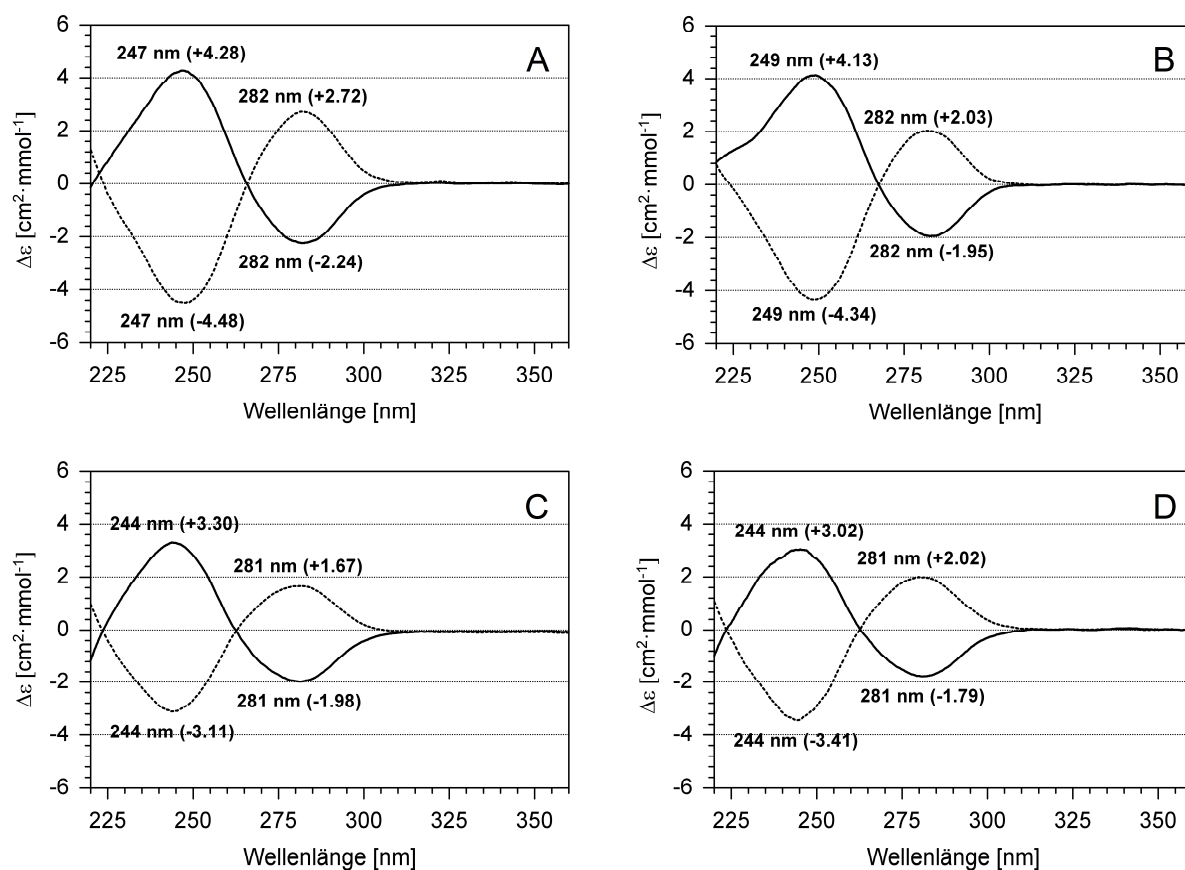


Abbildung 36. Circulardichroismus (CD)-Spektren von **A:** N^2 -(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**); **C:** den resultierenden Hydrolyseprodukten N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanin (**25**); **B:** N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**) und **D:** den resultierenden Hydrolyseprodukten N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanin (**25**). Durchgehende Linien repräsentieren das (R)-, gepunktete Linien das (S)-Diastereomer.

Nachdem die Messung der CD-Spektren bereits erste Hinweise auf die Elutionsreihenfolge und die Stereochemie der 5'-GMP (**2**)-Derivate ergab, sollte im Folgenden ein eindeutiger Beweis erbracht werden, um die getroffenen Vermutungen zu untermauern. Deshalb wurden sowohl (R)- und (S)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((R)-, (S)-**21**), als auch (R)- und (S)-**22** einer sauren Hydrolyse zur selektiven Spaltung der Zuckerreste unterzogen, was zur Bildung der Enantiomeren (R)- und (S)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanin (**25**) führte (**Abbildung 37**). Dazu wurden unabhängig voneinander die jeweiligen (R)- und (S)-Diastereomere der carboxyethylierten Derivate (**21**, **22**) bei 100 °C in Salzsäure (1 mol/L) hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass die Diastereomeren jeweils in Enantiomere überführt wurden, die sich chromatographisch unter den gewählten Bedingungen nicht mehr trennen ließen. Die endgültige Strukturverifizierung erfolgte nach Entfernen des Lösungsmittels und anschließender wiederholter Lyophilisation mittels NMR und MS. Dabei zeigte sich, dass aus allen vier Ansätzen **25** isoliert wurde (**Abbildung 37**).

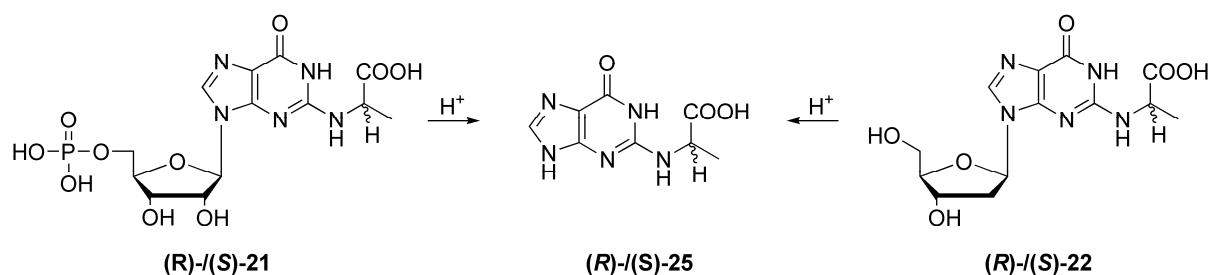


Abbildung 37. Schematische Darstellung der sauren Hydrolyse von (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**) sowie (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**) unter Bildung der gemeinsamen Hydrolyseprodukte (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanin (**25**).

Um nun zu prüfen ob es während der Hydrolyse zu einer Racemisierung des chiralen Zentrums gekommen war, wurden die Hydrolysate ebenfalls mittels CD-Spektroskopie vermessen und die erhaltenen Spektren mit denen der Edukte verglichen. Es ergab sich, dass die Hydrolyseprodukte von **22** mit bekannter Absolutkonfiguration die gleichen Vorzeichen des CD-Effektes aufwiesen wie die Ausgangsverbindungen (**Abbildung 36, A** und **C**). Dies war ein Beleg dafür, dass die saure Hydrolyse keinen Einfluss auf die Stereochemie an C(2'') nahm. Mit diesem Wissen war es danach möglich auch die Stereochemie von (*R*)- und (*S*)-**21** eindeutig zu klären, da über die CD-Spektren der Hydrolyseprodukte (**Abbildung 36, D**), die nahezu identisch waren mit denen der Hydrolysate von **22**, eine eindeutige Zuordnung der Absolutkonfiguration an C(2'') der Ausgangsverbindung getroffen werden konnte. Somit wurde erfolgreich geklärt, dass unter den gewählten HPLC Bedingungen (*R*)-**21** vor dem korrespondierenden (*S*)-konfigurierten Isomer eluiert (**Abbildung 30**).

Um die sensorische Aktivität der isolierten, aus der *Maillard*-Reaktion erhaltenen Derivate *N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosine-5'-monophosphat (**21**) zu untersuchen, wurden deren Schwellenwerte für den Umamigeschmackseindruck in Wasser (pH 6,0) sowie deren Geschmacksverstärkung in Gegenwart von MSG (**1**) bestimmt (**Tabelle 8**).

Während das (*R*)-konfigurierte Isomer (*R*)-**21** einen Umamischwellenwert von 0,85 mmol/L aufwies, zeigte das korrespondierende (*S*)-Derivat (*S*)-**21** eine deutlich niedrigere Schwelle von 0,19 mmol/L, die im Bereich des Ausgangsmoleküls 5'-GMP (**2**) anzusiedeln war (**Tabelle 8**). Da sich die beiden Isomere ausschließlich in der Konfiguration an C(2'') unterschieden, deutete sich bereits hier der entscheidende Einfluss der Konfiguration in der neuformierten Seitenkette auf die Geschmacksaktivität der Verbindungen an.

Neben dem Vergleich des intrinsischen Geschmacks der Nukleotide war es von besonderem Interesse zu prüfen, ob die Veränderung der chemischen Struktur auch mit einer Veränderung des synergistischen Effektes auf den Geschmack von MSG (**1**) einherging. Dazu wurde ein Isoumamitest durchgeführt. Hierfür wurde eine binäre Lösung des

Nukleotids (0,1 mmol/L) und MSG (**1**, 10 mmol/L) in ihrer Intensität mit Lösungen steigender Konzentration an **1** verglichen bis eine sensorische Äquivalenz der beiden Lösungen festgestellt wurde. Wiederum zeigte sich, wie in **Tabelle 8** dargestellt, eine deutliche Differenz zwischen den beiden Isomeren. Während das Ausgangsnukleotid 5'-GMP (**2**) von den Panelisten mit einer Isointensität von 45 mmol/L bewertet wurde, zeigte (**R**)-**21** eine deutlich herabgesetzte Aktivität mit einem Wert von 25 mmol/L, wohingegen die Lösung von (**S**)-**21** äquivalent mit der von 5'-GMP (**2**) bewertet wurde (**Tabelle 8**).

Tabelle 8. Umamigeschmacksschwellenwerte und Isoumamikonzentration von Guanosin-5'-monophosphat (**2**) und den isolierten *N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**)-Isomeren

Verbindung (Nr.)	2 ^a	(R)- 21	(S)- 21
Schwellenwert ^b (mmol/L)	0,15	0,85	0,19
Isoumamikonzentration ^c (mmol/L)	45	25	45

^a Dinatriumsalz. ^b Bestimmt in Wasser (pH 6,0) im Triangeltest. ^c Isoumamikonzentration wurde im Duo-Test bestimmt durch Vergleich der Intensitäten einer wässrigen binären Lösung (pH 6,0) des Nukleotids (0,1 mmol/L) und MSG (**1**, 10 mmol/L) mit denen reiner MSG (**1**)-Lösungen (10-100 mmol/L, 5 mmol/L Schritte; pH 6,0).

3.2.8 Diskussion

Die aktivitätsorientierte Fraktionierung des untersuchten, nukleotidreichen Hefeextraktes **3** führte zur Identifizierung einer Vielzahl geschmacksmodulierender Fraktionen. Dabei waren insbesondere jene Fraktionen mit geringem Eigengeschmack von Interesse, die einen ausgeprägten umamiverstärkenden Effekt in einer glutamathaltigen Matrix aufwiesen, obwohl sie keine der bisher bekannten geschmacksmodulierenden Nukleotide enthielten.

Durch die Kombination chromatographischer und humansensorischer Techniken gelang die Isolierung zweier Dinukleotide, deren Strukturen eindeutig mittels verschiedener NMR-Techniken geklärt wurden. Die Verbindungen Cytidylyl-(5'→3')-uridin-5'-monophosphat (**19**) und Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat (**20**) wurden bislang noch nicht als geschmacksaktive Metabolite beschrieben. Deren sensorische Aktivität wurde insbesondere im Hinblick auf die geschmacksverstärkenden Eigenschaften untersucht. Beide Verbindungen wiesen einen modulierenden Effekt auf die verwendete Glutamatmatrix bei einer Schwellenwertkonzentration von etwa 20 µmol/L auf.

Aus einer weiteren Fraktion gelang mittels gezielter Isolierung von Verbindungen deren Struktur auf das Puringerüst von 5'-GMP (**2**) zurückzuführen war, die erstmalige Identifizierung von (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**) in Hefeextrakten. Anschließende Modellansätze deuteten die Bildung von **21** im Zuge der *Maillard*-Reaktion von 5'-GMP (**2**) mit Triosen bzw. intermediär gebildetem Methylglyoxal an.

Um die Verbindung **21** eindeutig von dem isobaren, in der Literatur bereits beschriebenen *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**12**) zu differenzieren, wurde letztgenannte Verbindung zunächst synthetisiert und anschließend mit Hilfe von NMR-Spektroskopie mit den isolierten Substanzen aus dem *Maillard*-Ansatz (**21**) sowie dem Isolat aus dem Hefeextrakt verglichen. Hierbei zeigte sich insbesondere durch Vergleich der chemischen Verschiebungen von C(2'') eindeutig, dass es sich bei den isolierten Verbindungen um Substanzen mit einer α -Aminocarbonsäurestruktur und nicht um die entsprechenden Laktamide handelte.

Um die Strukturaufklärung von **21** abzusichern, war es abschließend notwendig die Konfiguration am neuformierten, chiralen Zentrum C(2'') zu klären. Dieses wurde auf einem indirekten Weg erbracht, da sich die Synthese der reinen Diastereomere (**R**)-**21** und (**S**)-**21** als äußerst komplex erwies. Dabei gelang es durch Vergleich der CD-Spektren mit denen der diastereomerenreinen, strukturanalogen Verbindungen (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**) sowie durch Abgleich der resultierenden Hydrolyseprodukte **25** eindeutig die stereochemischen Charakteristika von (**R**)- und (**S**)-**21** zu klären.

Die besondere Relevanz der Stereochemie zeichnete sich in folgenden sensorischen Untersuchungen ab. Beide Verbindungen zeigten zwar einen intrinsischen Umamigeschmack in wässriger Lösung, allerdings lag der Schwellenwert für (**R**)-**21** mit 0,85 mmol/L deutlich über dem von (**S**)-**21** (0,19 mmol/L). Derselbe Trend ergab sich ebenfalls bei den geschmacksverstärkenden Eigenschaften der Verbindungen in einer Glutamatmatrix. Dabei erwies sich erneut (**S**)-**21** als aktiveres der beiden Diastereomere mit einem ähnlich ausgeprägten Effekt wie 5'-GMP (**2**).

Zusammenfassend führte die Untersuchung des Hefeextraktes **3** zur Identifizierung verschiedener Sensometabolite, wobei es insbesondere gelang die *Maillard*-Reaktion als eine der möglichen Schlüsselreaktionen zur strukturellen Modifikation des wertgebenden Hefeextraktinhaltsstoffes 5'-GMP (**2**) zu identifizieren. Deshalb wurde im Folgenden ein besonderer Fokus auf glykierte 5'-GMP-Derivate gelegt, da deren Bildung im Zuge der Hefeextraktherstellung als wahrscheinlich erschien und zum anderen bislang kaum Daten zur thermisch induzierten Transformation von **2** existierten.

3.3 Systematische Studien zur Struktur, Bildung und sensorischen Eigenschaft glykierter Nukleotide

Da Studien zur *Maillard*-Reaktion des geschmacksverstärkenden und für Hefeextrakte wertgebenden Nukleotids 5'-GMP (**2**) und Daten zur Geschmacksaktivität der resultierenden Transformationsprodukte bisher nur unzureichend bzw. nicht vorhanden waren, sollte das Purinderivat in einfachen Modellsystemen mit Glyoxal, Erythrose, Ribose, Glukose sowie Maltose inkubiert werden. Die vollständige Charakterisierung der resultierenden Produkte sollte mittels spektroskopischer und sensorischer Methoden erfolgen.

3.3.1 *N*²-(1-Carboxyalkyl)-5'-GMP-Derivate aus der Reaktion von 5'-GMP mit Dicarbonylen

Zunächst sollte das Dicarbonyl Glyoxal - ein typisches kurzkettiges und hochreaktives Zuckerabbauprodukt (siehe **Abbildung 10**) - mit 5'-GMP (**2**) zur Reaktion gebracht werden. Dazu wurde eine Literaturvorschrift zur Reaktion von Guanosin ^[39] dahingehend modifiziert, dass 5'-GMP (**2**) in wässrigem Phosphatpuffer bei pH-Werten von 6,0, 7,0 und 8,0 mit Glyoxal inkubiert und der Reaktionsverlauf mittels analytischer RP-HPLC verfolgt wurde (**Abbildung 38**). Während bei pH 6,0 (**Abbildung 38, A**) ein vergleichsweise komplexes Chromatogramm beobachtet wurde, führte eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7,0 (**Abbildung 38, B**) zu einer vermehrten Bildung des Reaktionsproduktes **26**, das ein ähnliches UV-Spektrum wie 5'-GMP (**2**) aufwies. Eine leichte Alkalisierung des Reaktionsmediums (pH 8,0) erwirkte sogar eine nahezu ausschließliche Bildung von **26** (**Abbildung 38, C**), weshalb diese Reaktionsbedingungen zur Herstellung der Zielverbindung im präparativen Maßstab verwendet wurden.

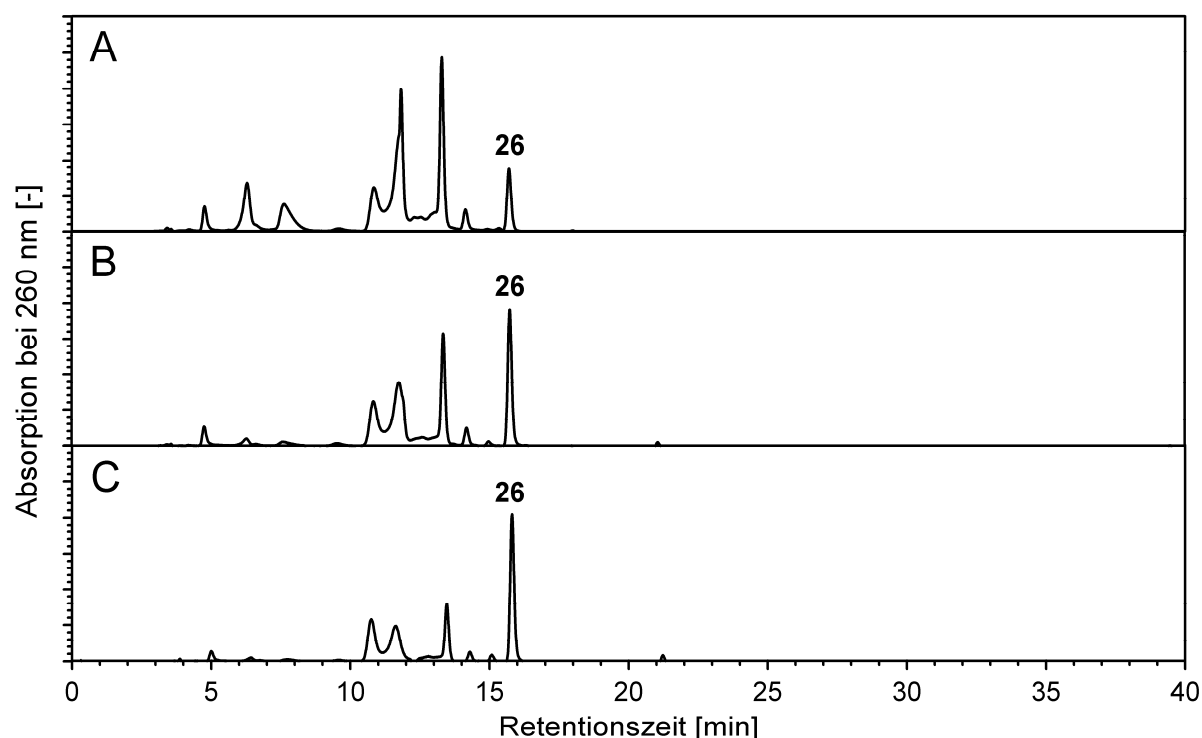


Abbildung 38. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) der Reaktionsgemische von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) und Glyoxal (~2 mmol) in wässrigen Phosphatpufferlösungen (10 mL, 1 mol/L) bei pH 6 (**A**), pH 7 (**B**) und pH 8 (**C**) nach 24 Stunden bei 70 °C.

Verbindung **26** wurde anschließend an einer C_{18} -Umkehrphase aufgereinigt und die chemische Struktur mittels LC-MS, LC-TOF-MS und 1D/2D-NMR Experimenten geklärt. Die Bestimmung der exakten Masse mittels LC-TOF-MS implizierte eine Elementarzusammensetzung von $C_{12}H_{16}N_5O_{10}P$, wobei ein Massenzuwachs von 58 Da gegenüber der Ausgangsverbindung 5'-GMP (**2**) auf die Addition eines Moleküls Glyoxal hindeutete.

Die Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie in $D_2O/NaOD$ ergaben die Anwesenheit von neun Protonen, die keinem H/D Austausch im protischen Lösungsmittel unterlagen (**Abbildung 39**). Das Signal für H-C(2') war im 1H -NMR durch das Wassersignal überdeckt.

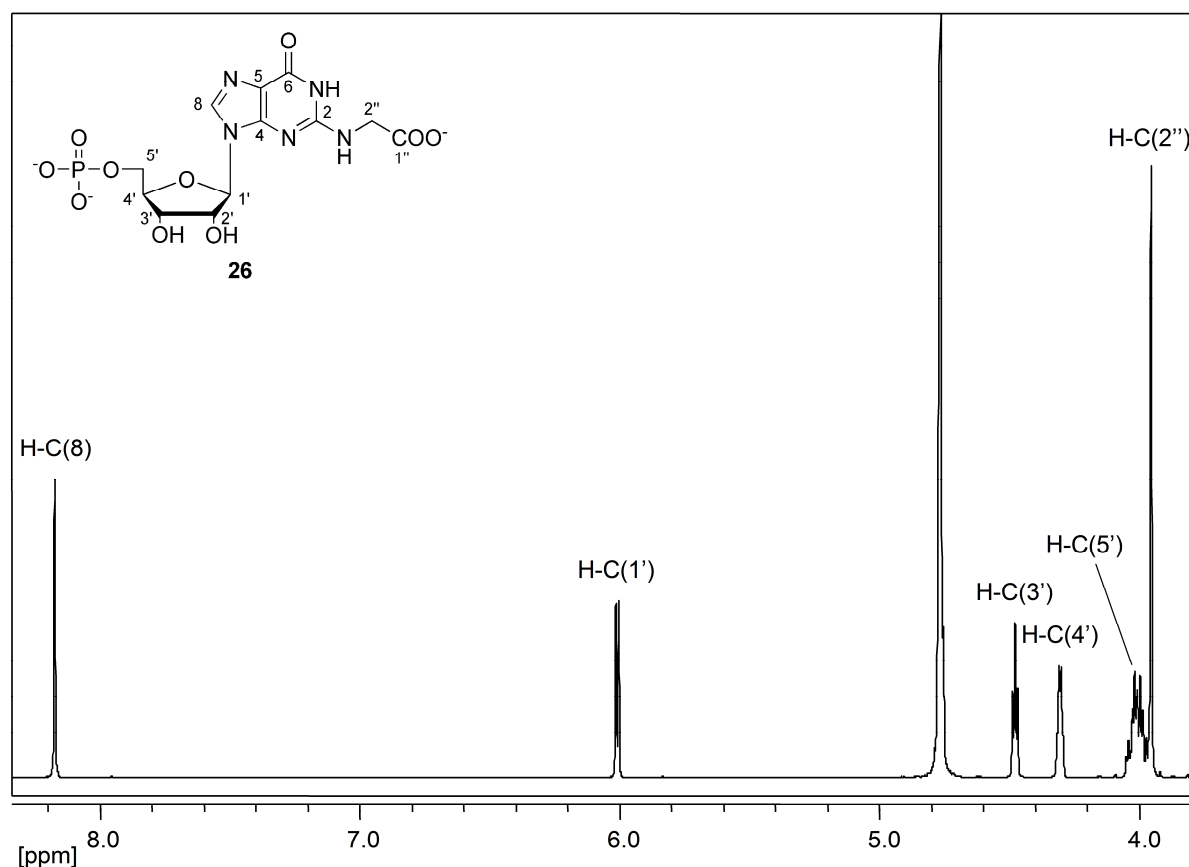


Abbildung 39. ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O/NaOD) von *N*²-Carboxymethyl-guanosin-5'-monophosphat (**26**), isoliert aus dem Modellansatz von Guanosin-5'-monophosphat (**2**) mit Glyoxal. Die Nummerierung der Protonen bezieht sich auf die abgebildete Struktur.

Neben den typischen Signalen des Nukleotids 5'-GMP (**2**) zeigte sich bei 3,96 ppm ein weiteres Singulett, dessen Integral von zwei Protonen die Anwesenheit einer tieffeldverschobenen Methylengruppe andeutete.

Die Messung des ¹³C-NMR-Spektrums verifiziert die Gegenwart von zwölf Kohlenstoffatomen und eines intakten Phosphatrestes, der durch die Kopplungen des Phosphorkernes mit den benachbarten Kohlenstoffatomen des Riboserestes C(4') und C(5') eindeutig zugeordnet wurde (**Abbildung 40**). Durch Abgleich mit den Signalen des Purinnukleotids 5'-GMP (**2**) zeigte sich, dass zusätzlich zwei weitere Signale detektiert wurden. Neben einem tieffeldverschobenen Signal bei 180,5 ppm, das auf die Carboxyfunktion C(1'') hindeutete, wurde ein weiteres Signal bei 47,8 ppm beobachtet, das aus dem Methylenkohlenstoffatom C(2'') resultierte.

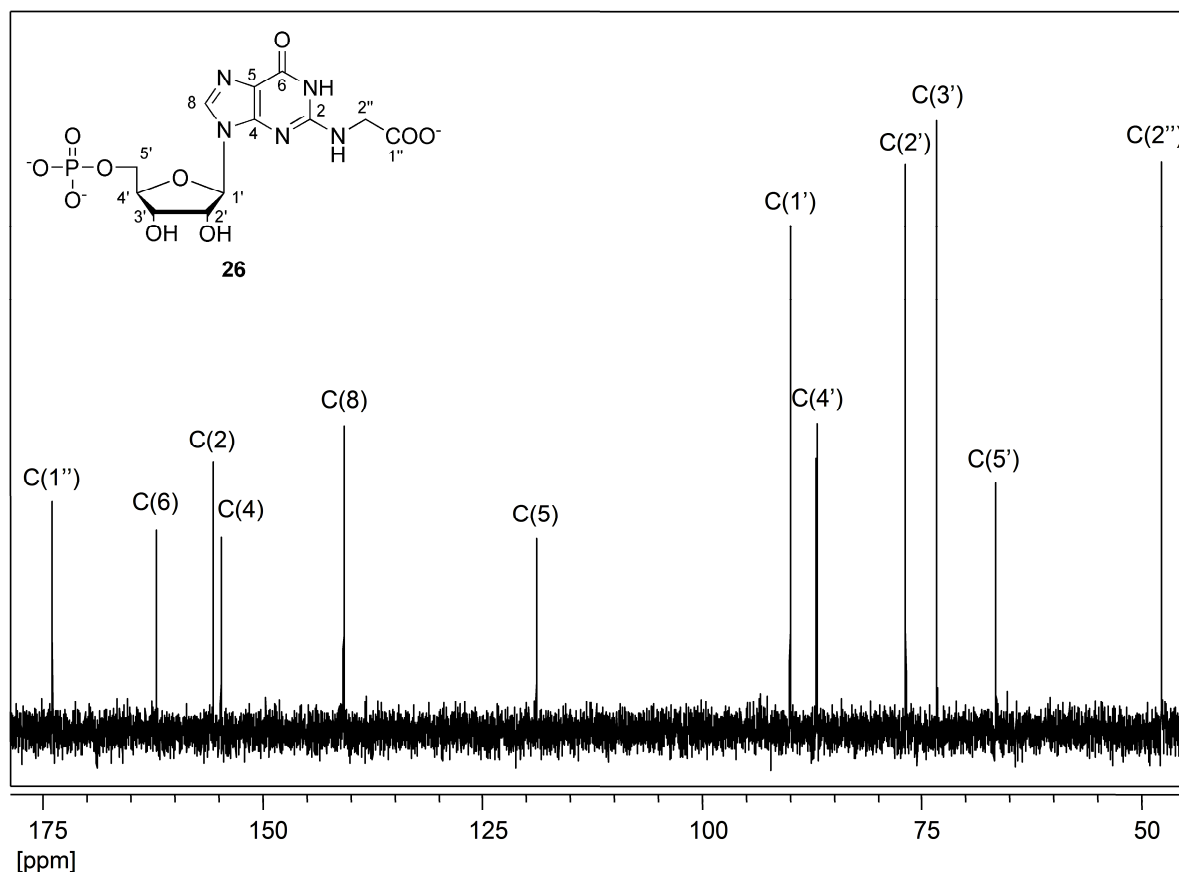


Abbildung 40. ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$) von N^2 -Carboxymethyl-guanosin-5'-monophosphat (**26**), isoliert aus dem Modellansatz von Guanosin-5'-monophosphat (**2**) und Glyoxal. Die Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die abgebildete Struktur.

Um die Strukturaufklärung zu finalisieren, wurde die isolierte Substanz homo- und heteronuklearen 2D-NMR-Experimenten unterzogen. Dabei zeigte sich neben den Signalen des Nukleotids die tieffeldverschobene Methylengruppe $\text{H-C}(2'')$ bei 3,96 ppm, die sowohl eine schwache C,H-Kopplung zum Kohlenstoffatom C(2) des heteroaromatischen Puringrundkörpers bei 155,6 ppm, als auch eine zur Carboxyfunktion C(1'') bei 180,5 ppm aufwies. Somit konnte, insbesondere nach Vergleich der Daten mit denen der strukturell eng verwandten Verbindung N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**), die aus dem Reaktionsansatz von 5'-GMP (**2**) mit Glyoxal isolierte Substanz als N^2 -Carboxymethyl-guanosin-5'-monophosphat (**26**) erstmals identifiziert werden.

3.3.2 N^2 -(1-Carboxyalkyl)-5'-GMP-Derivate aus der Reaktion von 5'-GMP mit reduzierenden Kohlenhydraten

Um die Gruppe potentiell umamiverstärkender Substanzen für folgende sensorische Untersuchungen zu erweitern, wurde das Nukleotid 5'-GMP (**2**) mit den C_4 - C_6 Aldosen

Erythrose, Ribose und Glukose sowie dem reduzierenden Dissacharid Maltose in wässrigem Phosphatpuffer zur Reaktion gebracht.

3.3.2.1 Reaktion von 5'-GMP mit Erythrose

Im Falle des Erythrosereaktionsansatzes wurde eine 1:3-Mischung des Nukleotids und des Kohlenhydrates in Phosphatpuffer (1 mol/L, pH 7,0) bei 70 °C für 6 Stunden zur Reaktion gebracht. Dabei zeigte die Überprüfung des Reaktionsansatzes mittels analytischer HPLC die Bildung von zwei Hauptprodukten (**R**)-27a und (**S**)-27a (**Abbildung 41, A**). Diese konnten mittels präparativer Chromatographie an einer RP-18-Phase isoliert werden und standen danach in ausreichender Reinheit für spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung. Allerdings zeigten sich für beide Verbindungen doppelte Spektrensätze, was eindeutig anhand zweier Signale im Bereich des Guaninprotons H-C(8) zu identifizieren war. Anschließende Überprüfungen mittels analytischer HPLC bestätigten diese Vermutung und zeigten, dass sich nach der Isolierung der Verbindungen (**R**)-/(**S**)-27a ein Gleichgewicht mit den Verbindungen (**R**)-/(**S**)-27b eingestellt hatte (**Abbildung 41, B**).

Um zu überprüfen ob diese Verbindungen als Artefakte während des Gefriertrocknungsprozesses im wässrig-saurem Medium entstehen, wurden aliquote Teile der potentiell verunreinigten, isolierten Verbindung (**S**)-27a bei verschiedenen pH-Werten gelagert. Dabei wurden zum einen Bedingungen wie im Falle der Gefriertrocknung gewählt (1 % Ameisensäure in Wasser; pH 2,1) und zum anderen alkalische Bedingungen (0,1 mmol/L NaOH in Wasser). Die Analyse mittels HPLC zeigte keine Veränderung des Gleichgewichtes unter sauren Bedingungen (**Abbildung 41, C**), wohingegen das Transformationsprodukt (**S**)-27b unter alkalischen Bedingungen instabil zu sein schien und ausschließlich ein Signal für (**S**)-27a erhalten wurde (**Abbildung 41, D**).

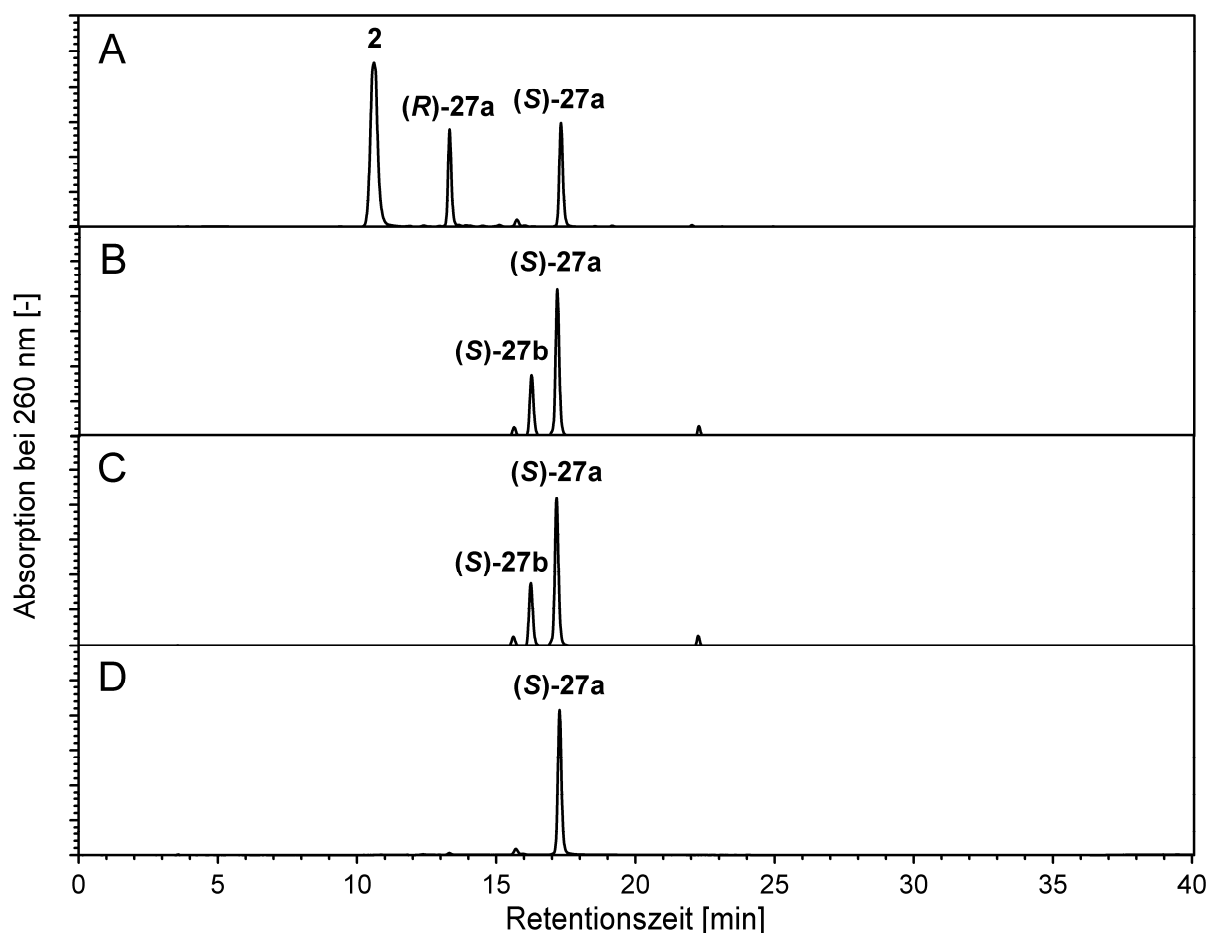


Abbildung 41. RP-HPLC-Chromatogramme ($\lambda = 260$ nm) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) und Erythrose (3 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) nach 6 Stunden bei 70 °C (**A**), der aufgereinigten und lyophilisierten Verbindung (*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**S**)-**27a**) gelöst in Wasser (**B**), (**S**)-**27a** gelöst in 1 %-iger, wässriger Ameisensäure (pH 2,1, **C**), und (**S**)-**27a** gelöst in wässriger Natriumhydroxidlösung (0,1 mmol/L, **D**).

Um einen ersten Einblick in die chemische Struktur der unbekannteten Verbindungen (**R**)-/(**S**)-**27a** zu gewinnen, wurden diese mittels LC-TOF-MS auf ihre exakte Masse hin untersucht. Dabei ergaben sich für beide Substanzen nahezu identische Ergebnisse, die auf eine Elementarzusammensetzung von $C_{14}H_{20}N_5O_{11}P$ hindeuteten. Beim Vergleich mit der Zusammensetzung des Eduktes 5'-GMP (**2**) wies dies auf die Addition eines Erythrosemoleküls an das Purinnukleotid hin. Um allerdings eine finale Aussage über die chemische Struktur treffen zu können und einen tieferen Einblick in die Umwandlungsreaktion unter Bildung der Verbindungen **27b** zu erhalten, wurden diverse NMR-Experimente durchgeführt.

Dazu wurde ein Gemisch aus (**S**)-**27a** und (**S**)-**27b** in D_2O gelöst und anschließend mittels 1H -NMR vermessen. Da es unter sauren Bedingungen zur Ausbildung des Gleichgewichtes

zwischen **(S)-27a** und **(S)-27b** kommt, konnten mit dieser Messung beide Strukturen untersucht werden (**Abbildung 42, A**), während in einer zweiten Messung nach Zugabe von NaOD unter alkalischen Bedingungen ausschließlich der Spektrensatz von **(S)-27a** vorlag (**Abbildung 42, B**).

Die NMR-Analyse der Messlösung nach Zugabe von NaOD (**Abbildung 42, B**) zeigte ausschließlich ein Signal im aromatischen Bereich, das bei einer chemischen Verschiebung von 8,07 ppm beobachtet und als H-C(8) identifiziert wurde. Das anomere Proton der Ribose erschien als Dublett bei 5,89 ppm, während die restlichen Protonen des Zuckers Resonanzen im Bereich zwischen 3,78 und 4,61 ppm aufwiesen. Zusätzlich wurden zwei Multipletts mit Integralen von jeweils einem Proton bei 1,86 und 2,06 ppm, ein komplexes Multiplett mit einer Intensität von zwei Protonen bei 3,65 ppm sowie ein Dublett vom Dublett bei 4,27 ppm mit Kopplungskonstanten von 4,6 und 9,0 Hz beobachtet.

Das entsprechende ^{13}C -NMR ergab die Präsenz von 14 Kohlenstoffatomen, von denen zwei eine Aufspaltung zu einer Dublettmultiplizität aufwiesen, mit Kopplungskonstanten von 4,6 bzw. 8,2 Hz. Diese konnten aufgrund der Kopplung zum Phosphorkern eindeutig als C(4') und C(5') der Ribose identifiziert werden.

Die Anwendung 2-dimensionaler homo- und heteronuklearer Korrelationsexperimente (COSY, HMQC, HMBC) erlaubte die Zuordnung der Signale bei 1,86-2,06 ppm als die der diastereotrop aufgespaltenen Methylengruppe H-C(3''), die homonukleare 2J -Kopplungen zu den bei 3,66 und 4,29 ppm detektierten Protonen H-C(4'') und H-C(2'') aufwiesen. Das HMBC-Experiment zeigte darüber hinaus heteronukleare Kopplungen von H-C(2''), was die eindeutige Identifizierung der Kohlenstoffatome C(3'') bei 32,8 ppm sowie C(4'') bei 58,2 ppm ermöglichte. Zusätzlich wurden heteronukleare C,H-Kopplungen zwischen dem Proton H-C(2'') und dem aromatischen Guaninkohlenstoff C(2) bei 153,5 ppm und ferner dem Carboxylkohlenstoff C(1'') bei 176,6 ppm beobachtet, was erneut die Anwesenheit einer α -Aminocarbonsäurestruktur bestätigte.

Somit wurden die beiden isolierten Verbindungen des Reaktionsansatzes (**Abbildung 41, A**) eindeutig als das Diastereomerenpaar (*R*)- und (*S*)- N^2 -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5'-monophosphat (**(R)-27a** und **(S)-27a**) identifiziert.

Während über das strukturell eng verwandte Guanosinderivat bereits in der Literatur als Produkt der *Maillard*-Reaktion von Guanosin und Ascorbinsäure berichtet wurde ^[119], wurde das glykierte Nukleotid bisher noch nicht beschrieben. Da die beiden Diastereomeren im Vergleich zu N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) kein zusätzliches chirales Zentrum aufwiesen, erfolgte die Zuordnung der Stereochemie an C(2'') auf einer Umkehrphase durch Vergleich mit der Elutionsreihenfolge der Diastereomeren **(R)-21** und **(S)-21**.

Um nähere strukturelle Informationen über die Transformationsprodukte **(R)-/(S)-27b** zu erhalten, wurden die Messungen in D₂O unter sauren pH-Bedingungen (pH-Wert ca. 2-3)

hinzugezogen. Dabei zeigte sich durch Integration der beiden im $^1\text{H-NMR}$ detektierbaren Guaninprotonen, dass unter den Messbedingungen ein 2:1 Gleichgewicht zwischen **(S)-27b** und **(S)-27a** vorlag (**Abbildung 42, A**).

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der unbekanntes Verbindung **(S)-27b** wies im Vergleich zu **(S)-27a** eine Tieffeldverschiebung für H-C(3'') auf, während das korrespondierende ^{13}C -Signal ins hohe Feld verschoben war. Darüber hinaus zeigte das Signal von H-C(2''), das in der Verbindung **(S)-27a** als Dublett vom Dublett beobachtet wurde, eine Triplettmultiplizität mit einer Kopplungskonstante von 10,2 Hz. Die Integration der verbleibenden Resonanzsignale ergab eine starke Tieffeldverschiebung der Methylengruppe H-C(4'') und eine Aufspaltung der Signale mit Resonanzen bei 4,49 und 4,71 ppm.

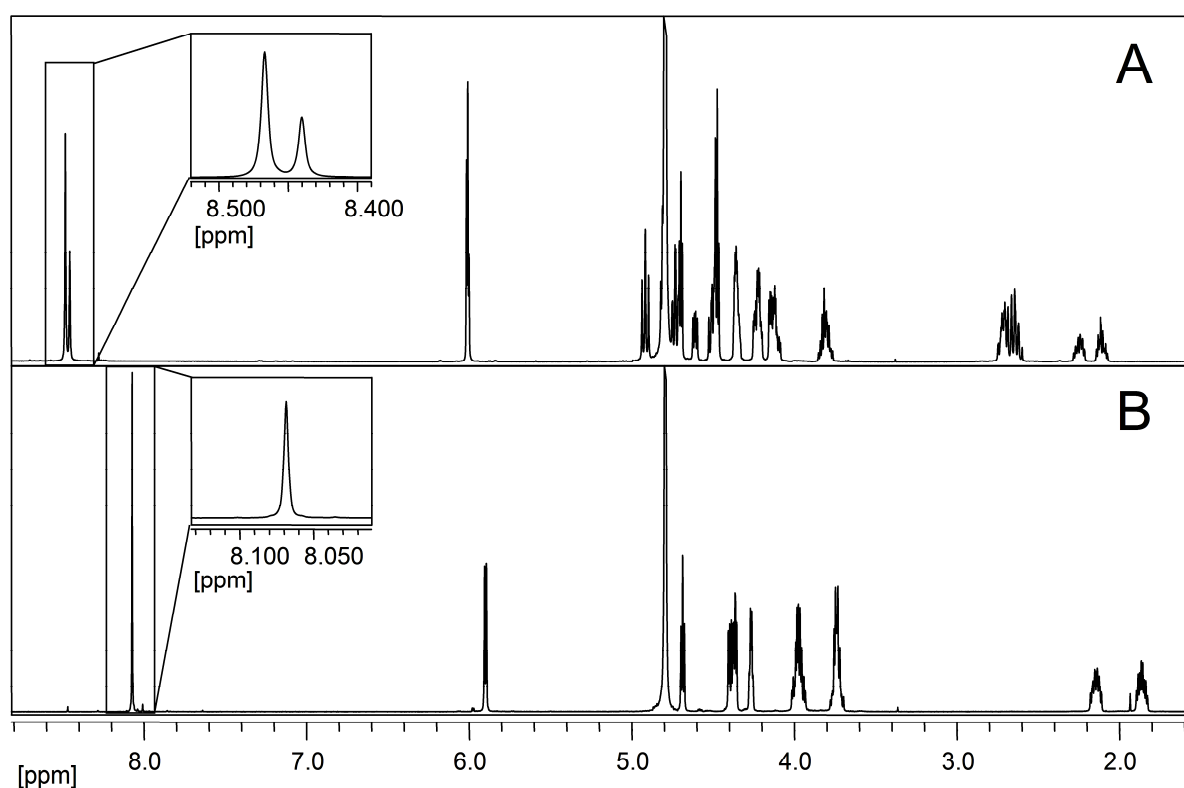


Abbildung 42. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz) von $(S)\text{-}N^2\text{-(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5'}$ -monophosphat (**(S)-27a**) in Deuteriumoxid (**A**), und in Deuteriumoxid nach Zugabe von 10 μL Natriumdeuteroxidlösung (40 % NaOD in D_2O), (**B**). Vergrößerte Ausschnitte zeigen die Resonanzsignale des aromatischen Protons H-C(8) des Guaninrestes.

Die Messung der exakten Masse von **(S)-27b** ergab eine Elementarzusammensetzung von $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}$, was auf die Abspaltung eines Wassermoleküls im Vergleich zu **(S)-27a** hindeutete.

In Anbetracht der spektroskopischen Daten sowie der bekannten Struktur der 4-Hydroxycabonsäure **(S)-27a** wurde die unbekannte Struktur als das entsprechende γ -Lakton **(S)-27b** identifiziert, was dessen Instabilität in alkalischer Lösung erklärt.

Zusammenfassend führte die Reaktion von 5'-GMP (**2**) mit Erythrose zur Bildung der α -Amino- γ -hydroxysäurederivate (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5-monophosphat (**(R)-27a**, **(S)-27a**, **Abbildung 43**), die sich in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit den entsprechenden α -Amino- γ -laktonen (*R*)-/(*S*)-*N*²-(Tetrahydro-2-oxofuran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat befanden (**(R)-27b**, **(S)-27b**, **Abbildung 43**).

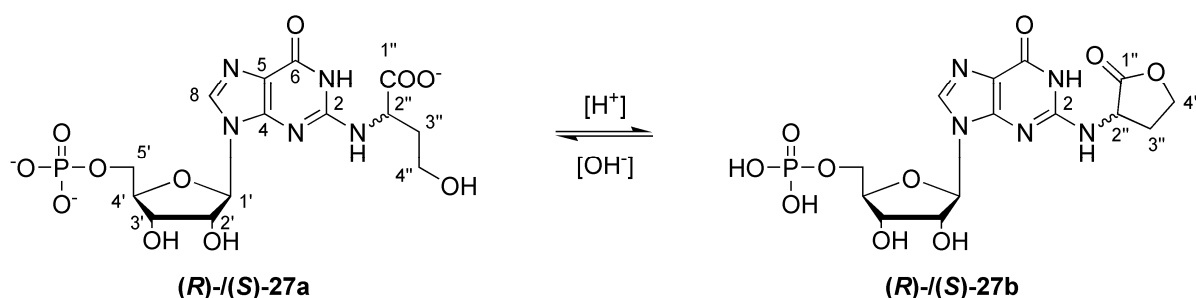


Abbildung 43. Schematische Darstellung des pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen den offenkettigen Derivaten (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5-monophosphat (**27a**) und deren entsprechenden Laktonen (*R*)-/(*S*)-*N*²-(Tetrahydro-2-oxofuran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat (**27b**).

3.3.2.2 Reaktion von 5'-GMP mit Ribose

Nach der erfolgreichen Identifizierung der Produkte aus der Reaktion von 5'-GMP (**2**) mit einer Tetrose sollte im nächsten Schritt das Nukleotid mit Ribose zur Reaktion gebracht werden. Aufgrund der herabgesetzten Reaktivität der Pentose gegenüber der Tetrose wurde L-Alanin zugesetzt, um die aminkatalysierte Dehydratisierung des Kohlenhydrates in das entsprechende Desoxyoson zu beschleunigen. Eine ternäre Mischung von 5'-GMP (**2**, 1 mmol), D-Ribose (5 mmol) und L-Alanin (1 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) wurde bei 70 °C inkubiert und der Reaktionsverlauf mittels analytischer HPLC verfolgt. Dabei zeigte sich die Bildung zweier Hauptprodukte **(R)-28a** und **(S)-28a** (**Abbildung 44**).

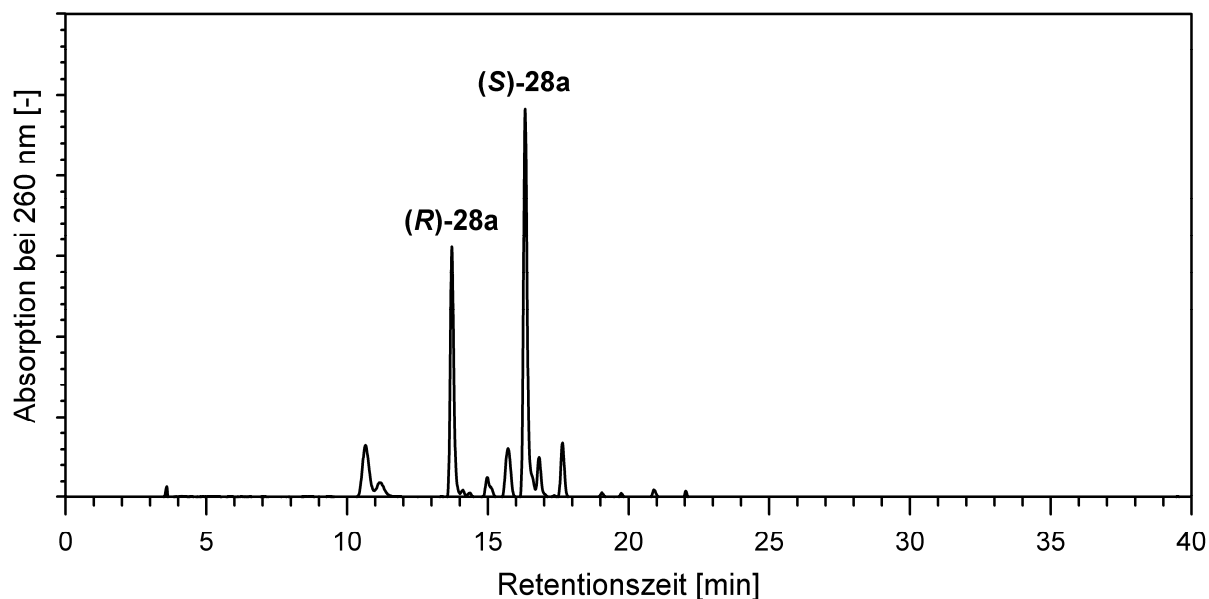


Abbildung 44. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260 \text{ nm}$) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol), D-Ribose (5 mmol) und L-Alanin (1 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) nach fünf Tagen bei 70 °C.

Nach fünf Tagen wurde die Reaktion gestoppt, die Lösung mit Wasser verdünnt und mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und wiederholter Lyophilisation wurden die Isolate mittels MS- und NMR-Experimenten untersucht.

In Analogie zu den isolierten Verbindungen (**R**)-/(**S**)-**21** und (**R**)-/(**S**)-**27a/b** wiesen beide Produkte (**R**)-/(**S**)-**28a** sehr ähnliche spektroskopische Daten auf, was wiederum auf die Bildung eines Diastereomerenpaares hindeutete. LC-MS- und LC-TOF-MS-Analysen ergaben eine Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}$, was die Addition eines Moleküls des entsprechenden Kohlenhydrates an das Nukleotid bestätigte.

Die ^1H -NMR-Spektren der Isolate zeigten neben den erwarteten Signalen der Guanylsäure zusätzlich fünf Protonensignale. Die zwei ins hohe Feld verschobenen Multipletts, deren Integrale jeweils auf ein Proton integriert wurden, wurden einer diastereotrop aufgespaltenen Methylengruppe (H-C(3'')) zugeordnet, für die eine homonukleare Kopplung mit H-C(2'') sowie eine heteronukleare Kopplung mit der Carboxyfunktion C(1'') beobachtet wurde. Weiterhin wurden zwei Dubletts vom Dublett mit Kopplungskonstanten von 11,8 Hz für die geminale Kopplung, und 6,5 bzw. 3,8 Hz für die 3J -Kopplungen als Signale bei 3,54 und 3,65 ppm beobachtet, die auf eine weitere diastereotrope Methylengruppe (H-C(5'')) hindeuteten. Diese zeigte homonukleare Kopplungen zu einem Multiplett im tiefen Feld bei 3,91 ppm (H-C(4'')) sowie heteronukleare Kopplungen zu C(4'') bei 72,3 ppm und C(3'') bei 38,0 ppm. Weiterhin wies H-C(2'') eine heteronukleare $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Kopplung zum Purinkohlenstoff C(2) auf, was die Verknüpfungsposition zwischen dem Nukleotid und dem

Glykierungselement klärte. Wiederum wurde die Anwesenheit des intakten Phosphatrestes mittels der aufgespaltenen Signale für C(4') und C(5') im ^{13}C -NMR bestätigt, was die Identifizierung der unbekanntenen Verbindungen als das Diastereomerenpaar (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-**28a** und (*S*)-**28a**) ermöglichte.

Analog zu dem beobachteten Gleichgewicht der α -Amino- γ -hydroxycarbonsäure **27a** und des entsprechenden γ -Laktons **27b** zeigten auch die isolierten Verbindungen **28** unter sauren Bedingungen die Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen offenkettiger (**28a**) und geschlossener Form (**28b**). Im ^1H -NMR wurde dies durch eine leichte Verschiebung ins tiefe Feld für die Signale des Glykierungsrestes sowie durch die Aufspaltung des komplexen Multipletts für H-C(3'') in zwei Signale mit Resonanzen bei 2,36 und 2,71 ppm erkennbar.

Somit gelang es im Reaktionsansatz von 5'-GMP (**2**) mit D-Ribose und L-Alanin die Diastereomere (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-**28a**, (*S*)-**28a**) zu identifizieren, die unter sauren Bedingungen im Equilibrium mit den entsprechenden Laktone (*R*)-/(*S*)-*N*²-(Tetrahydro-5-hydroxy-2-oxo-2*H*-pyran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-**28b**, (*S*)-**28b**) stehen (**Abbildung 45**).

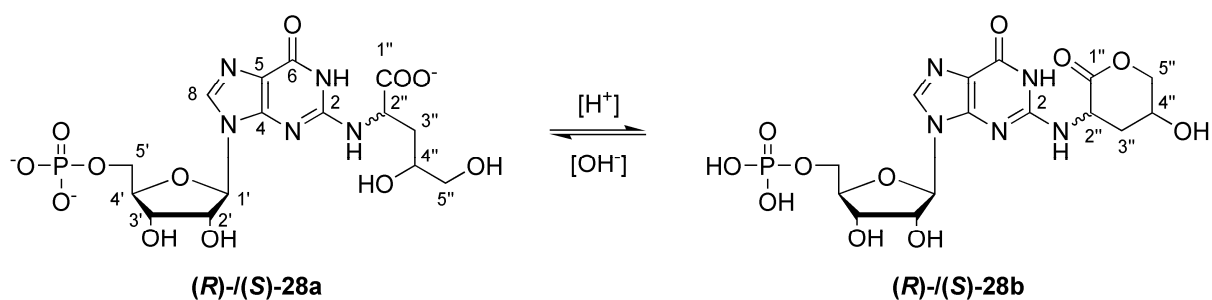


Abbildung 45. Schematische Darstellung des pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen den offenkettigen Derivaten (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat (**28a**) und deren entsprechenden Laktone (*R*)-/(*S*)-*N*²-(Tetrahydro-5-hydroxy-2-oxo-2*H*-pyran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat (**28b**).

3.3.2.3 Reaktion von 5'-GMP mit Glukose

Im nächsten Schritt wurde das Nukleotid mit der Hexose Glukose umgesetzt. Dazu wurde ein Gemisch aus 5'-GMP (**2**, 1 mmol), D-Glukose (5 mmol) und L-Alanin (1 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) bei 70 °C zur Reaktion gebracht. Wiederum wurde der Reaktionsverlauf mittels analytischer RP-HPLC verfolgt. Dabei zeigte sich die Bildung lediglich eines Hauptproduktes (**29a**, **Abbildung 46**). Dieser Befund war überraschend, da bisher in allen Fällen die Glykierungsreaktion mit der Bildung von Diastereomeren einherging.

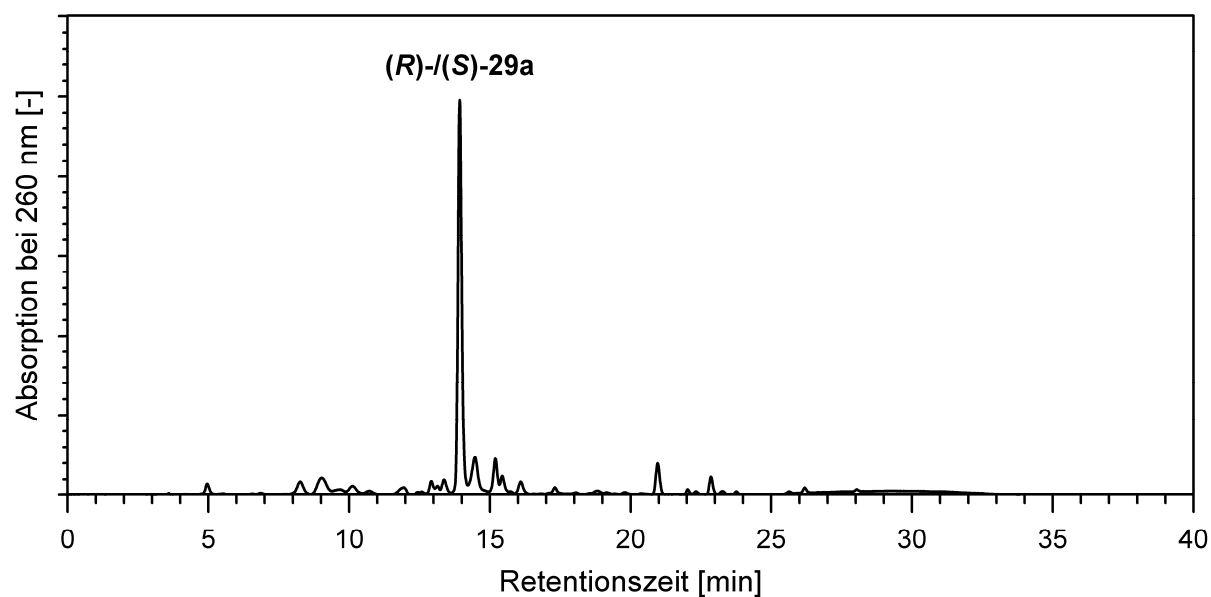


Abbildung 46. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol), D-Glukose (5 mmol) und L-Alanin (1 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7) nach 11 Tagen bei 70 °C.

Nach der Isolierung der unbekannt Substanz mittels präparativer Chromatographie, ergab die Bestimmung der exakten Masse mittels LC-TOF-MS eine Elementarzusammensetzung von $C_{16}H_{24}N_5O_{13}P$, was die Addition eines Moleküls Glukose an das Purinnukleotid zeigte. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass es sich um ein Gemisch aus zwei Substanzen handelte, die auf einer RP-18 Säule coeluierten. Allerdings war es weder durch Variation des HPLC Gradienten, noch durch die Veränderung der stationären Phase möglich die beiden Verbindungen voneinander zu trennen. Mittels 2-dimensionaler Korrelationsspektroskopie wurde allerdings die Komplexität der 1H - und ^{13}C -Spektren reduziert und die isolierten Verbindungen als (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-**29a**, (*S*)-**29a**) erfolgreich identifiziert (**Abbildung 47**). Da auch bei diesen Verbindungen die Bildung von Laktonstrukturen zu erwarten war ^[120], wurden ebenfalls Messungen unter sauren Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der 1H -NMR-Spektroskopie legten erneut die Bildung der entsprechenden Laktone (*R*)-**29b** und (*S*)-**29b** nahe, eine exakte Signalzuweisung war aufgrund der Komplexität der Spektrensätze jedoch nicht zweifelsfrei möglich.

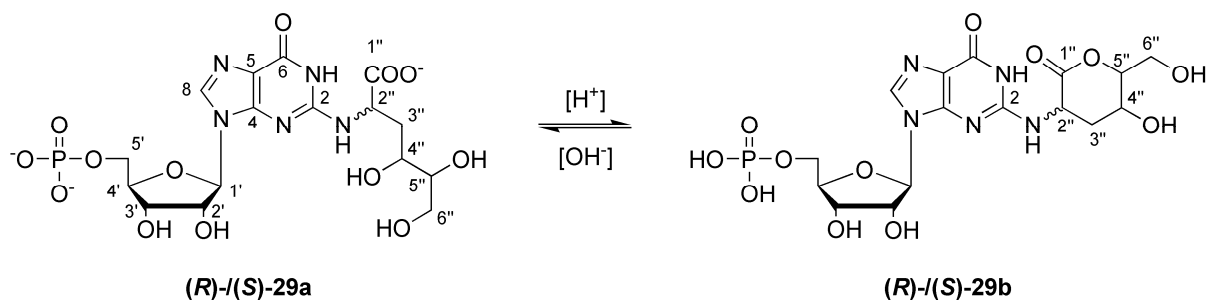


Abbildung 47. Schematische Darstellung des pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen den offenkettigen Derivaten *(R)/(S)-N²-(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-guanosin-5'-monophosphat (29a)* und deren entsprechenden Laktone *(R)/(S)-N²-(Tetrahydro-5-hydroxy-6-hydroxymethyl-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat (29b)*.

Weitere Modellexperimente mit 5'-GMP (**2**) und D-Glukose in Abwesenheit der Aminosäure wiesen auf die Bildung eines weiteren Reaktionsproduktes hin. Nach Optimierung der Reaktionsparameter wurde diese Verbindung aus einem Ansatz von D-Glukose (10 mmol) und 5'-GMP (**2**, 1 mmol) in Phosphatpuffer (1,25 mL, 1 mol/L, pH 7,0), der 4 Stunden bei 100 °C erhitzt worden war, in ausreichender Ausbeute generiert um eine präparative Isolierung zu ermöglichen (**Abbildung 48**).

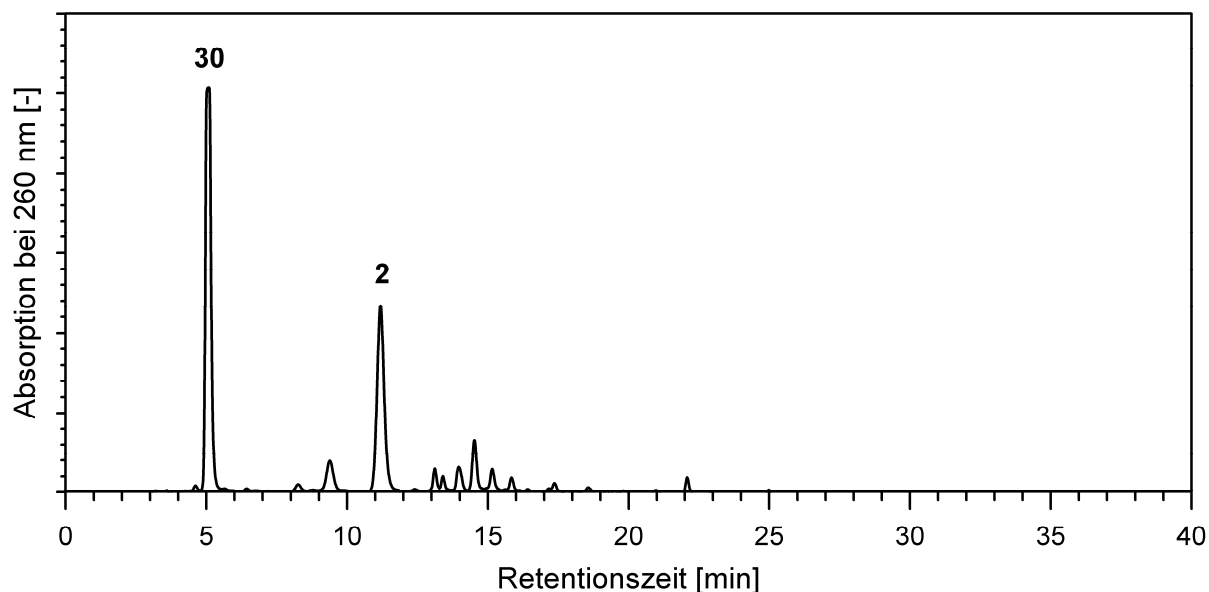


Abbildung 48. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260 \text{ nm}$) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) und D-Glukose (10 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (1,25 mL, 1 mol/L, pH 7) nach 4 Stunden bei 100 °C.

Der Reaktionsansatz wurde verdünnt und zunächst mittels RP-MPLC vorgereinigt, um den Überschuss des nicht reagierten Kohlenhydrates zu entfernen. Nach anschließender

Isolierung mittels RP-HPLC und Entfernung der Lösungsmittel wurde die Zielverbindung als amorphes, weißes Pulver erhalten. Die Identifizierung erfolgte mittels MS- und NMR-Experimenten. Die Bestimmung der exakten Masse ergab eine Elementarzusammensetzung von $C_{16}H_{24}N_5O_{13}P$, die identisch war mit der der zuvor isolierten Verbindungen (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-5'-GMP (**29a**). Untersuchungen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie zeigten zwei voneinander differenzierbare Signalgruppen. Während eine schnelle Zuordnung der Signale des intakten Nukleotids 5'-GMP (**2**) erfolgte, wurden zwischen 3,47 und 5,31 ppm weitere Signale mit einem Gesamtintegral von sieben Protonen detektiert, die aus dem Glukosylrest resultierten. Dabei zeigte sich im ¹H-NMR-Spektrum, dass es sich um eine β-glykosidische Verknüpfung des intakten Kohlenhydrates handelte, da das Signal für das anomere Proton der Glukose bei einer chemischen Verschiebung von 5,31 ppm als Dublett mit einer großen Kopplungskonstante von 9,1 Hz beobachtet wurde, was auf eine äquatoriale Anordnung der großen Substituenten hindeutete (**Abbildung 49**).

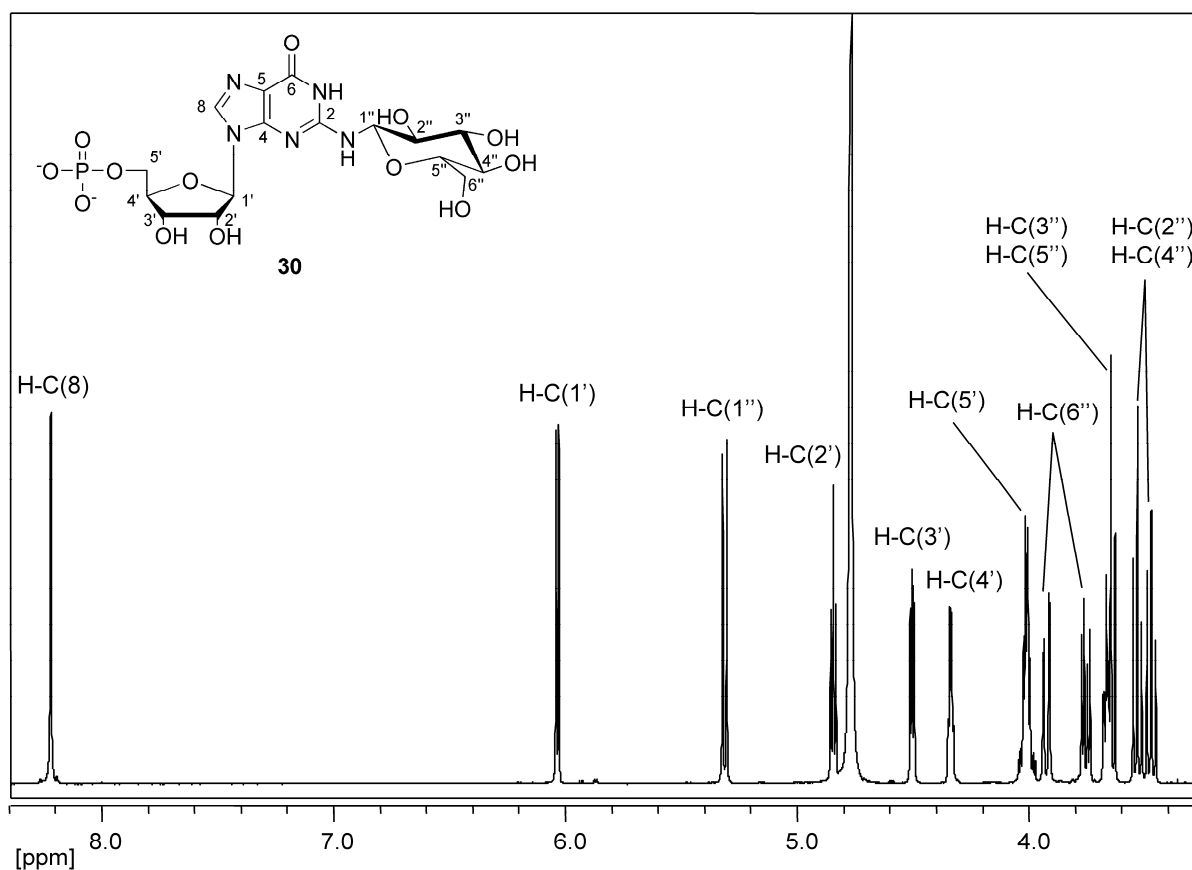


Abbildung 49. ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O/NaOD) von *N*²-(β-D-Glukosyl)-guanosin-5'-monophosphat (**30**), isoliert aus dem Modellansatz von Guanosin-5'-monophosphat (**2**) und D-Glukose. Die Nummerierung der Protonen bezieht sich auf die abgebildete Struktur.

Die spektroskopischen Unterschiede zwischen dem bereits in der Literatur ^[121] beschriebenen Nukleosid- und dem vorliegenden Nukleotidderivat zeigten sich im ¹³C-NMR-

Spektrum (**Abbildung 50**), in dem erneut eine Aufspaltung der Signale für C(4') bei 87,2 ppm mit einer $^3J_{C,P}$ -Kopplungskonstante von 8,1 Hz (**Abbildung 50, A**) und C(5') bei 66,7 ppm mit einer $^2J_{C,P}$ -Kopplungskonstante von 4,5 Hz (**Abbildung 50, B**) beobachtet wurde. Somit konnte die Struktur eindeutig als N^2 -(β -D-Glukosyl)-guanosin-5'-monophosphat identifiziert werden (**30**, **Abbildung 49**). Die NMR-Daten von **30** korrelierten gut mit den in der Literatur für das Guanosinderivat publizierten Daten ^[121].

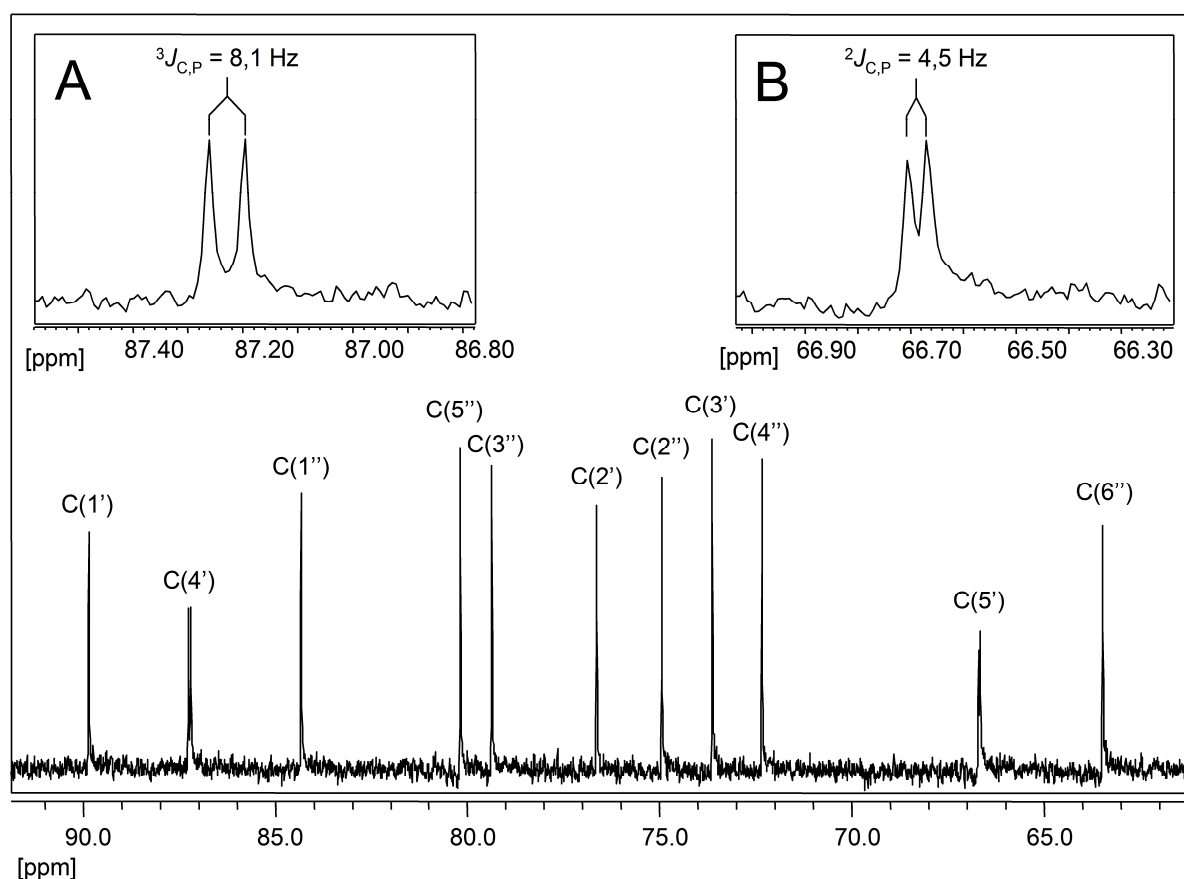


Abbildung 50. Ausschnitt aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$) von N^2 -(β -D-Glukosyl)-guanosin-5'-monophosphat (**30**), isoliert aus dem Modellansatz von Guanosin-5'-monophosphat (**2**) und D-Glukose mit Vergrößerungen der Signale von C(4') (**A**) und C(5') (**B**). Die Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die Struktur in **Abbildung 49**.

3.3.2.4 Reaktion von 5'-GMP mit Maltose

Das Reaktionsgemisch von 5'-GMP (**2**) mit Maltose in Gegenwart von L-Alanin zeigte unter den bisher untersuchten Ansätzen die langsamste Umsetzungsrate, was auf die reduzierte Reaktivität des Disaccharids zurückzuführen war. Nach 14-tägiger Inkubation bei 70 °C in Phosphatpuffer (5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) zeigte das ternäre Gemisch aus 5'-GMP (**2**, 1 mmol), D-Maltose (5 mmol) und L-Alanin (1 mmol) neben nicht umgesetztem **2** die Bildung verschiedenster Reaktionsprodukte (**Abbildung 51**).

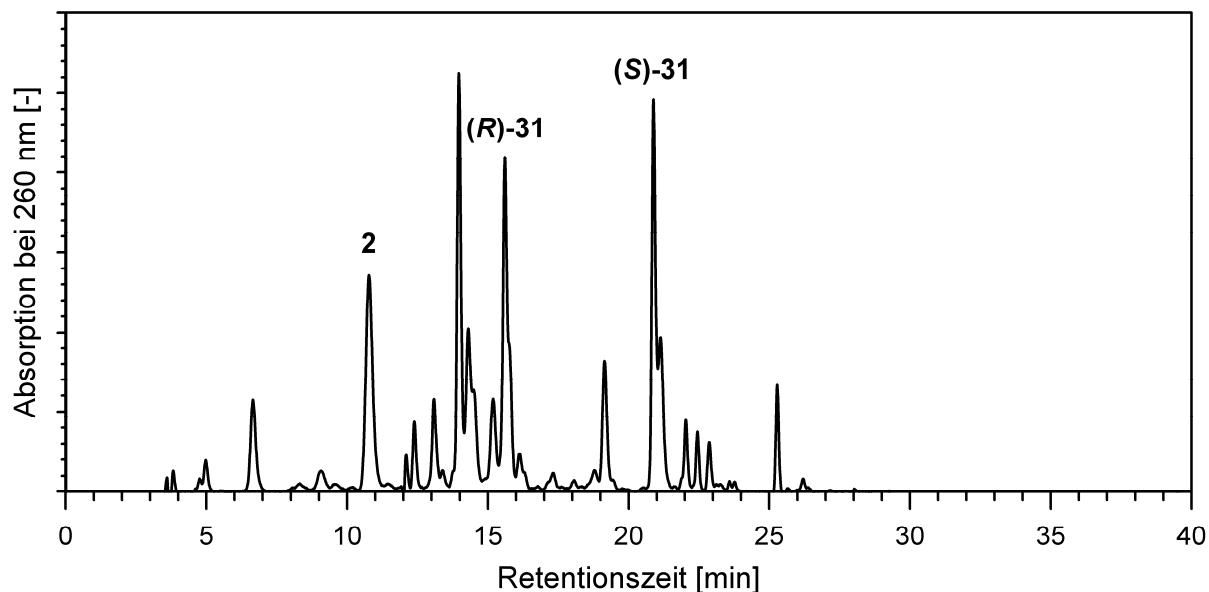


Abbildung 51. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol), D-Maltose (5 mmol) und L-Alanin (1 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) nach 14 Tagen bei 70 °C.

Zwei der Hauptprodukte mit Retentionszeiten von 15,5 und 21,0 min wurden mittels präparativer RP-HPLC erfolgreich aufgereinigt. Die Untersuchung der Isolate mittels LC-MS und LC-TOF-MS implizierte eine Elementarzusammensetzung von $C_{15}H_{22}N_5O_{11}P$. Überraschenderweise deutete das Resultat der MS-Messung nicht wie erwartet auf die Reaktion eines intakten Maltosemoleküls hin, sondern auf die Addition eines C_5 -Restes. 1D/2D-NMR-Studien von **(R)-31** verifizierten die Anwesenheit von fünf zusätzlichen Kohlenstoffatomen im Vergleich mit dem Ausgangsmolekül. Darüber hinaus konnten neben dem neuformierten Carboxykohlenstoff $C(1'')$ durch die Anwendung eines HSQC-Experiments drei Methylengruppen identifiziert werden, von denen zwei eine diastereotrope Signalaufspaltung aufwiesen (**Abbildung 52**).

Das im hohen Feld detektierte Signal bei 1,68 ppm mit einer Intensität von zwei Protonen wurde der Methylengruppe $H-C(4'')$ zugeordnet, die heteronukleare $^1H,^{13}C$ -Kopplungen zu den Kohlenstoffen $C(2'')$, $C(3'')$ und $C(5'')$ mit Resonanzen bei 59,4, 31,0 bzw. 64,2 ppm aufwies. Die Tieffeldverschiebungen von $C(5'')$ bei 64,2 ppm und $H-C(5'')$ bei 3,65 ppm implizierten die Substitution dieses Kohlenstoffatoms mit einem elektronegativen Heteroatom und legte das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe nahe. Da allerdings dieser Trend nicht für $C(4'')$ beobachtet wurde, bedeutete dies, dass im Gegensatz zu N^2 -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'-GMP (**27**) nur eine Hydroxyfunktion in der Seitenkette vorhanden war. Anwendung eines HMBC-Experiments zeigte die Kopplung von $H-C(2'')$, das in einem Multiplett mit einer Resonanz zwischen 4,28 und 4,34 ppm beobachtet wurde, mit dem

Kohlenstoff C(3''), der Carboxyfunktion C(1'') bei 182,8 ppm sowie dem aromatischen Kohlenstoff C(2) bei 155,0 ppm. Damit wurde C(2'') erneut als Bindungskohlenstoff zwischen dem Nukleotid und dem Glykierungsrest identifiziert, was zur erfolgreichen Strukturaufklärung der isolierten Substanzen als (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat (**31**) führte.

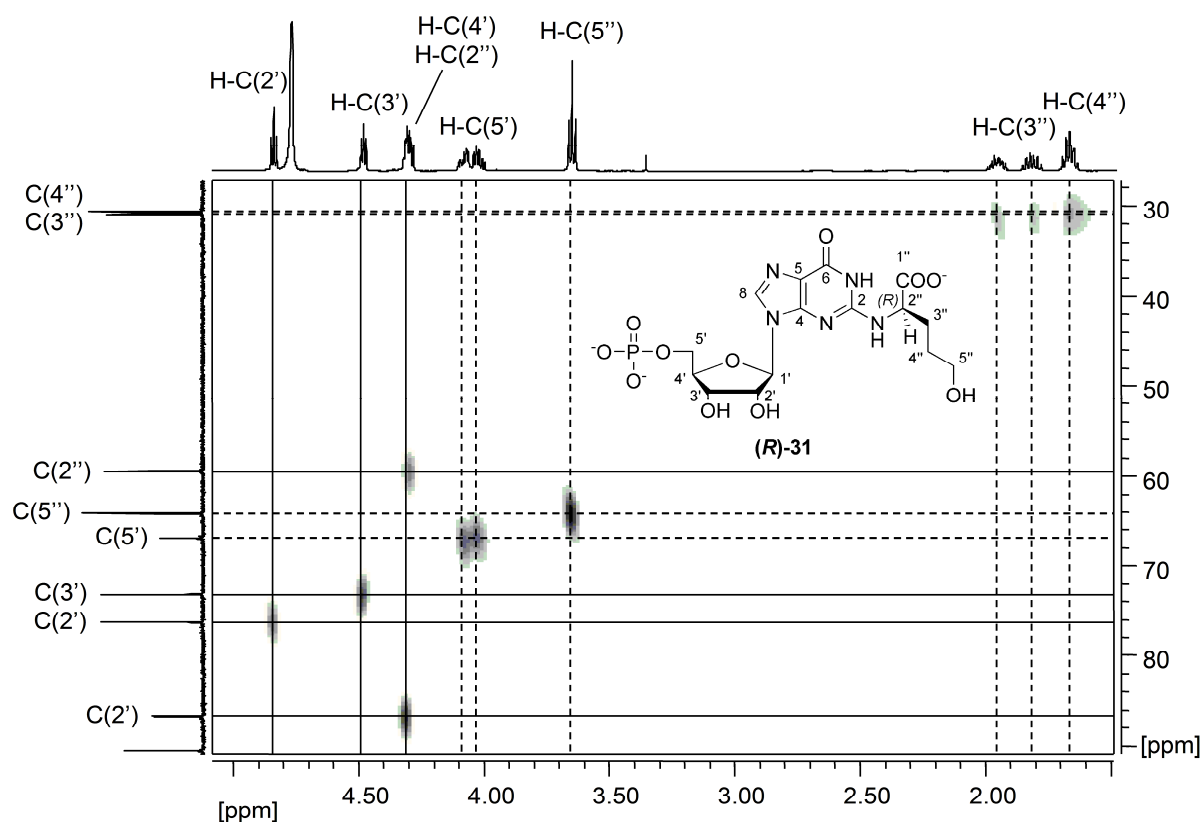


Abbildung 52. Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum (100 MHz, D₂O/NaOD) von (*R*)-*N*²-(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-**31**), isoliert aus dem Modellansatz von Guanosin-5'-monophosphat (**2**), Maltose und L-Alanin. Die Nummerierung der Protonen und Kohlenstoffatome bezieht sich auf die abgebildete Struktur. Gestrichelte Linien illustrieren Methylengruppen, durchgehende Linien Methyl- oder Methingruppen.

Die Zuordnung der Stereochemie am chiralen Zentrum C(2'') erfolgte durch Vergleich des Retentionsverhaltens mit dem der entsprechenden carboxyethylierten Derivaten **21**.

3.3.3 *N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl-5'-GMP-Derivate aus der Reaktion von 5'-GMP mit Triosen und Aminokomponenten

Nachdem es erfolgreich gelang aus den Reaktionsmischungen von 5'-GMP (**2**) mit reduzierenden Kohlenhydraten diverse Verbindungen mit α -Aminocarbonsäurestruktur zu isolieren, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, wie das Nukleotid **2** mit Kohlenhydraten in Gegenwart eines Überschusses einer zusätzlichen Aminokomponente

reagierte. Die Annahme, dass es unter diesen Bedingungen zur Bildung komplexerer Modifikationen des Guaningrundgerüsts kommen kann, wurde durch Literaturarbeiten zu potentiellen DNA-Protein-Konjugaten untermauert ^[122]. Deshalb sollte 5'-GMP (**2**) in Gegenwart des Zuckerabbauproduktes 1,3-Dihydroxyaceton mit primären Aminen bzw. Aminosäuren umgesetzt werden. Die Produkte sollten nach entsprechender Aufreinigung für sensorische Studien zu Struktur-Wirkbeziehungen verwendet werden.

3.3.3.1 Reaktion von 5'-GMP, 1,3-Dihydroxyaceton und *n*-Propylamin

In Anlehnung an eine Vorschrift aus der Literatur ^[122] wurde zunächst eine binäre Mischung von 5'-GMP (**2**, 1 mmol) und 1,3-Dihydroxyaceton (4 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (1 mL, 1 mol/L, pH 7,4) für 30 Minuten bei 100 °C inkubiert, bevor eine Lösung von *n*-Propylamin (8 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7,4) hinzugegeben wurde und das Gemisch für weitere vier Stunden erhitzt wurde. Die Analyse des Reaktionsgemisches mittels analytischer RP-HPLC zeigte neben Rückständen des Edukts die Bildung von vier Produkten (**Abbildung 53**). Die beiden Hauptprodukte wurden mittels Vergleich der Retentionszeiten und anschließender Co-Chromatographie mit den zuvor isolierten Referenzsubstanzen als die beiden Diastereomere (*R*)-/(*S*)-**21** identifiziert. Im Gegensatz dazu konnten die beiden unpolaren Produkte (*R*)-/(*S*)-**32** keinem der bisher isolierten Substanzen zugeordnet werden.

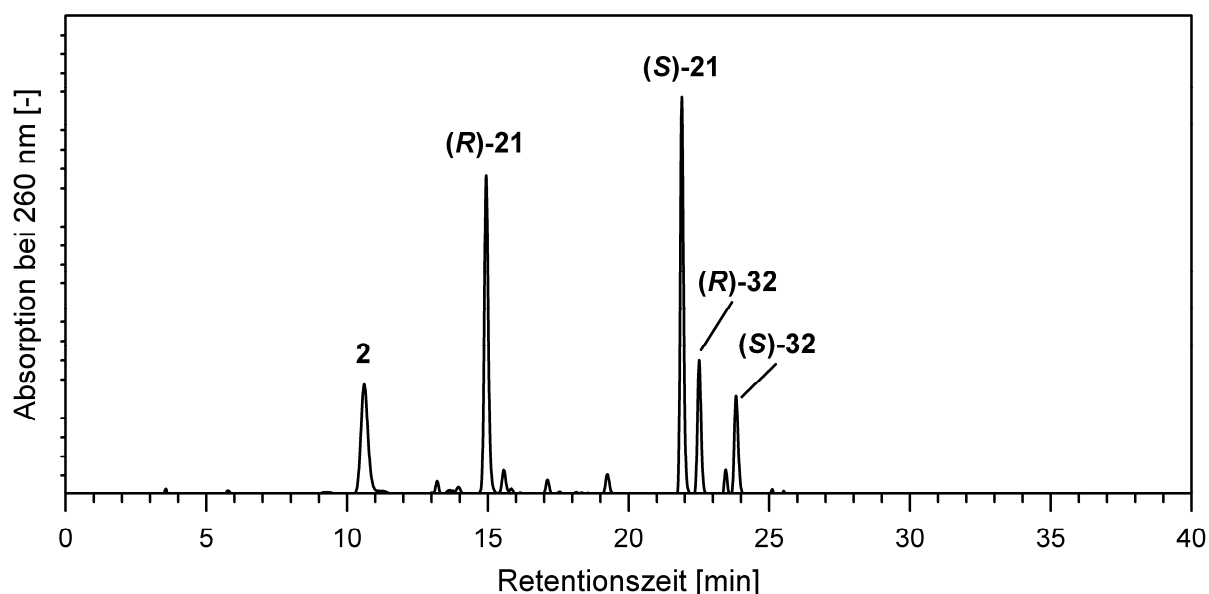


Abbildung 53. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol), 1,3-Dihydroxyaceton (4 mmol) und *n*-Propylamin (8 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (3,5 mL, 1 mol/L, pH 7,4) nach 4,5 Stunden bei 100 °C.

Da beide Verbindungen ein ähnliches UV/Vis-Spektrum wie N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) aufwiesen, wurden diese mittels präparativer RP-HPLC isoliert. Nach Entfernung der Lösungsmittel fielen die Produkte als weiße, amorphe Pulver an und wurden anschließend mittels MS- und NMR-Experimenten untersucht. Die LC-TOF-MS-Analyse deutete für beide Produkte auf eine Summenformel von $C_{16}H_{25}N_6O_9P$ hin. Dieses bestätigte aufgrund des gestiegenen Stickstoffgehaltes, den Einbau eines Moleküls *n*-Propylamin sowie eines Triosemoleküls, was sich ebenfalls aus der Summenformel herleiten ließ. Um die Struktur abschließend zu klären, wurden 1D/2D-NMR-Experimente durchgeführt.

Die Auswertung des 1H -NMR-Spektrums bestätigte die Vermutung der massenspektrometrischen Untersuchungen (**Abbildung 54**). Dabei zeigte das Spektrum neben den Signalen des Nukleotids zusätzlich die Signale des Carboxyethylrestes sowie drei weitere mit Intensitäten zwischen zwei (H-C(2'''), 1,48 ppm) und drei Protonen (H-C(3'''), 0,82 ppm), die dem Propylamidstrukturelement zugeordnet werden konnten.

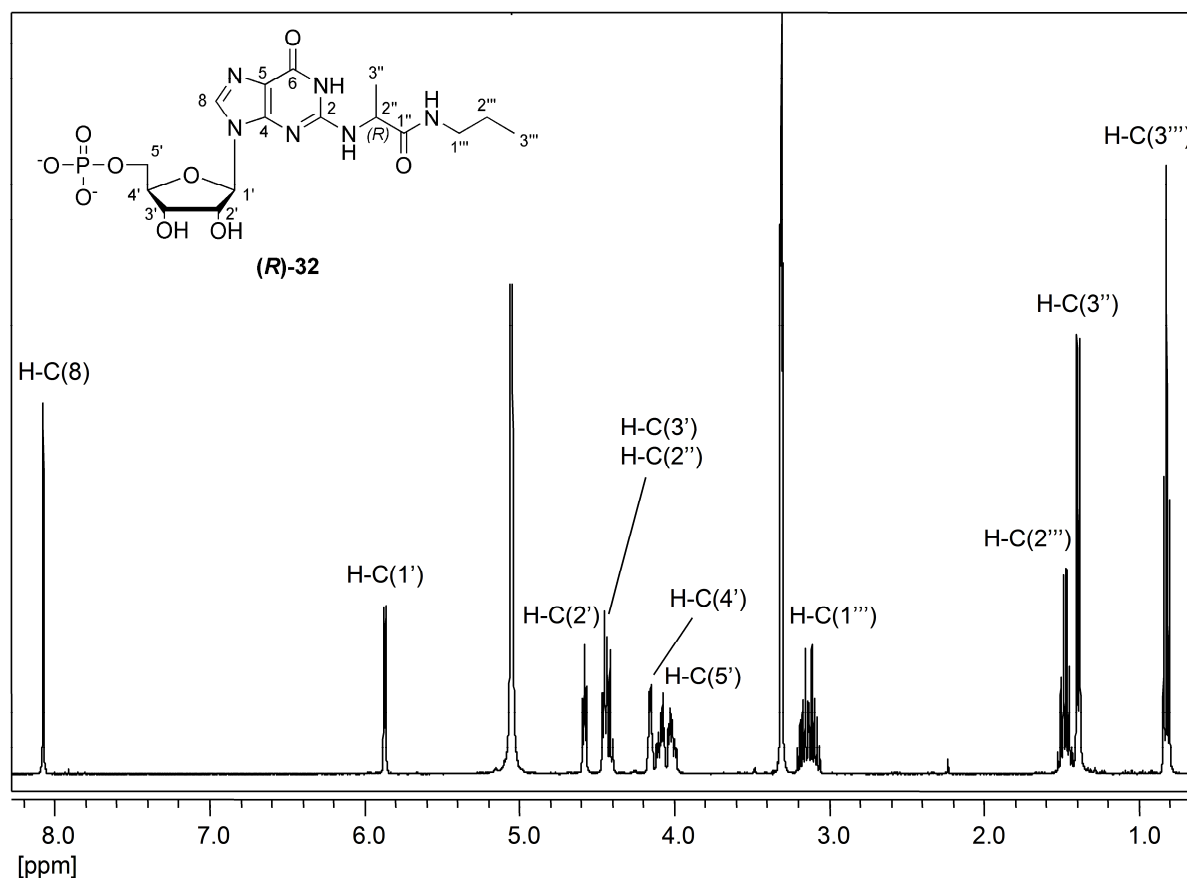


Abbildung 54. 1H -NMR-Spektrum (400 MHz, $CD_3OD/NaOD$) von (*R*)- N^2 -((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-**32**), isoliert aus dem Reaktionsansatz von Guanosin-5'-monophosphat (**2**), 1,3-Dihydroxyaceton und *n*-Propylamin. Die Nummerierung der Protonen bezieht sich auf die abgebildete Struktur.

Weiterhin erwies sich insbesondere das HMBC-Experiment als aussagekräftig, da eine Kopplung der α -Protonen des Propylaminrestes über das Heteroatom zu C(1'') der α -Aminosäure, die durch die Reaktion von **2** mit der Triose entstand, beobachtet werden konnte. Da die weiteren spektroskopischen Daten eine gute Übereinstimmung mit denen von (*R*)-/(*S*)-**21** aufwiesen und den Einbau eines Moleküls *n*-Propylamin zeigten, wurden die isolierten Verbindungen eindeutig als (*R*)-/(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**32**) identifiziert. Somit gelang es mit diesem Modellversuch zu zeigen, dass es in Gegenwart eines Überschusses einer zusätzlichen Aminokomponente bei der Reaktion von 5'-GMP (**2**) mit 1,3-Dihydroxyaceton neben der Bildung der Aminosäurestrukturen (*R*)-/(*S*)-**21** auch zur Bildung der entsprechenden Säureamide ((*R*)-/(*S*)-**32**) kommt.

3.3.3.2 Reaktion von 5'-GMP, 1,3-Dihydroxyaceton und Mononatrium-L-Glutamat

Nachdem die Reaktion in Gegenwart von *n*-Propylamin zeigte, dass es zur Bildung von Amidstrukturen kommt, sollte das folgende Experiment mit einer α -Aminosäure durchgeführt werden. Dazu wurde derselbe Versuchsansatz wie unter **3.3.3.1** beschrieben verwendet, wobei das primäre Amin durch Mononatrium-L-Glutamat (**1**), die in einer Vielzahl von Hefeextrakten dominierende Aminosäure, ersetzt wurde. Nachdem das ternäre Reaktionsgemisch erhitzt wurde, zeigte die Analyse mittels RP-HPLC erneut die Bildung von vier Hauptprodukten (**Abbildung 55**).

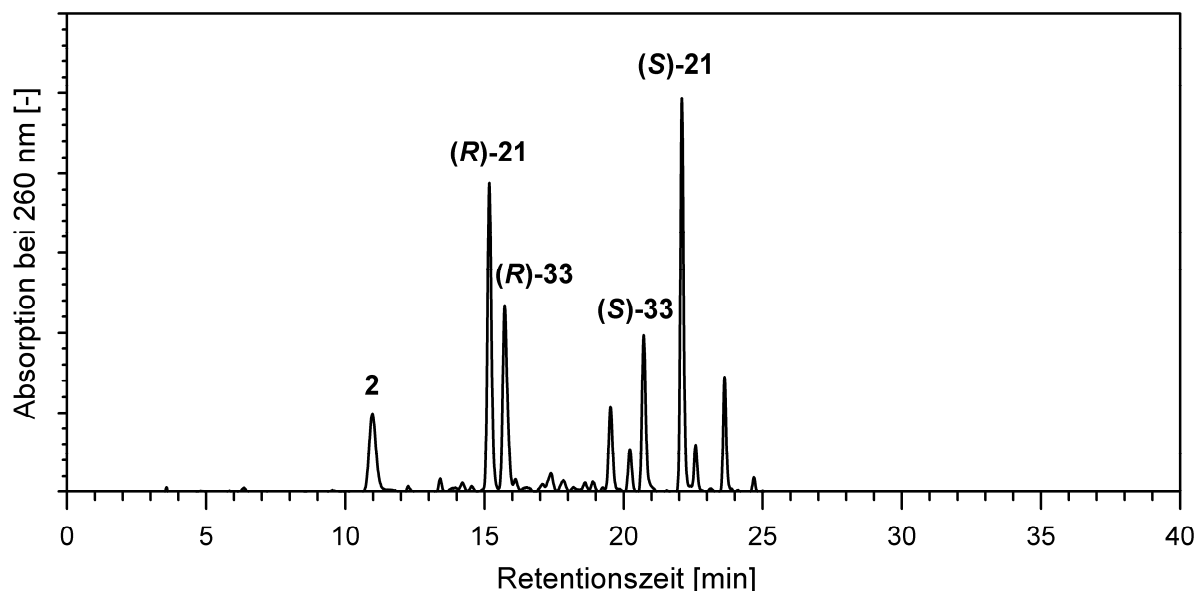


Abbildung 55. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) des Reaktionsgemisches von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol), 1,3-Dihydroxyaceton (4 mmol) und Mononatrium-L-Glutamat (**1**, 8 mmol) in wässrigem Phosphatpuffer (3,5 mL, 1 mol/L, pH 7,4) nach 4,5 Stunden bei 100 °C.

Wiederum konnten zwei der Hauptprodukte als die diastereomeren Aminosäurederivate (*R*)-/*(S)*-*N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**(*R*)-/*(S*)-21**) identifiziert werden. Nachdem die beiden weiteren Verbindungen mittels präparativer RP-HPLC isoliert und von den Lösungsmitteln befreit wurden, standen diese in hoher Reinheit für die Analyse mittels MS und NMR zur Verfügung. Die Bestimmung der exakten Masse von **(*R*)-33** ergab ein Pseudomolekülion mit einem *m/z* von 563,1159 und deutete eine Elementarzusammensetzung von C₁₈H₂₅N₆O₁₃P an. Dieses wies auf den Einbau eines Moleküls der Glutaminsäure (**1**) in die Nukleotidstruktur hin. Die ¹H-NMR-Spektren der Isolate (**Abbildung 56, A**) zeigte neben den typischen Signalen der Aminosäuren **(*R*)-/*(S*)-21** drei zusätzliche Signalgruppen.

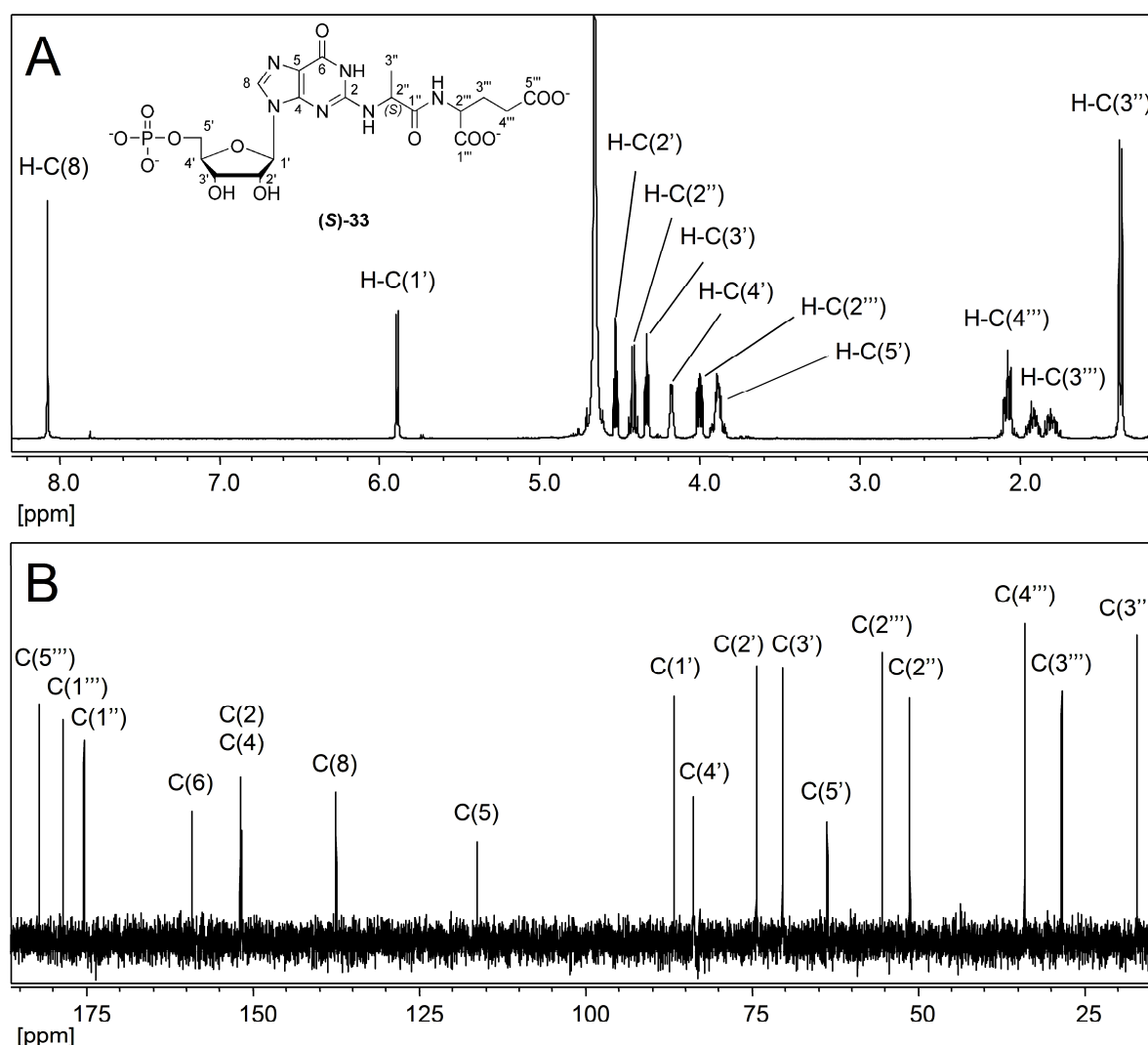


Abbildung 56. A: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O/NaOD), **B:** ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, D₂O/NaOD) von (*S*)-*N*²-((1-(*N*(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanidin-5'-monophosphat (**(*S*)-33**), isoliert aus dem Reaktionsansatz von Guanidin-5'-monophosphat (**2**), 1,3-Dihydroxyaceton und Mononatrium-L-Glutamat (**1**). Die Nummerierung der Protonen und Kohlenstoffatome bezieht sich auf die abgebildete Struktur.

Das Dublett vom Dublett bei 4,01 ppm mit Kopplungskonstanten von 5,1 und 8,3 Hz wurde dem Proton H-C(2'') zugeordnet. Das Multiplett zwischen 2,13 und 2,04 ppm, dessen Intensität für zwei Protonen integriert, wurde als H-C(4'') identifiziert, während die diastereotrop aufgespaltene Methylengruppe H-C(3'') bei 1,98-1,88 ppm sowie 1,87-1,74 ppm beobachtet wurde. Das entsprechende ¹³C-NMR-Spektrum (**Abbildung 56, B**) wies neben den von (**R**)-/(**S**)-**21** erwarteten, fünf zusätzliche Signale auf. Die Carboxyfunktionen C(5'') und C(1'') wurden dabei im tiefen Feld mit Resonanzen bei 182,1 und 178,4 ppm detektiert. Den übrigen drei Signalen bei 55,3, 34,0 und 28,4 ppm wurden C(2''), C(4'') und C(3'') zugeordnet.

Die NMR-Daten beider Verbindungen (**R**)-/(**S**)-**33** zeigten gute Übereinstimmung mit den erwarteten Säureamiden. Neben den Signalen der eingebauten Triose zeigte das HMBC-Spektrum sowohl die Kopplung von H-C(2'') zu C(2) des aromatischen Systems, als auch eine Kopplung zwischen H-C(2'') und C(1''), was auf die Verbindung der Aminofunktion der Glutaminsäure und der Carboxyfunktion des Carboxyethylrestes hindeutete. Da beide Verbindungen ähnliche spektroskopische Daten aufwiesen, wurden die Verbindungen als die Diastereomeren (**R**)-/(**S**)-*N*²-((1-(*N*-(1',3'-Dicarboxypropylamino))-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**33**) identifiziert.

3.3.4 Mechanismen der *Maillard*-Reaktion von 5'-GMP

Auf Basis der identifizierten Strukturen, die aus Ansätzen mit verschiedenen Kohlenhydraten oder Zuckerdegradationsprodukten in Gegenwart oder Abwesenheit zusätzlicher Aminokomponenten isoliert wurden, war es möglich potentielle Bildungswege für die glykierten Derivate zu postulieren (**Abbildung 57**).

Dabei resultiert der thermische Abbau der reduzierenden Kohlenhydrate (**I**, **Abbildung 57**) in der Bildung von 3-Desoxyosonen (**II**, **Abbildung 57**), Methylglyoxal (**III**, **Abbildung 57**) und Glyoxal (**IV**, **Abbildung 57**) als hochreaktive, intermediäre Dicarbonylverbindungen. Nach Addition eines Moleküls Wasser oder einer Aminoverbindung an die Aldehydfunktion der kurzkettigen C₂- und C₃-Dicarbonyle erfolgt die Bildung eines Imins zwischen der exozyklischen Aminogruppe des Nukleotids und der Ketofunktion des korrespondierenden Dicarbonyls. Anschließende Imin-Enamin-Umlagerung, gefolgt von einer Keto-Enol-Tautomerie führt zur Bildung der α-Aminosäurestrukturen **21**, **26** sowie der Säureamidderivate **32** und **33**.

Im Falle der Tetrosen, Pentosen und Hexosen wurde ein anderer Bildungsmechanismus postuliert. Dabei erfolgt zunächst die Bildung der 3-Desoxyosonen (**II**, **Abbildung 57**) die unter Umlagerung in die entsprechenden Furanoid- (**V**, **Abbildung 57**) bzw. Pyranoidhalbacetale (**VI**, **Abbildung 57**) zyklisierten.

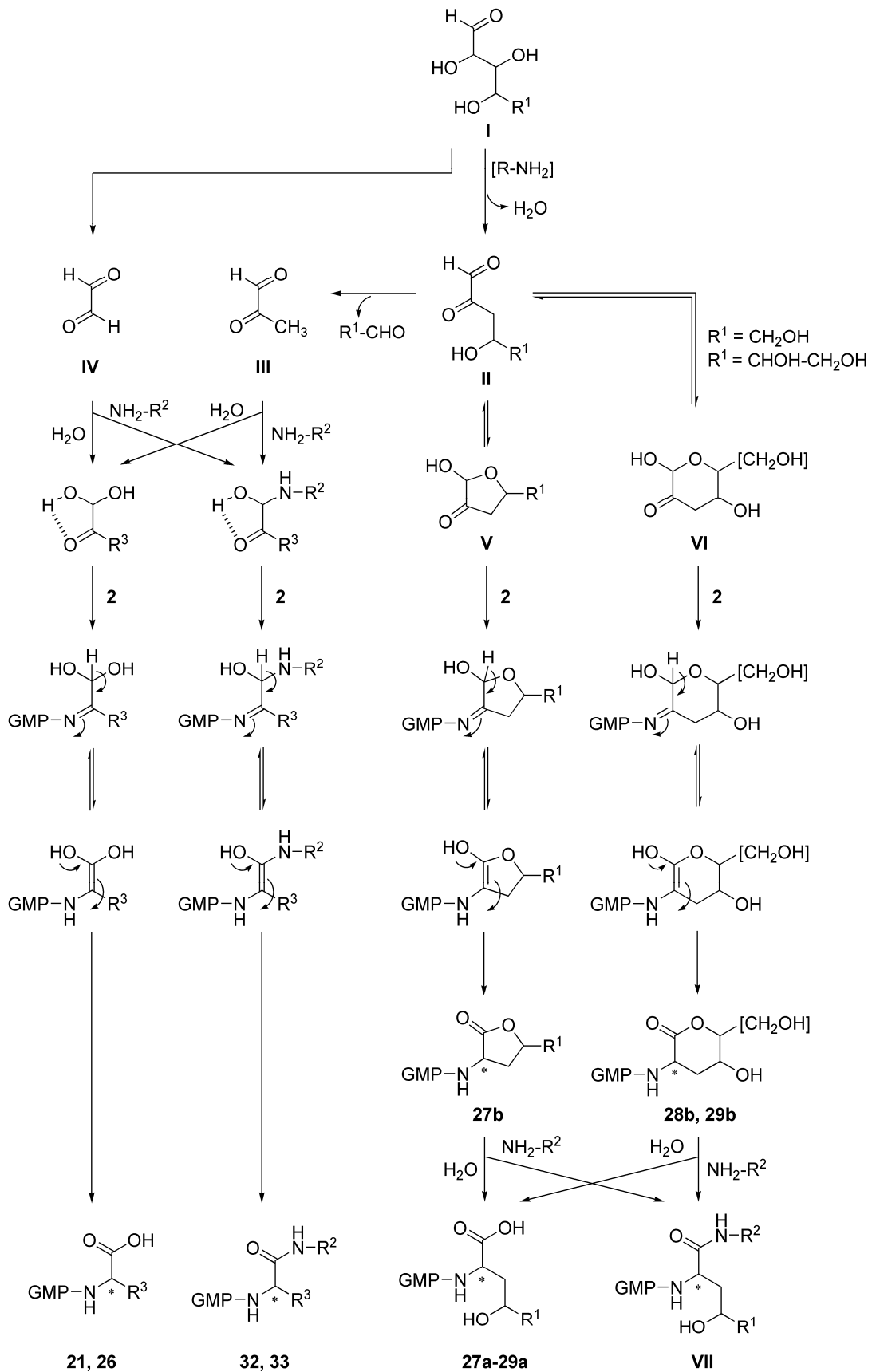


Abbildung 57. Postulierte Bildungswege der identifizierten glykierten Guanosin-5'-monophosphate **21, 26, 27a, 27b, 28a, 28b, 29a, 29b, 29, 32, 33.**

In Anwesenheit von **2** bilden diese reaktiven Intermediate zunächst ein Imin an Position 2, das nach Enamin-Imin Umlagerung und Keto-Enol-Tautomerie im Fall der Tetrosen in das resultierende γ -Lakton (**27a**) bzw. im Fall von Pentosen und Hexosen in das δ -Lakton (**28a**, **29a**) umgelagert wird. In Abhängigkeit vom pH-Wert hydrolysieren diese Verbindungen spontan unter Bildung der entsprechenden α -Aminosäurederivate (**27-29**). In Gegenwart eines Amins kommt es in Reaktionsgemischen komplexerer Kohlenhydrate zur Ausbildung von Amidstrukturen des Typs **VII** (**Abbildung 57**).

Die Bildung von **31** aus der Reaktion mit Maltose wurde über die Entstehung der 3,4-Didesoxypentosulose als reaktives Intermediat erklärt. Diese Verbindung wurde bereits zuvor in der Literatur ^[123] als Degradationsprodukt 1,4-glykosidisch verknüpfter Saccharide beschrieben. **Abbildung 58** zeigt, dass ausgehend von Maltose (**I**) zunächst die Bildung der Schiff'schen Base (**II**) erfolgt. Nach anschließender Umlagerung in die *Amadori*-Verbindung (**III**, **Abbildung 58**) und Isomerisierung in das Endiol (**IV**, **Abbildung 58**) folgt im nächsten Schritt die Abspaltung der Glukose an Position C(4) des Kohlenhydratgerüsts (**V**, **Abbildung 58**). Nach Keto-Enol-Tautomerie (**VI**, **Abbildung 58**) wird nun die Hydroxyfunktion an C(5) abstrahiert (**VII**, **Abbildung 58**). Abschließend wird nach erneuter Tautomerie und Addition von Wasser an C(1) des Kohlenhydratgerüsts (**VIII**, **Abbildung 58**) die formylierte Aminosäure abgespalten, was in der Bildung eines C₅-Körpers resultiert (**IX**, **Abbildung 58**). Die nach Umlagerung erhaltene 3,4-Didesoxypentosulose (**X**, **Abbildung 58**) glykiert **2** unter Bildung von **31** wie bereits zuvor für die Desoxyosone beschrieben.

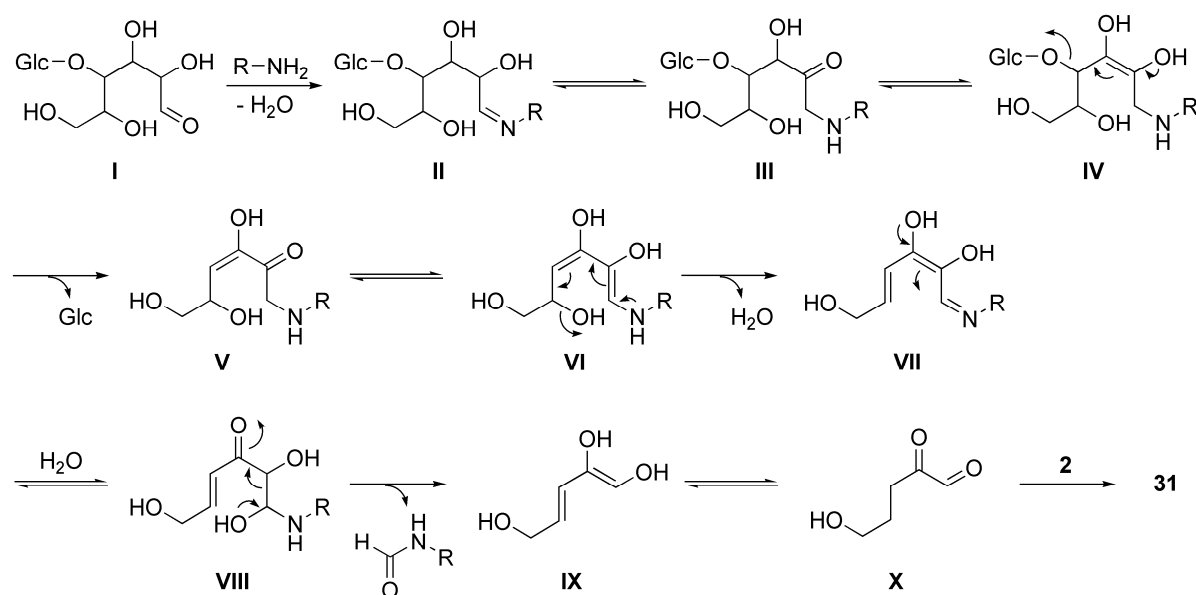


Abbildung 58. Postulierter Mechanismus für die Bildung von **31** über die 3,4-Didesoxypentosulose (**X**) ausgehend von Maltose (**I**) und Guanosin-5'-monophosphat (**2**).

3.3.5 Sensorische Studien zur Umamigeschmacksverstärkung modifizierter 5'-GMP-Derivate

Nachdem die ausreichende Reinheit der isolierten Verbindungen mittels HPLC-MS und NMR bestätigt wurde, konnten die in **Abbildung 59** dargestellten Substanzen zur sensorischen Untersuchung genutzt werden.

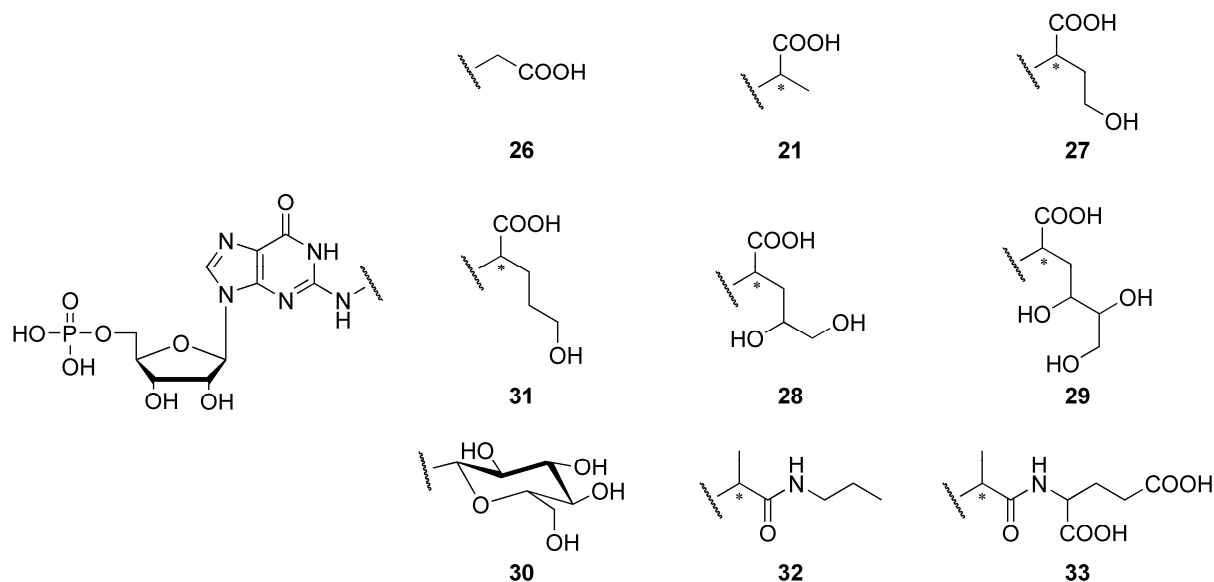


Abbildung 59. Strukturen der zur Sensorik eingesetzten *Maillard*-modifizierten Guanosin-5'-monophosphatderivate.

Voruntersuchungen zeigten bereits, dass es beim direkten Vergleich der binären Mischungen von MSG (1) und den zu untersuchenden Nukleotiden mit reinen MSG (1)-Lösungen zu Schwierigkeiten in der Beurteilung der Isoumamikonzentration kam (**Kapitel 3.2.7**). Daher wurde für die systematische Untersuchung der isolierten Verbindungen auf eine in der Literatur publizierte Methode zur Bewertung der umamiverstärkenden Eigenschaften von Nukleotiden zurückgegriffen ^[18]. Diese basierte auf der paarweisen Vergleichsprüfung einer Mischung des Testnukleotids (0,05 mmol/L) in einer MSG (1)-Lösung (3 mmol/L) mit Lösungen ansteigender Konzentrationen von 5'-IMP (3) in MSG (1) (3 mmol/L). Dabei bestand die Aufgabe der Panelisten darin, für jedes Paar die Lösung mit dem stärkeren Umamigeschmack zu bestimmen, wobei *Forced Choice*-Bedingungen angewandt wurden. Die Antwort des Panelisten wurde als positiv gewertet, wenn die Lösung der Testverbindung stärker als die entsprechende Referenzlösung von 5'-IMP (3) bewertet wurde. Aus der Konzentration von 5'-IMP (3) in den Referenzlösungen sowie den prozentualen Anteilen der positiven Antworten konnte mittels *Probit*-Analyse die Konzentration extrapoliert werden, bei dem es dem Panel nicht möglich war die Intensitäten von Referenz- und Testlösung zu unterscheiden (50 % Wert).

Abbildung 60 illustriert schematisch den Effekt der *Probit*-Transformation auf die zuvor erhaltenen sensorischen Daten. Erfolgte eine Auftragung der positiven Antworten in % gegen den Logarithmus der Konzentration an 5'-IMP (**3**) in den Referenzlösungen so ergibt sich im Idealfall ein sigmoider Kurvenverlauf (**Abbildung 60, A**). Die *Probit*-Transformation bewirkte anschaulich nun ein Strecken der Plateaus, was in einem linearen Kurvenverlauf resultierte (**Abbildung 60, B**). Dazu wurden an der Abszisse die prozentualen Werte in die korrespondierenden *Probit*-Werte umgewandelt. Aus der erhaltenen Geradengleichung wurde die Konzentration an 5'-IMP (**3**) für *Probit* 5, was dem 50 %-Wert entsprach, ermittelt. Mittels der Gleichung $v = \beta \cdot v'$, wobei v die Äquivalenzkonzentration von 5'-IMP (**3**) [mmol/L] und v' die eingesetzte Konzentration des Testnukleotids [mmol/L] repräsentierte, wurde ein Faktor β bestimmt, der ein Maß für die Geschmacksverstärkung der untersuchten Verbindung in Relation zu 5'-IMP (**3**) als Referenz darstellt ^[18].

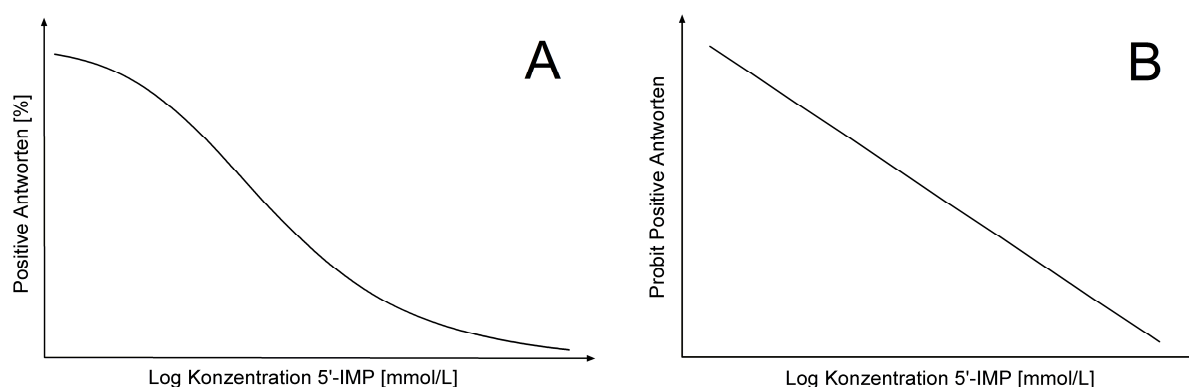


Abbildung 60. Schematische Darstellung des Effektes der *Probit*-Transformation. Die sigmoide Kurve (**A**) wird dabei in eine Linie umgewandelt (**B**) wenn an der Ordinate eine *Probit*-Skala anstelle der prozentualen Anteile verwendet wird.

Um die Ergebnisse reproduzierbar zu gestalten, wurde das Panel wiederholt auf die Wahrnehmung der Umamiintensität trainiert und mittels 5'-GMP (**2**) als Positivkontrolle getestet. Dabei ergab sich für das Purinribonukleotid ein β -Wert von 2,4 (**Abbildung 61**), der in gutem Einklang mit in der Literatur publizierten Daten war ^[18]. Im Falle der Verbindungen N^{β} -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'-GMP (**27**) und N^{β} -(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-5'-GMP (**28**), die zur Zyklisierung in die Laktone neigten, wurden zunächst die entsprechenden Natriumsalze hergestellt und diese zur Sensorik eingesetzt. Um einen Einfluss der unterschiedlichen Natriumkonzentrationen auf die Wahrnehmung des Umamigeschmacks im verwendeten Assay auszuschließen, wurde die Wahrnehmungsschwelle von Natriumchlorid in einer MSG (**1**)-Lösung (3 mmol/L) für das Sensorikpanel bestimmt. Dabei wurde ein Schwellenwert von 1,4 mmol/L ermittelt, der eine Verfälschung der sensorischen Ergebnisse durch variierende Natriumkonzentrationen unwahrscheinlich erscheinen ließ.

Somit ergaben sich für die isolierten Verbindungen die in **Abbildung 61** ermittelten β -Werte. Dabei zeigten die sensorischen Untersuchungen, dass eine Carboxymethylierung (**26**) an der exozyklischen Aminofunktion mit einer deutlich reduzierten Aktivität im Vergleich zum Ausgangsnukleotid **2** einherging ($2,4 \rightarrow 1,2$). Hingegen wurden im Falle der carboxyethylierten Derivate N^{β} -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) für beide Diastereomere variierende Aktivitäten beobachtet, was sich bereits in den sensorischen Voruntersuchungen andeutete (vgl. **Kapitel 3.2.7**). Zeigte sich das (*R*)-konfigurierte Isomer nahezu inaktiv (0,1), wurde für das korrespondierende (*S*)-Isomer eine sehr ausgeprägte Aktivität mit einem β -Wert von 7,0 festgestellt. Weiterhin wurde, da die Reaktion von **2** mit einer Triose in der Bildung einer racemischen Mischung resultierte, ebenfalls ein 1:1 Gemisch des (*R*)- und (*S*)-Isomers verkostet, wobei eine im Vergleich zum Ausgangsnukleotid **2** leicht erhöhte Aktivität festgestellt wurde ($2,4 \rightarrow 2,9$).

Eine Verlängerung der Kohlenstoffkette des N^{β} -Substituenten resultierte, wie an den aus dem Erythrosereaktionsansatz isolierten Verbindungen N^{β} -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'-GMP (**27**) erkennbar, in einer reduzierten Geschmacksverstärkung (**Abbildung 61**). Während für das (*R*)-konfigurierte Isomer erneut eine ausschließlich marginale sensorische Aktivität mit einem β -Wert von 0,1 ermittelt wurde, zeigte das (*S*)-Isomer einen vergleichbaren Effekt wie das Ausgangsmaterial. Auch eine weitere Verlängerung der Kohlenstoffkette führte zu einer Abnahme des geschmacksverstärkenden Potentials. Dabei zeigten die Verbindungen N^{β} -(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-5'-GMP (**28**), N^{β} -(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-5'-GMP (**31**) sowie das racemische Gemisch von N^{β} -(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-5'-GMP (**29**), die allesamt die Substitution der Aminofunktion mit einem C₅- oder C₆-Grundkörper gemeinsam hatten, β -Werte zwischen 0,1 und 0,3 und somit eine drastisch reduzierte Aktivität im Vergleich zum Ausgangsprodukt **2**. In allen Fällen wurde das (*S*)-konfigurierte Diastereomer als stärker beurteilt. Auch für das isolierte N^{β} -Glykosylamin (**30**) wurde nur ein schwacher geschmacksverstärkender Effekt festgestellt. Der ermittelte β -Wert von 0,1 schien zu untermauern, dass ein voluminöser, hydrophiler Substituent mit mehr als vier Kohlenstoffatomen zu einer starken Reduktion in der sensorischen Wirkung der Nukleotidderivate führte. Beim direkten Vergleich der freien Aminosäuren **21** mit den entsprechenden Propylamiden (**32**) zeigten sich nur geringe Unterschiede. Während in beiden Fällen die (*R*)-Isomere als nahezu inaktiv evaluiert wurden, zeigte sich für die (*S*)-Isomere eine leicht reduzierte sensorische Aktivität ($7,0 \rightarrow 6,0$). Allerdings beschrieb das Panel Schwierigkeiten bei der Bewertung der Intensität des Amides (**S-32**), da dieses in seiner sensorischen Qualität signifikante Unterschiede zur freien Säure aufwies, gekennzeichnet durch einen verzögert einsetzenden, länger anhaltenden Umamigeschmack im Vergleich zur Referenzverbindung **3**. Im Gegensatz dazu wiesen die L-Glutamylamide

(33) eine stark reduzierte Aktivität auf, wobei das (*R*)- und das (*S*)-Isomer mit β -Werten von 0,1 bzw. 1,6 evaluiert wurden.

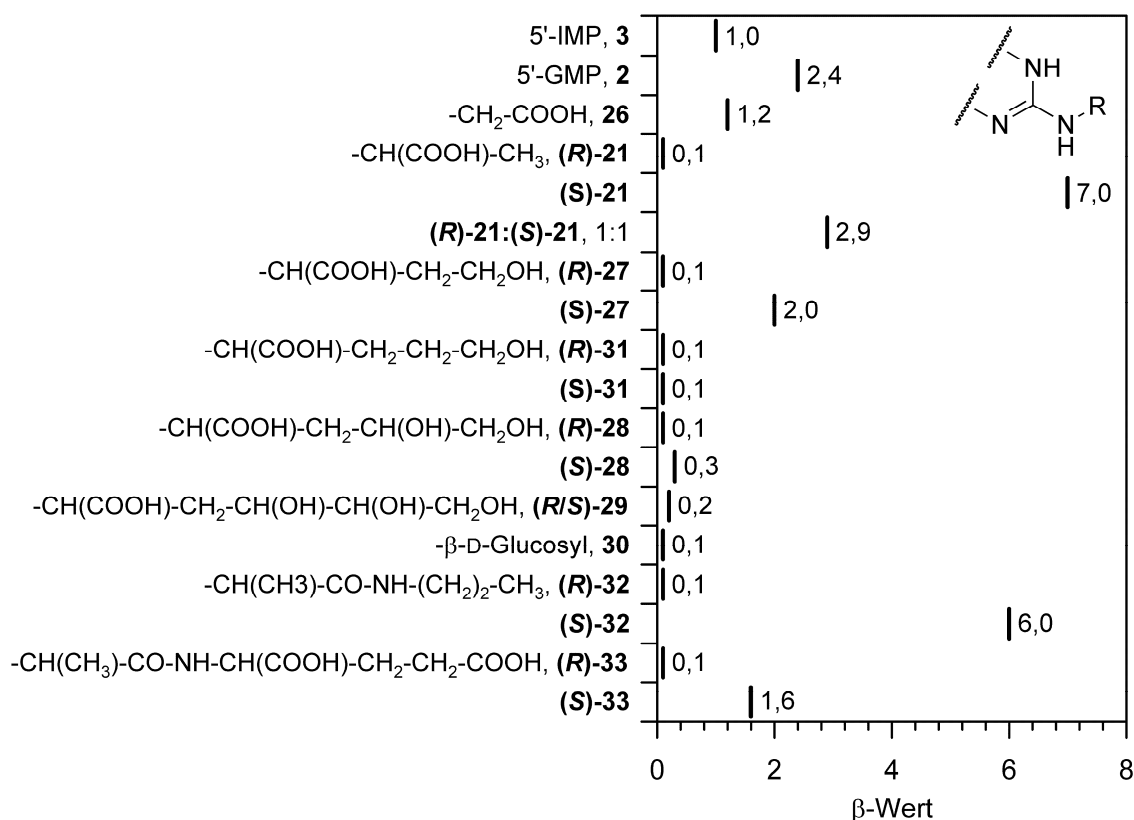
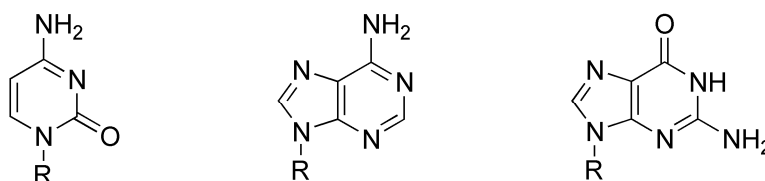


Abbildung 61. Ermittelte umamiverstärkende Aktivität (β -Werte) der isolierten *Maillard*-modifizierten Guanosin-5'-monophosphatderivate im Vergleich zu Inosin-5'-monophosphat (3). Die vollständigen chemischen Strukturen der Verbindungen sind in **Abbildung 59** dargestellt. Die Bestimmung der β -Werte erfolgte nach *Yamaguchi et al., 1971* ^[18].

3.3.6 Diskussion

Nach erfolgreicher Identifizierung von (*R*)-/(*S*)-*N*^ε-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (21) als Produkt der thermischen Reaktion von 5'-GMP (2) mit Triosen sollte im Folgenden systematisch geklärt werden welche Nukleotide einer *Maillard*-induzierten Transformation unterliegen und welche Reaktionspartner als Carbonylkomponente in Frage kommen. Dabei zeigte sich, dass in der Literatur bereits Untersuchungen durchgeführt wurden um die Bildung von *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) aus der Reaktion von Zuckern bzw. Zuckerabbauprodukten und Nucleinsäurebestandteilen oder strukturell verwandten Verbindungen zu klären ^[36, 115, 120, 121, 124]. Generell kommen als Aminokomponenten die in **Abbildung 62** dargestellten Verbindungen in Frage. Studien zur *Maillard*-Reaktion unter Verwendung der entsprechenden Nucleoside zeigten jedoch, dass

ausschließlich mit Guanosin stabile Produkte erhalten werden konnten, während Adenosin nur in geringem Umfang reagierte und Cytosin in der Hitze desaminiert wurde ^[125].



R = H, Ribose, 2'-Desoxyribose, Ribose-5'-phosphat

Abbildung 62. Chemische Strukturen (R = H) von Cytosin (links), Adenin (mitte) und Guanin (rechts) sowie deren Nukleoside (R = Ribose), 2'-Desoxynukleoside (R = 2'-Desoxyribose) und Nukleotide (R = Ribose-5'-phosphat) mit exozyklischer Aminofunktion.

Durch die Umsetzung des Purinnukleotids 5'-GMP (**2**) mit reduzierenden Kohlenhydraten sowie kurzketten, reaktiven Intermediaten des Zuckerabbaus wurde die exozyklische Aminofunktion von **2** systematisch modifiziert. Die resultierenden Produkte wurden mittels chromatographischer Techniken isoliert und anschließend unter Anwendung spektroskopischer Methoden deren Struktur geklärt.

Aus der Reaktion mit Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal und Methylglyoxal und den 3-Desoxyosonen, die im Rahmen der *Maillard*-Reaktion aus den Kohlenhydraten gebildet werden, resultierten Verbindungen mit einer α -Aminocarbonsäurestruktur (**21**, **26**, **27a-29a**, **31**). Weiterhin zeigte sich, dass es im Falle längerer, hydroxysubstituierter Alkylreste unter sauren Bedingungen zum Ringschluss mit der freien Carboxyfunktion, unter Bildung der entsprechenden γ - (**27b**) und δ -Laktone (**28b**, **29b**) kam. Diese Beobachtungen bekräftigten Erkenntnisse der Literatur die sich auf die strukturell eng verwandten Verbindungen Guanosin und 2'-Desoxyguanosin fokussierten ^[36, 39, 115, 120, 124]. Zusätzlich wurde das von *Knerr et al. (1994)* ^[121] bereits beschriebene *N*-Glykosylamin (**30**) erfolgreich isoliert und vollständig in seiner Struktur geklärt. Die erhaltenen Ergebnisse verifizierten detaillierte Studien in der Literatur in denen gezeigt wurde, dass sowohl Dicarbonyle wie z.B. Glyoxal, als auch reduzierende Kohlenhydrate wie Ribose oder Glukose in der Lage waren die exozyklische Aminofunktion von Guanosin und 2'-Desoxyguanosin als Aminokomponente zu glykieren ^[36, 39, 120, 121, 124].

Weiterhin wurde untersucht welche Verbindungen im Falle der Umsetzung des Nukleotids (**2**) mit Aminen in Gegenwart einer Triose entstanden. Dabei gelang neben der Identifizierung der Hauptprodukte **21**, die strukturelle Charakterisierung der Säureamide N^{β} -((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**32**) in einem Modellansatz mit *n*-Propylamin, und N^{β} -((1-(*N*-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-mono-

phosphat (**33**) in einem Gemisch aus 5'-GMP (**2**), 1,3-Dihydroxyaceton und MSG (**1**). Dies befand sich im Einklang mit den von *Peich et al. (2005)* ^[122] publizierten Daten zur Bildung potentieller DNA-Protein-Addukte aus der Reaktion von 2'-Desoxyguanosin, Lysin und 1,3-Dihydroxyaceton.

Anschließend wurden alle Nukleotidderivate sensorisch auf ihre geschmacksverstärkenden Eigenschaften in wässriger Lösung von MSG (**1**) (3 mmol/L, pH 6,0) mittels paarweiser Vergleichsprüfung gegenüber 5'-IMP (**3**) als Referenz untersucht. Dabei zeigte sich im Falle der diastereomeren Komponenten eine (*S*)-Konfiguration an C(2') des Glykierungsrestes als Grundvoraussetzung für die Umamiverstärkung des Nukleotids. Der bei weitem ausgeprägteste sensorische Effekt wurde für (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**(S)-21**) beobachtet, das im Vergleich zu 5'-IMP (**3**) eine 7-fach erhöhte Aktivität aufwies. Eine Verlängerung des substituierten Alkylrestes ging mit einer Reduzierung des umamiverstärkenden Effekts einher, so dass bereits (*S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-5'-GMP (**(S)-28**) nur noch einen marginalen Effekt im Vergleich zu **3** aufwies (0,3 → 1).

Im Falle achiraler Substituenten zeigte sich bereits bei einer Carboxymethylierung der exozyklischen Aminofunktion, wie im Falle von *N*²-(Carboxymethyl)-5'-GMP (**26**), eine drastische Reduktion der Aktivität im Vergleich zur Ausgangsverbindung **2** (2,4 → 1,2). Dieses untermauerte die besondere Bedeutung der stereochemischen Fixierung von C(2') für eine verstärkte Rezeptoraktivierung. Das isolierte *N*-Glykosylamin (**30**) erwies sich als nahezu inaktiv, was ein weiteres Indiz dafür darstellte, dass ein hydrophiler, voluminöser Substituent mit einer reduzierten sensorischen Aktivität einherging.

Erfolgte nun die Substitution der freien Carboxyfunktion der Aminosäure **21** mit Aminen, so zeigte sich eine Reduktion der Aktivität. Allerdings erwies sich diese Aktivitätsminderung weniger gravierend im Falle der Amidierung mit einem unverzweigten, unpolaren Amin (**32**) als im Vergleich zu dem polaren Glutaminsäureamid (**33**). Dies war erneut als Hinweis zu werten, dass eine chemische Modifikation mit polaren, sterisch komplexeren Seitenketten einen negativen Einfluss auf die geschmacksverstärkenden Eigenschaften des Nukleotids hat. Ebenfalls wurde aufgezeigt, dass auch bei einer Amidierung des Carboxyethylrestes das (*S*)-konfigurierte Kohlenstoffatom in der α -Position zur exozyklischen Aminofunktion des Purins eine Grundvoraussetzung für einen ausgeprägten synergistischen Effekt mit **1** darstellt. Als besonders bemerkenswert erwies sich die Veränderung der Umamigeschmacksqualität und des länger anhaltenden Geschmackseindrucks bei einer Substitution der freien Säure mit dem unpolaren *n*-Propylamin, was im Folgenden anhand der synthetischen Modifikation der Amidstruktur genauer untersucht wurde (siehe **Kapitel 3.5**).

3.4 Quantitative Bestimmung glykierter Guanosin-5'-monophosphate in Hefeextrakten

Nach erfolgreicher Isolierung von (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**S**-**21**) aus einem nukleotidreichen Hefeextrakt sowie der systematischen Untersuchung der sensorischen Attribute, wurde im abschließenden Schritt eine quantitative Bestimmungsmethode für diesen neuartigen Geschmacksverstärker entwickelt. Während eine Vielzahl der Standardmethoden zur Bestimmung von Nucleotiden auf deren Analyse mittels HPLC/UV beruhen, rückte in den letzten Jahren vermehrt deren hochempfindliche Analyse mittels MS-Detektion in den Vordergrund [16, 63, 126, 127]. Die Trennung der Analyten erfolgte zumeist mittels Ionenaenchromatographie [126, 128-131], wobei in jüngsten Studien auch Pentafluorphenylpropyl- [127] oder HILIC-Phasen [16, 63] Verwendung fanden.

Um eine möglichst einfache Probenvorbereitung zu gewährleisten sowie eine ausreichende Selektivität und Sensitivität zu erreichen, sollte zunächst ein isotopologer Standard hergestellt werden, der die anschließende Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS auf Basis der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) ermöglichte.

3.4.1 Synthese und strukturelle Charakterisierung von *N*²-([¹³C₃]-1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat

Die Herstellung von isotopenmarkierten *N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) erfolgte dabei in Analogie zu den unmarkierten Derivaten. Dazu wurde 5'-GMP (**2**) in wässrigem Puffer mit [¹³C₃]-Glycerinaldehyd bei 40 °C für mehrere Tage inkubiert. Die glykierten, isotopenmarkierten Verbindungen wurden anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt und nach Entfernen des Lösungsmittels und Gefriertrocknung in Form amorpher weißer Pulver erhalten.

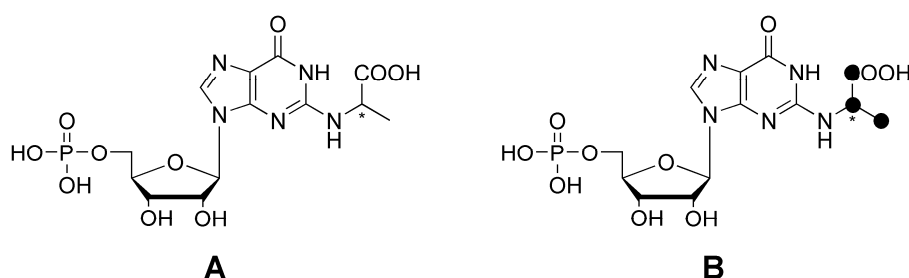


Abbildung 63. Strukturen der Analyten (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**21**, **A**), und deren [¹³C₃]-isotopenmarkierten Analoga ((*R*)-/(*S*)-[¹³C₃]-**21**, **B**) (• illustrieren ¹³C-angereicherte Positionen).

Der Syntheserfolg wurde sowohl durch massenspektrometrische Untersuchungen, als auch NMR-Experimente bestätigt. Von besonderem Interesse erwies sich das ^{13}C -NMR-Spektrum, dass in **Abbildung 64** dargestellt ist. Der korrekte Einbau des ^{13}C -markierten Glycerinaldehyds zeigte sich deutlich durch die drei intensiven, aufgespaltenen Signale. Bei 181,0 ppm erschien das Signal der Carboxyfunktion, das aufgrund seiner $^2J_{\text{C,C}}$ -Kopplung zu C(2') und einer Kopplungskonstante von 54 Hz eindeutig identifiziert wurde. Während C(3'') als Dublett bei 17,3 ppm beobachtet wurde, zeigte sich entsprechend das Signal für C(2'') als Doppeldublett mit einer chemischen Verschiebung von 52,5 ppm und den korrespondierenden Kopplungskonstanten von 54 und 34 Hz.

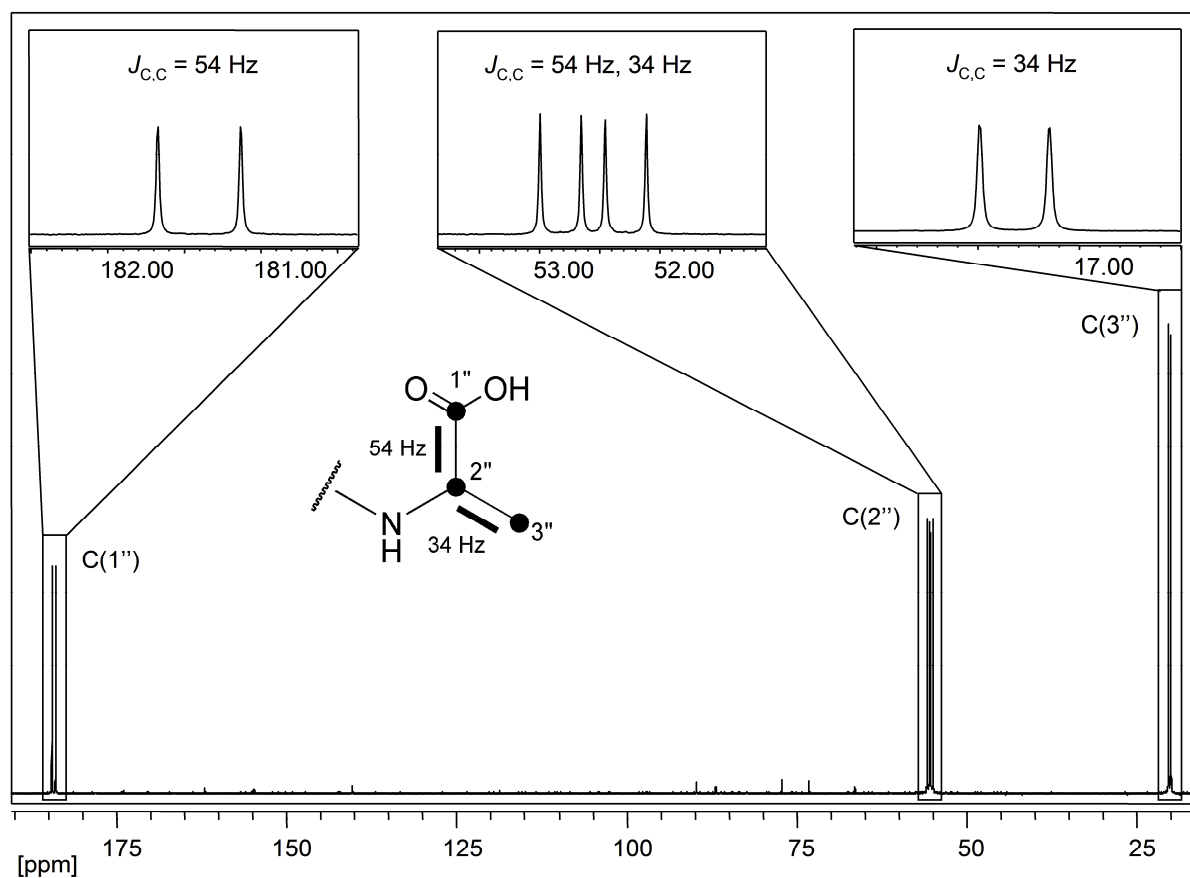


Abbildung 64. ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, D_2O) von (*S*)- N^2 -($^{13}\text{C}_3$)-1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat mit Vergrößerungen der Signale der isotopenmarkierten Kohlenstoffe im Molekül. Die Nummerierung der C-Atome bezieht sich auf die abgebildete Struktur (• illustrieren ^{13}C -angereicherte Positionen).

Um die Eignung des synthetisierten Isotopenstandards für die Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS zu überprüfen, wurden dieser auf seine Fragmentierung im negativen Elektronensprayionisationsmodus hin untersucht. Dabei sind in **Abbildung 65** die Tochterionenspektren des $^{13}\text{C}_3$ -markierten internen Standards (**A**) im Vergleich mit der

unmarkierten Substanz (**B**) dargestellt. Als intensivstes Fragment aus den entsprechenden Mutterionen m/z 434 und 437 wurde in beiden Fällen m/z 79 detektiert, was dem Fragment $[\text{PO}_3]^-$ entsprach. Weiterhin wiesen beide ein Fragment mit m/z 97 auf, was der abgespaltenen Phosphorsäure $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ zugeordnet wurde. Unter Erhalt der eingebauten Isotopenmarkierung ergaben sich die dephosphorylierten Molekülionen (m/z 336 und 339), sowie ein weiteres, unspezifischeres Fragment bei m/z 204 und 207.

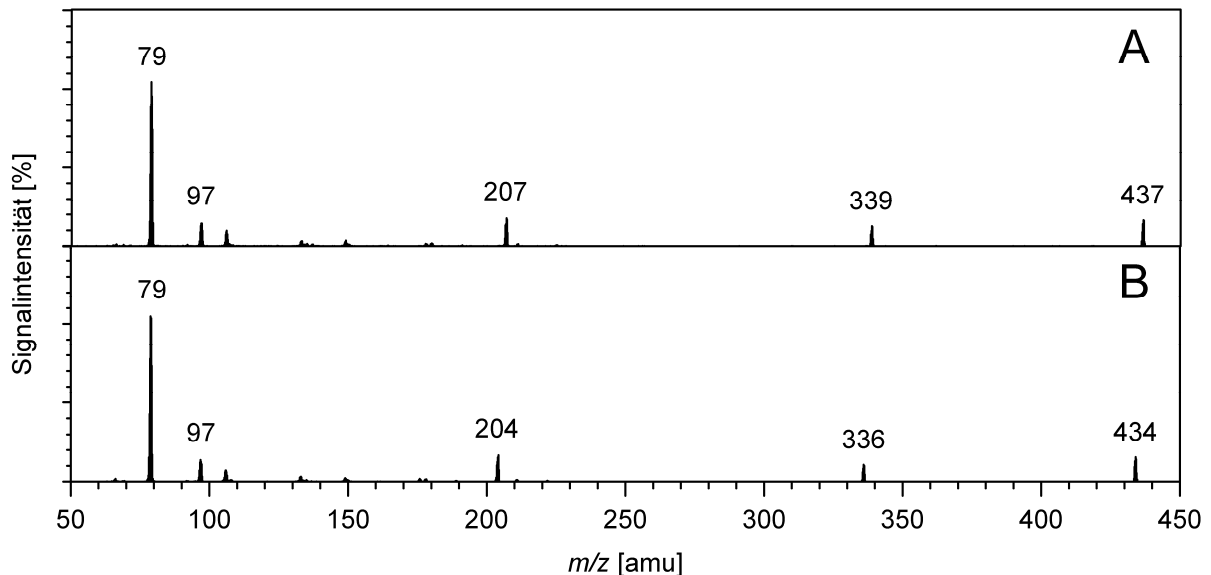


Abbildung 65. Tochterionenspektren (ESI) des isotopenmarkierten Analogs N^2 -($^{13}\text{C}_3$)-1-Carboxyethyl-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/((*S*)- $^{13}\text{C}_3$)-**21**, **A**) sowie des Analyten N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/((*S*)-**21**, **B**).

3.4.2 Screening von Hefeextrakten nach glykierten Guanosin-5'-monophosphatderivaten

Da es sich bei Hefeextrakten um ein zumeist leicht wasserlösliches Produkt handelt, bestand die Probenvorbereitung ausschließlich aus dem Lösen des Extraktes in bi-distilliertem Wasser. Nach Vermischen und Membranfiltration wurde die Lösung direkt zur Analyse mittels HPLC-MS/MS verwendet.

Als schwieriger gestaltete sich die Optimierung der chromatographischen Trennung, wobei sich eine Pentafluorphenylpropylsäule als stationäre Phase der Wahl erwies. Als Elutionsmittel wurden mit Ameisensäure angesäuertes Wasser und Acetonitril verwendet. Dabei zeigte sich die korrekte Auswahl der Säurekonzentration als essentiell sowohl für die Trennung der Diastereomeren als auch für die resultierenden Peakformen (**Abbildung 66**).

Wie zu erwarten, zeigte sich ohne Ansäuerung der Lösungsmittel keine Trennung der ionischen Analyten (**Abbildung 66, A**). Durch sequentielle Erhöhung der Ameisensäure in den Eluenten wurde gezeigt, dass bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,25 % die

schmalsten Peaks erhalten, und eine ausreichende Trennung gewährleistet wurde (**Abbildung 66, B und C**). Wurde der Gehalt der Säure nun noch weiter erhöht, zeigte sich ein negativer Effekt auf die Peakform vom früher eluierenden (*R*)-Isomer (**Abbildung 66, D**). Bei einem Ameisensäuregehalt von 1 % in den Eluenten war (*R*)-21 letztendlich kaum mehr als Peak erkennbar (**Abbildung 66, E**). Aus diesem Grunde wurde für die folgenden Untersuchungen jeweils eine 0,1 %-ige Lösung von Ameisensäure in Wasser sowie Acetonitril verwendet.

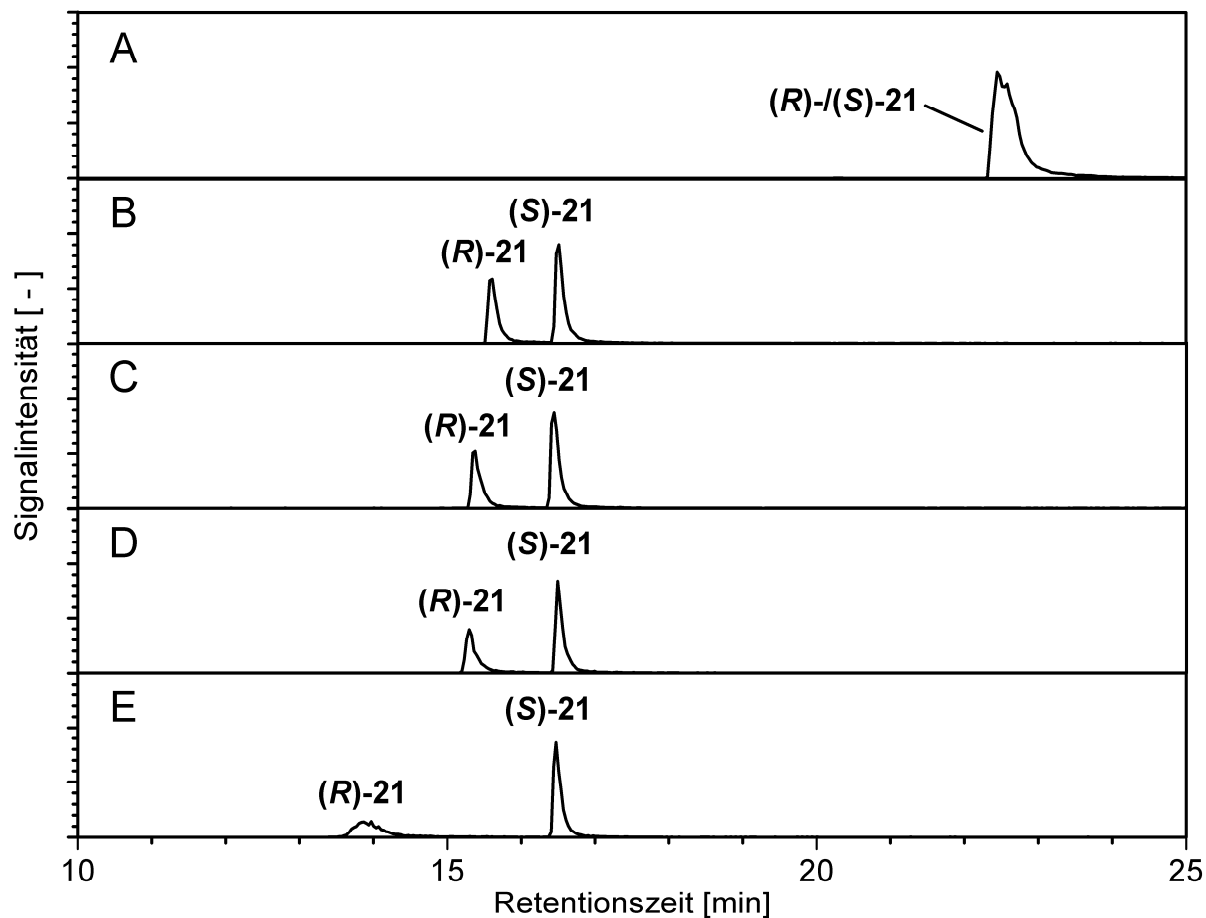


Abbildung 66. Einfluss der Ameisensäurekonzentration in den Eluenten (Wasser/Acetonitril) auf das chromatographische Verhalten von N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-/-(*S*)-21 (HPLC-MS/MS, ESI⁻, m/z 434 \rightarrow 336). Verwendete Ameisensäurekonzentrationen in Wasser und Acetonitril jeweils 0 % (**A**), 0,1 % (**B**), 0,25 % (**C**), 0,5 % (**D**) und 1 % (**E**). Die Signalintensität jedes Massenübergangs ist normalisiert.

Im nächsten Schritt sollte die entwickelte Methode zur qualitativen Detektion der zuvor isolierten, glykierten Nukleotidderivate genutzt werden. Dazu wurden die entsprechenden optimierten Massenübergänge aller identifizierten Verbindungen in die Methode integriert und ein *Screening* der Substanzen mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus nach negativer Elektronensprayionisation durchgeführt.

Obwohl für alle Verbindungen der intensivste Übergang vom Mutterion auf m/z 79 bestand, zeigte sich dieser als wenig selektiv. Deshalb wurden zusätzlich die in **Abbildung 67** dargestellten Massenübergänge zur Identifizierung der individuellen Verbindungen im Hefeextrakt 4, der einen besonders hohen Gehalt an freien 5'-Nukleotiden aufwies, hinzugezogen.

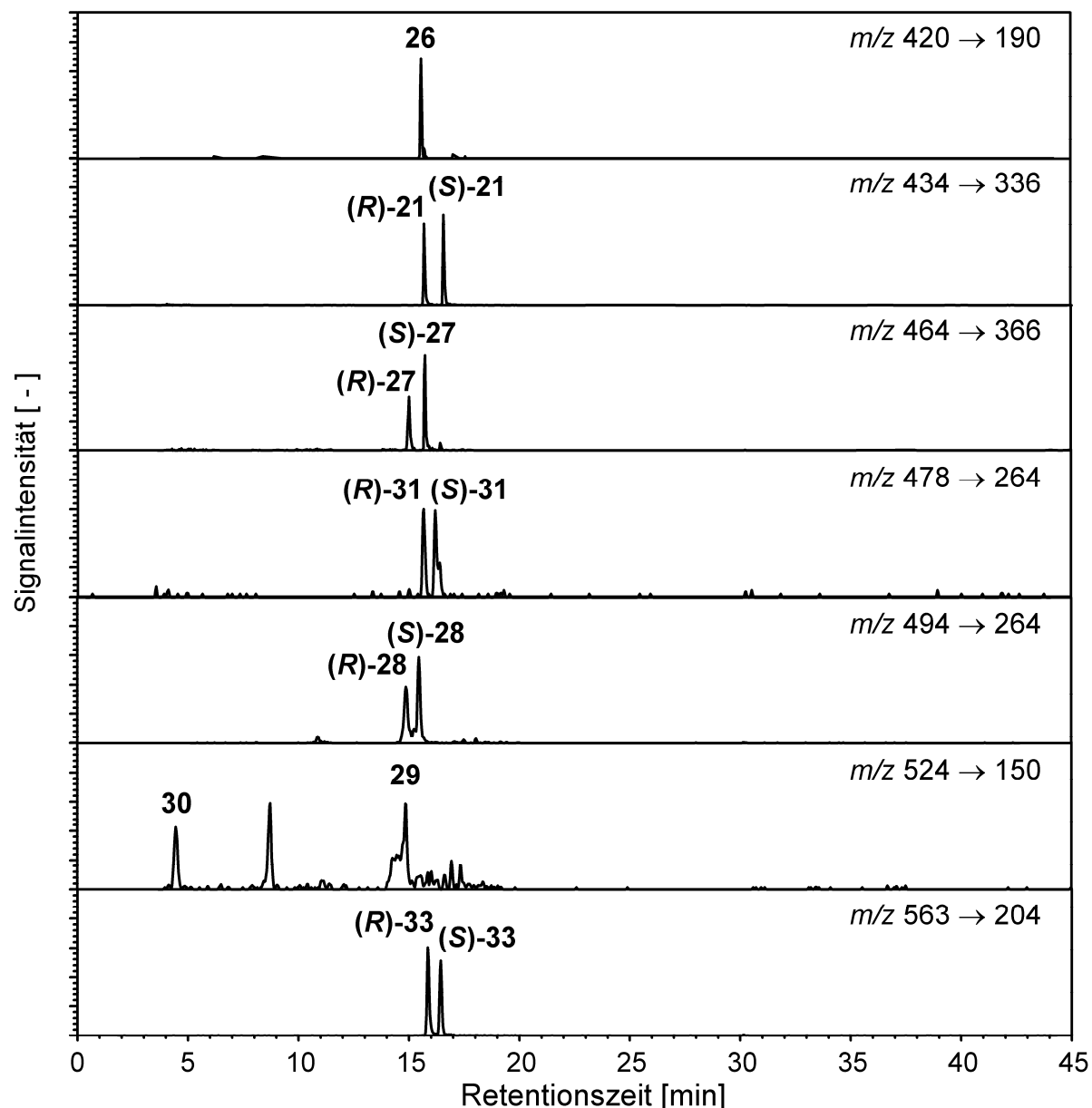


Abbildung 67. Identifizierung thermisch generierter Guanosin-5'-monophosphat (2)-Transformationsprodukte im Hefeextrakt 4 mittels HPLC-MS/MS (MRM, ESI) Analyse. Die Signalintensität jedes Massenübergangs ist normalisiert. Die Bezifferung bezieht sich auf die Strukturen in **Abbildung 59**.

Es zeigte sich, dass die bereits zuvor aus Hefeextrakt 3 isolierte Verbindung N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) die höchsten Signalintensitäten aufwies. N^2 -(Carboxymethyl)-5'-

GMP (**26**) und N^2 -((1-(*N*-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**33**) waren ebenfalls eindeutig in der untersuchten Probe identifizierbar. Mittels Co-Chromatographie mit den zuvor isolierten Reinsubstanzen wurden die übrigen Derivate N^2 -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'-GMP (**27**), N^2 -(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-5'-GMP (**28**), N^2 -(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-5'-GMP (**29**), N^2 -(β -D-Glukosyl)-5'-GMP (**30**) und N^2 -(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-5'-GMP (**31**) zugeordnet, wobei deren niedrige Signalintensitäten eine eindeutige Identifizierung sowie Quantifizierung im nativen Hefeextrakt erschwerten.

Für die anschließenden quantitativen Untersuchungen wurden deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich die Verbindungen **21**, **26** und **33** als Indikatorverbindungen für die thermisch induzierte Transformation des Purinnukleotids Guanosin-5'-monophosphat (**2**) genauer untersucht.

3.4.3 Quantifizierung modifizierter Nukleotide in Hefeextrakten mittels SIDA

Zur quantitativen Bestimmung der modifizierten Nukleotidderivate mittels HPLC-MS/MS wurden zunächst verschiedene Hefeextraktproben des gleichen Herstellers untersucht. Diese unterschieden sich deutlich in ihren Gehalten an freien 5'-Nukleotiden, was auf unterschiedliche Produktionsprozesse zurückzuführen war. Es zeigte sich, dass die Extrakte, die die höchsten Gehalte an 5'-GMP (**2**) besaßen, ebenfalls die höchsten Mengen an N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) als mengenmäßig dominierendes, glykiertes Nukleotid aufwiesen. **Tabelle 9** fasst die Ergebnisse der quantitativen Analysen zusammen.

Hefeextrakt 1 und 2 enthielten nur geringe Mengen an freien 5'-Nukleotiden (vgl. **Tabelle 1**), wobei keines der untersuchten *Maillard*-Produkte nachgewiesen wurde. Die beiden Proben unterschieden sich in ihrem Herstellungsverfahren. Während der enzymatische Abbau der Hefe im Falle von Hefeextrakt 1 ausschließlich durch die endogenen Enzyme stattfand, wurde im Rahmen der Produktion von Hefeextrakt 2 Malzkeimlingsextrakt zugegeben, dessen 5'-Phosphodiesterase zur Degradation der RNA unter Bildung freier 5'-Nukleotide beitrug. Hefeextrakt 3 zeichnete sich hingegen durch hohe Gehalte an 5'-Nukleotiden aus. Bei der Herstellung erfolgte zunächst eine Deaktivierung der endogenen RNA-abbauenden Enzyme der Hefe, bevor der Malzkeimlingsextrakt zugegeben wurde. Somit erfolgte der Abbau der RNA durch die im Malzkeimling enthaltene 5'-Phosphodiesterase, was in der Freisetzung von 5'-Nukleotiden resultierte. Ebenfalls wurden in Hefeextrakt 3 nachweisbare Mengen aller analysierten, glykierten Verbindungen identifiziert. Während mengenmäßig die carboxyethylierten Derivate (**21**) dominierend waren (etwa 53 $\mu\text{g/g}$), wurden ebenfalls die Glutaminsäureaddukte N^2 -((1-(*N*-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**33**) in Konzentrationen zwischen 12 und 15 $\mu\text{g/g}$ quantifiziert, während das Glyoxaladdukt N^2 -(Carboxymethyl)-5'-GMP (**26**) nur in Spuren detektiert wurde.

Des Weiteren wurden Proben untersucht bei denen es sich um getrocknete

Produktionszwischenstufen der Herstellung des finalen Hefeextraktes 3 handelte, wobei die Probennahme bei einer Autolyse-Dauer von vier Stunden (Hefeextrakt 3a) bzw. acht Stunden (Hefeextrakt 3b) erfolgte. Dabei zeigten sich mit höherem Grad der Autolyse auch steigende Konzentrationen der Derivate **21** sowie die Bildung der Glutaminsäureaddukte **33** nach einer Autolysedauer von acht Stunden. Hefeextrakt 4 enthielt im Rahmen der untersuchten Produkte laut Herstellerangaben die höchsten Gehalte an freien 5'-Nukleotiden. Wie erwartet wurden hier hohe Gehalte an glykierten Verbindungen detektiert, wobei wiederum die Carboxyethyl-derivate (**21**) mit Gehalten von 94,0 bzw. 101,1 µg/g vorherrschend waren. Dies untermauerte die besondere Bedeutung dieser Verbindungen im Rahmen der isolierten Strukturen. Dahingegen zeigten sich die Hefeextrakte 5 und 6, die laut Beschreibung des Herstellers besonders reich an Glutathion bzw. Milchsäure, aber arm an Nukleotiden waren, als frei von den Transformationsprodukten von 5'-GMP (**2**).

Tabelle 9. Konzentrationen ausgewählter *Maillard*-modifizierter Nukleotide in Hefeextrakten

Hefeextrakt	Konzentration [µg/g] ^a				
	(<i>R</i>)- 21	(<i>S</i>)- 21	26	(<i>R</i>)- 33	(<i>S</i>)- 33
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	53,7	53,6	3,2	15,1	12,0
3a	1,7	2,0	n.d.	n.d.	n.d.
3b	4,2	4,6	n.d.	1,7	1,6
4	94,0	101,1	2,6	19,0	13,0
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Daten stellen die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. n.d. nicht detektierbar.

Um den Einfluss der thermischen Behandlung der Hefeextrakte auf die Bildung der identifizierten *Maillard*-Verbindungen zu verifizieren, wurden selbst hergestellte Prozessaromen auf Basis nukleotidreicher Hefeextrakte mittels HPLC-MS/MS untersucht. Dazu wurde zum einen eine wässrige Lösung des nativen Hefeextraktes 3 sowie Lösungen von Hefeextrakt 3 mit verschiedenen reduzierenden Kohlenhydraten variierender Kettenlänge für Zeiten zwischen einer und acht Stunden auf 100 °C erhitzt. Die Lösungen wurden anschließend mittels der neuentwickelten HPLC-MS/MS Methode auf die Anwesenheit der glykierten Nukleotidderivate untersucht.

Abbildung 68, A illustriert die Bildung der Diastereomeren *N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer und den verwendeten Kohlenhydraten, die jeweils in äquimolaren Konzentrationen zugesetzt wurden. Erwartungsgemäß erwies sich 1,3-

Dihydroxyaceton (●) als potentester Präkursor, der in der Lage war aus einem mmol des im Hefeextrakt vorhandenen 5'-GMP (2) bis zu 318 μmol der Produkte zu generieren, was einer Umsetzung von 31,8 % entsprach. Dabei bewirkte eine Verlängerung der Erhitzungsdauer eine erhöhte Ausbeute der Zielverbindung 21.

Wurden komplexere Kohlenhydrate zur Reaktion gebracht, erwies sich die Pentose Ribose (▲) im Vergleich mit der Hexose Glukose (▼) als reaktiver (Abbildung 68, A).

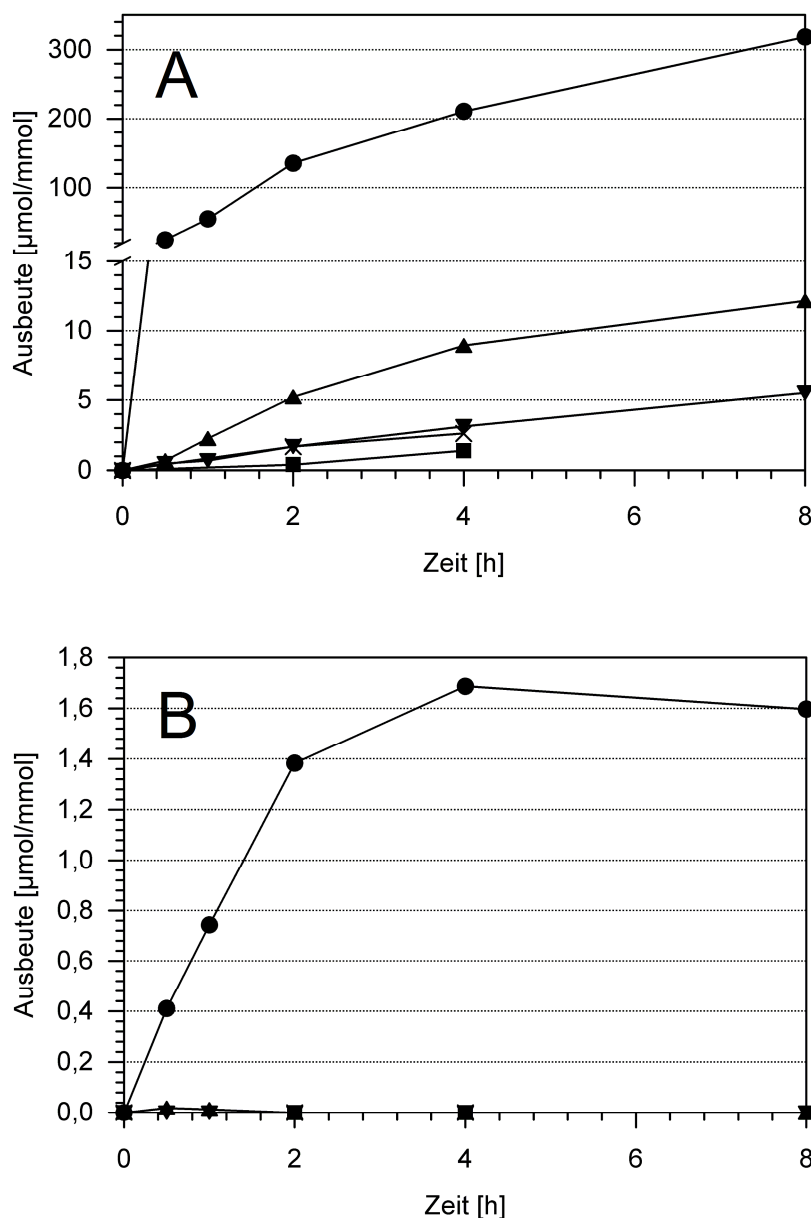


Abbildung 68. Zeitabhängige Bildung von N^2 -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, 21 (A) und N^2 -((1-(N-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, 33 (B) in Lösungen von Hefeextrakt 3 mit 1,3-Dihydroxyaceton (●), Ribose (▲), Glukose (▼), Maltose (■) oder ohne Zusatz (x) nach thermischer Behandlung bei 100 °C. Die Werte der y-Achse repräsentieren die Ausbeute der Zielverbindungen aus der im Hefeextrakt vorhandenen Ausgangsverbindung Guanosin-5'-monophosphat (2).

Während im Falle der Ribose nach einer Reaktionsdauer von acht Stunden eine Umsetzung von 12,2 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ 5'-GMP (**2**) verzeichnet wurde, zeigte sich für Glukose ein deutlich flacherer Kurvenverlauf mit einer maximalen Umsetzung von 5,5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ 5'-GMP (**2**). Lediglich nach zwei und vier Stunden erfolgte die Quantifizierung in den Reaktionsgemischen mit Maltose (\blacksquare) sowie ohne Zusatz einer zusätzlichen Kohlenhydratquelle (\times) (**Abbildung 68, A**). Während durch den Zusatz von Maltose nahezu keine verstärkte Bildung von **21** beobachtet wurde, deutete sich in Abwesenheit eines Zusatzes an, dass die im Hefeextrakt vorhandenen Kohlenhydrate ihren Beitrag zur Bildung der glykierten Verbindungen leisteten. Im Falle der amidierten Carbonsäure N^2 -((1-(N -(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**33**) zeigte sich ausschließlich 1,3-Dihydroxyaceton in der Lage analytisch detektierbare Mengen zu generieren (**Abbildung 68, B**). Allerdings erwies sich der Umfang der Bildung als deutlich geringer mit maximalen Umsatzraten von 1,6 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ 5'-GMP (**2**) nach Reaktionszeiten von vier bzw. acht Stunden. In allen anderen Reaktionsgemischen konnte keine Bildung der Säureamide detektiert werden.

Für die aus Glyoxal entstehenden Verbindung N^2 -(Carboxymethyl)-5'-GMP (**26**) erwies sich Ribose als bedeutsamster Präkursor unter den evaluierten Kohlenhydraten (**Abbildung 69**).

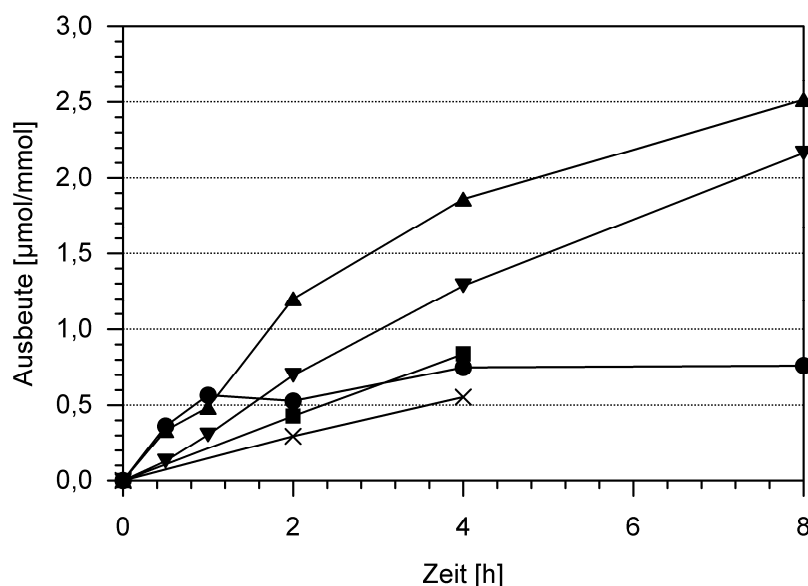


Abbildung 69. Zeitabhängige Bildung von N^2 -Carboxymethyl-guanosin-5'-monophosphat, **26** in Lösungen von Hefeextrakt 3 mit 1,3-Dihydroxyaceton (●), Ribose (▲), Glukose (▼), Maltose (■) oder ohne Zusatz (x) nach thermischer Behandlung bei 100 °C. Die Werte der y-Achse repräsentieren die Ausbeute der Zielverbindungen aus der im Hefeextrakt vorhandenen Ausgangsverbindung Guanosin-5'-monophosphat (**2**).

Dabei wurde eine maximale Ausbeute nach einer Erhitzungsdauer von acht Stunden beobachtet, wobei 2,5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ des ursprünglichen Nukleotids 5'-GMP (**2**) in das glykierte Derivat überführt wurden. Weiterhin zeigte sich Glukose in der Lage das Dicarboxyl Glyoxal freizusetzen, während für die weiteren untersuchten Zusätze keine vermehrte Bildung im Vergleich zum ungespikten Hefeextrakt beobachtet wurde. Generell lagen die Ausbeuten allerdings unter denen für die entsprechenden carboxyethylierten Derivate (**21**).

3.4.4 Diskussion

Zur selektiven Bestimmung der generierten Transformationsprodukte von 5'-GMP (**2**) wurden eine quantitative Bestimmungsmethode auf Basis der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) entwickelt. Der Fokus wurde auf die mengenmäßig dominierenden carboxyethylierten Verbindungen N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) gesetzt. Durch die Umsetzung von **2** mit ubiquitär ^{13}C -markiertem Glycerinaldehyd wurde die Isotopomeren generiert, die nach entsprechender Aufreinigung als interne Standards fungierten.

Durch systematische Anpassung der Trennbedingungen wurde sowohl eine optimale Trennung der Diastereomere (**R**)- und (**S**)-**21** erwirkt, als auch die Möglichkeit geschaffen ein *Screening* der verschiedenen, zuvor isolierten, glykierten Transformationsprodukte durchzuführen. Dabei gelang es erstmalig in Hefeextrakten verschiedenste Derivate aufgrund ihrer spezifischen Massenübergänge zu detektieren, wobei die bei weitem höchsten Intensitäten für **21** beobachtet wurden.

Die folgenden quantitativen Untersuchungen beschäftigten sich neben der carboxyethylierten Verbindung **21**, ebenfalls mit der aus Glyoxal entstehenden Verbindung N^2 -Carboxymethyl-5'-GMP (**26**) sowie dem Säureamid N^2 -((1-(*N*-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**33**). Dabei wurden die Diastereomeren (**R**)- und (**S**)-**21** mit Gehalten bis zu 101,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ Hefeextrakt detektiert, während für (**R**)- und (**S**)-**33** Gehalte bis zu 19,0 $\mu\text{g}/\text{g}$ bestimmt wurden. Für **26** wurde die geringste Konzentration im Rahmen der untersuchten Verbindungen mit bis zu 3,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ detektiert.

Im letzten Schritt wurde der Einfluss zugesetzter Kohlenhydrate auf die Bildung der *Maillard*-Produkte untersucht. Dazu wurden wässrige Lösungen eines Hefeextraktes mit verschiedenen Kohlenhydraten versetzt und die Konzentrationen der drei Schlüsselverbindungen bestimmt. Dabei erwies sich für die Diastereomeren (**R**)- und (**S**)-**21** sowie (**R**)- und (**S**)-**33** 1,3-Dihydroxyaceton als bedeutsamster Präkursor. So wurde nach einer Erhitzungsdauer von acht Stunde etwa 30 % des im Hefeextrakt vorhandenen 5'-GMP (**2**) durch die Triose in die carboxyethylierten Derivate (**21**) überführt. Die Aktivität der komplexeren Kohlenhydrate, wie Ribose und Glukose, erwies sich als deutlich geringer was mit der vergleichsweise langsamen Fragmentierung in die für die Reaktion benötigte Dicarboxylverbindung Methylglyoxal erklärt wurde.

Hingegen zeigte sich im Falle der carboxymethylierten Verbindung (**26**) die Pentose Ribose als potentester Präkursor. Insgesamt waren die detektierten Konzentrationen deutlich geringer als die der zuvor genannten Verbindungen **21** und **33**. Eine mögliche Erklärung stellte dabei der pH-Wert der Hefeextraktlösungen dar. Da ausschließlich eine ungepufferte Lösung verwendet wurde, deren pH-Wert etwa 6-7 betrug, stellte dieses nicht die idealen Bedingungen für die Bildung von **26** dar (siehe **Kapitel 3.3.1**).

3.5 Synthese weiterer N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, stellen die mit aliphatischen Aminen substituierten (S)- N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate eine vielversprechende Substanzklasse zur Studie von Struktur-Wirkungs-Beziehungen dar, da diese ausgeprägte geschmacksverstärkende Eigenschaften aufwiesen. Allerdings wurden diese im bisher verwendeten Modellansatz ausschließlich als Minorprodukte neben den korrespondierenden Aminosäurederivaten **21** gebildet. Die Gewinnung größerer Mengen dieser Amide machte Untersuchungen zur gezielten Steigerung der Ausbeute erforderlich.

3.5.1 Einfluss der Reaktionszeit und des pH-Wertes auf die Bildung von N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphaten

Mit dem Ziel die Ausbeuten an amidierten Derivaten zu erhöhen, wurden pH-Wert und Reaktionszeit variiert und deren Einfluss auf die Bildung der Zielverbindungen untersucht. Dabei wurde als Reaktionssystem erneut ein Gemisch aus 5'-GMP (**2**), 1,3-Dihydroxyaceton und *n*-Propylamin-Hydrochlorid gewählt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ, wobei die Flächen der beiden jeweiligen Diastereomerepaare N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) und N^2 -((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**32**) als Summe ausgewertet wurden, und auf die des bislang genutzten Reaktionssystems (siehe **Kapitel 3.3.3.1**) bezogen wurden.

Wie in **Abbildung 70** dargestellt, zeigte sich für das Ausgangsnukleotid **2** (•) ein konstanter Abbau mit zunehmender Reaktionsdauer. Dahingegen bildeten sich die Verbindungen **21** (■) und **32** (▼) bereits nach 60 min in großem Umfang und erreichten jeweils ihr relatives Maximum nach 240 min. Eine weitere Verlängerung der thermischen Beanspruchung erwies sich als wenig sinnvoll, da für beide Verbindungen ein Plateau erreicht und keine verstärkte Bildung mehr beobachtet wurde.

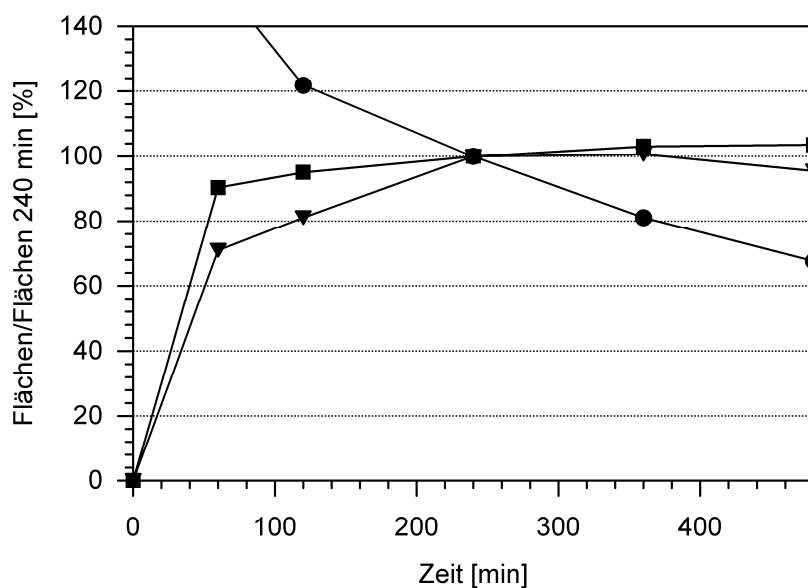


Abbildung 70. Einfluss der Reaktionszeit auf den Abbau von Guanosin-5'-monophosphat, **2** (●) und die Bildung von (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-/(*S*)-**21** (■) und (*R*)-/(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-/(*S*)-**32** (▼). Die erhaltenen Flächen wurden auf die Standardreaktionsbedingungen (100 °C, 240 min, pH 7,4) normiert.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung der freien Säure **21** und der Amide **32** untersucht. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde in allen Fällen Phosphatpuffer verwendet, der auf pH-Werte zwischen 4 und 9 eingestellt wurde.

Unter aziden Bedingungen (pH 4 und 6) wurde das Ausgangsnukleotid **2** (●) vollständig abgebaut und als Produkte ausschließlich die freien α -Aminocarbonsäuren **21** (■) gebildet (**Abbildung 71**). Die korrespondierenden Amide **32** (▼) waren unter diesen Bedingungen nicht detektierbar. Unter neutralen Bedingungen erfolgte auch die Bildung der Amide, während die Gehalte an **21** abnahmen und nicht abreagiertes **2** detektiert wurde. Mit zunehmender Alkalisierung des Reaktionsmediums nahm die Degradation der Ausgangsverbindung (**2**) und die Bildung der freien Aminosäuren **21** zu Gunsten der korrespondierenden Säureamide ab. Unter diesen Reaktionsbedingungen erfolgte eine maximale Bildung der Amide bei pH 9.

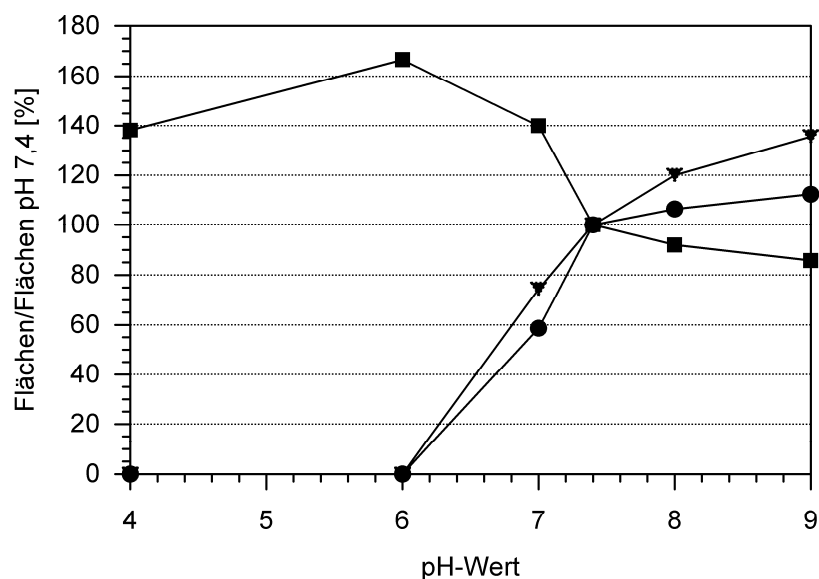


Abbildung 71. Einfluss des pH-Wertes auf die Gehalte von Guanosin-5'-monophosphat, **2** (●), (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-/(*S*)-**21** (■) und (*R*)-/(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-/(*S*)-**32** (▼). Die erhaltenen Flächen wurden auf die Standardreaktionsbedingungen (100 °C, 240 min, pH 7,4) normiert.

Die beschriebenen Versuche zeigten, dass durch Reaktion der Verbindungen unter alkalischen Bedingungen eine nur geringfügige Erhöhung der Säureamidausbeute möglich war. Zur präparativen Gewinnung der Amide in größeren Mengen war die bisherige Herstellungsstrategie basierend auf der *Maillard*-Reaktion somit nicht erfolgversprechend. Darüber hinaus wurde die Synthese zusätzlicher amidierter Verbindungen mittels Modellreaktion durch die limitierte Mischbarkeit unpolarer Amine mit dem wässrigen Reaktionsmedium im Modellsystem beschränkt. Um weiterhin die aufwendige Trennung der diastomeren Amide sowie die Bildung störender, stark gefärbter Reaktionsprodukte zu vermeiden, sollte im Folgenden eine Synthese zur universellen Generierung strukturell variierender (*S*)-*N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate entwickelt werden.

3.5.2 Synthese von *N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphaten

Um einen tieferen Einblick in die sensorische Aktivität der amidierten Derivate von *N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) zu erlangen, sollte im Folgenden eine universell nutzbare Synthesestrategie erarbeitet werden.

Da die Umsetzung von 5'-GMP (**2**) in die entsprechenden Aminosäuren *N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) durch Reaktion mit einer Triose eine hohe Umsatzrate zeigte, wurde dieser Schritt ausschließlich dahingehend modifiziert, dass an Stelle von Glycerinaldehyd das kostengünstigere 1,3-Dihydroxyaceton verwendet wurde. Die Reaktionszeit wurde verkürzt

indem die Reaktion bei erhöhten Temperaturen (70 °C) durchgeführt wurde (**Abbildung 72**). Nach Inkubation für 12 Stunden wurde das Reaktionsgemisch mittels RP-MPLC aufgereinigt, was eine ausreichende Trennung der beiden Isomere ermöglichte. Die Fraktionen wurden vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert, um das Ausgangsmaterial für die zweite Reaktionsstufe zu erhalten. Dabei deuteten Untersuchung mittels ¹H-NMR auf eine Reinheit von >90 % hin, so dass auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde (Ausbeute: 66%).

Die Amidierung von freien Carbonsäuren in die entsprechenden Säureamide stellt eine Standardreaktion der organischen Chemie dar. Zumeist wird die Säure durch Überführung in das entsprechende Säurechlorid aktiviert, das anschließend mit dem freien Amin umgesetzt wird. Alternativ bietet sich eine einstufige Reaktion an, bei der die Säure in Gegenwart eines Kopplungsreagenzes (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid) direkt amidiert wird.

Die Amidierung von *N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**) beinhaltet einige Schwierigkeiten. Zum Einen ist bekannt, dass unter stark sauren Bedingungen die Nukleotide äußerst instabil sind ^[132]. Dies gestaltete eine Aktivierung in Form des Säurechlorids als schwierig, da dieses mit der Bildung beträchtlicher Mengen Salzsäure einhergeht. Zum anderen sind die Verbindungen aufgrund ihres stark polaren Charakters unlöslich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen, sollte die Kopplung desamins in wässriger Lösung durchgeführt werden. Als wasserlösliches Carbodiimid findet häufig *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid Verwendung (**Abbildung 72**), das eine direkte Umsetzung in das entsprechenden Amid unter leicht sauren Bedingungen in wässriger Lösung ermöglichte und bereits erfolgreich zur Synthese von Adenosinphosphatderivaten verwendet wurde ^[133]. Um eine quantitative Umsetzung in das entsprechende Amid zu bewirken, wurde sowohl das Amin als auch das Kopplungsreagenz im Überschuss eingesetzt.

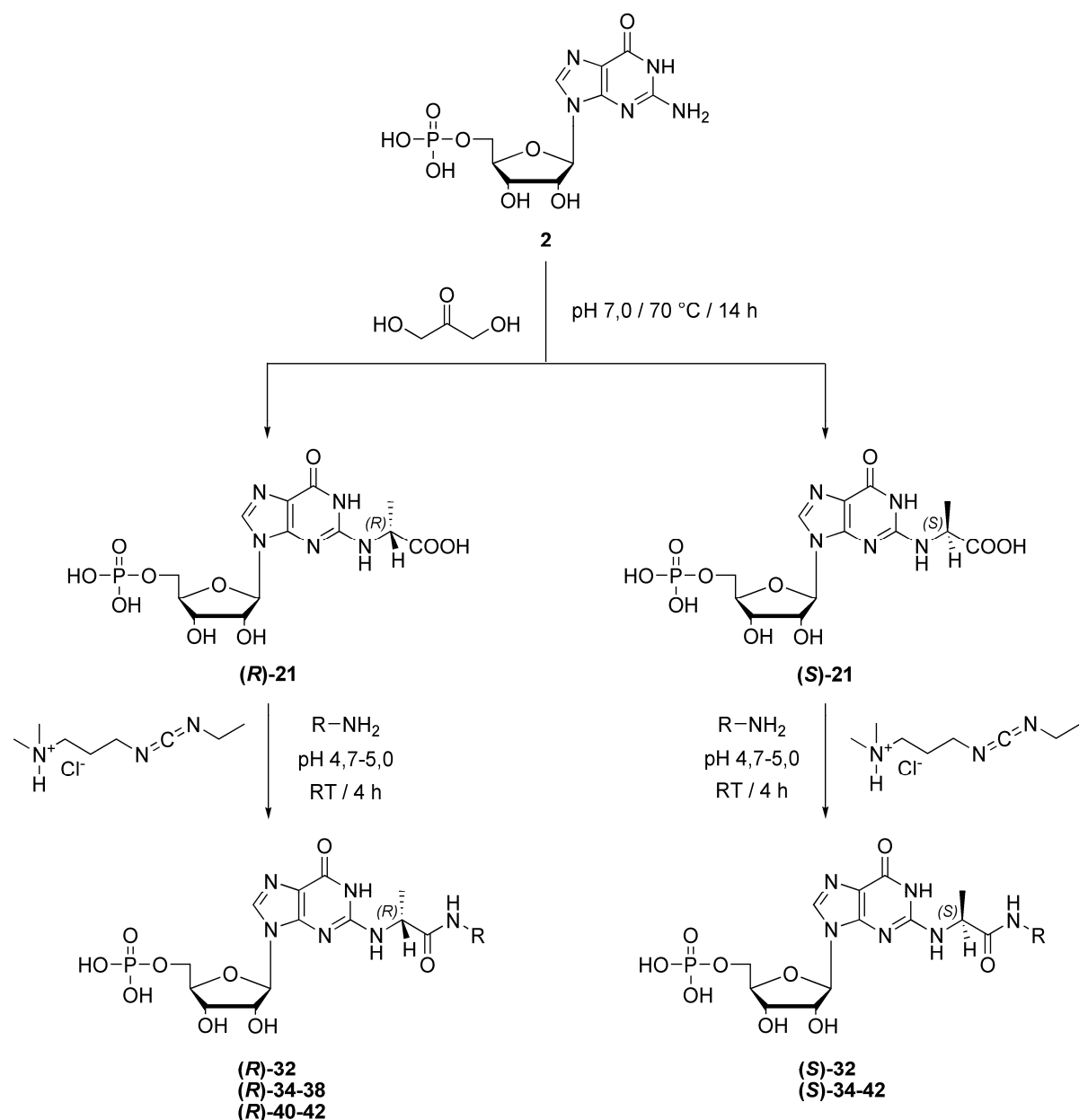


Abbildung 72. Synthesestrategie zur Herstellung der Amide (**R**)-32, (**R**)-34-38, (**R**)-40-42 sowie (**S**)-32, (**S**)-34-42 (Strukturen sind in **Abbildung 74** dargestellt), ausgehend von Guanosin-5'-monophosphat (**2**) über die Aminosäuren (**R**)-/(**S**)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**R**)/(**S**)-21).

Wie **Abbildung 73** veranschaulicht, zeigte sich bereits ohne Inkubationszeit die Bildung eines Hauptproduktes. Während die freie Säure (**S**)-21 eine Retentionszeit von etwa 22 min aufwies (**Abbildung 73, A**), eluierte das Reaktionsprodukt nach 24 min (**Abbildung 73, B**). Dieses konnte mittels Co-Chromatographie mit der aus dem *Maillard*-Ansatz isolierten Verbindung (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-32) eindeutig identifiziert werden.

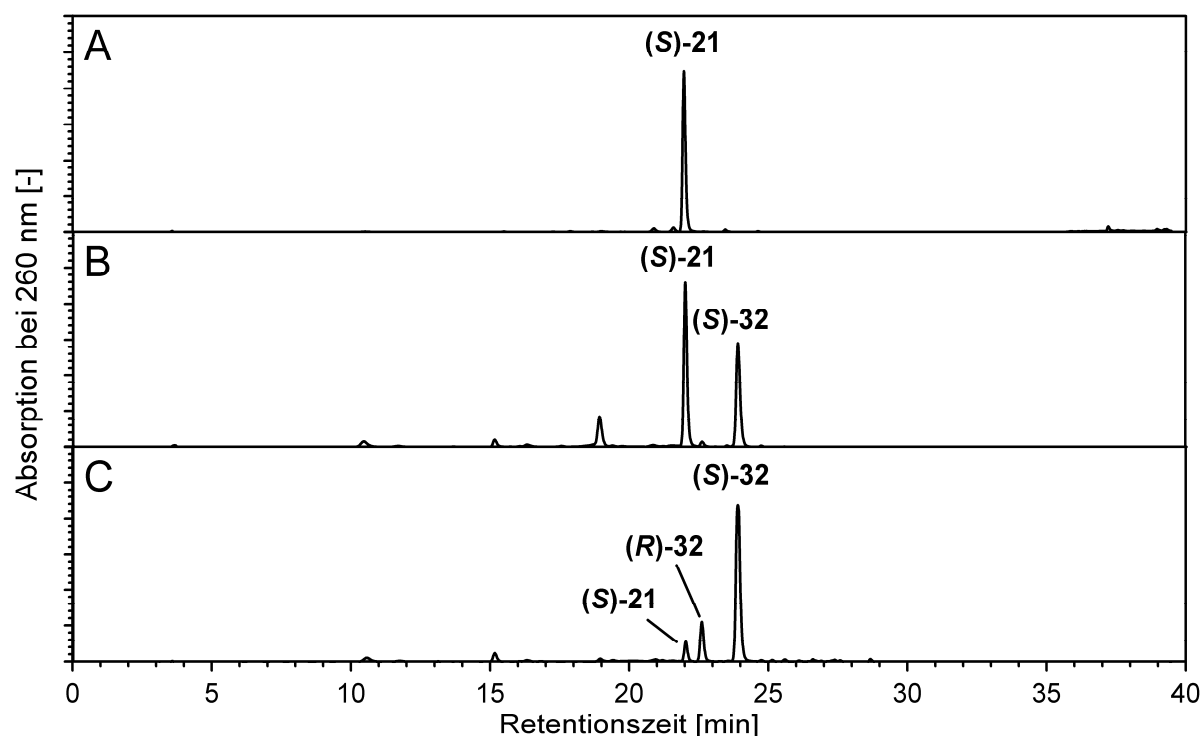
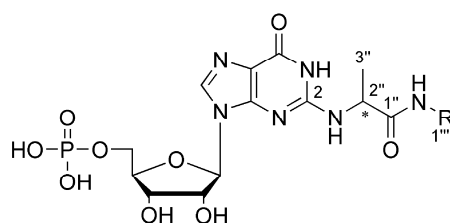


Abbildung 73. RP-HPLC-Trennung ($\lambda = 260$ nm) der aufgereinigten Verbindung (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-**21** (A), und des Gemisches von (**S**)-**21**, *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid und *n*-Propylamin in Wasser (pH 4,7-5,0) nach einer Reaktionszeit von 0 Stunden (B) und 4 Stunden (C) unter Bildung von (*R*)-/(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(**S**)-**32**).

Dies deutete darauf hin, dass bereits die Zeit, die zur pH-Wert-Einstellung und zur Injektion der Probe im entsprechenden HPLC-System benötigt wurde, ausreichend war um eine Umsetzung zu erwirken. Weitere Inkubation (**Abbildung 73, C**) bis zu vier Stunden zeigte eine nahezu quantitative Umsetzung in die entsprechende amidierete Verbindung. Weiterhin wurde keine nennenswerte Umwandlung in die (*R*)-konfigurierten Derivat (**R**)-**32** beobachtet (**Abbildung 73, C**). Für alle weiteren Umsetzungen wurde eine Reaktionszeit von vier Stunden ausgewählt, da es sich zeigte, dass ausgewählte verzweigte oder komplexere Amine vergleichsweise langsam reagierten. Während sich für die unverzweigten, aliphatischen Amine kaum eine Racemisierung zeigte, wurde dies für sterisch gehinderte Amine in einem größeren Maß beobachtet. Um die Gefahr der Aufnahme von potentiell gefährlichen Verbindungen aus den Synthesegemischen zu minimieren, wurden die Zielverbindungen zunächst mittels RP-HPLC gereinigt. Die Fraktion, die das entsprechende Amid enthielt, wurde anschließend im Vakuum eingedunstet und erneut einer präparativen Aufreinigung unterzogen, um das Produkt auch von Spuren des verbleibenden freien Amins zu befreien. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und wiederholter Lyophilisation

standen die in **Abbildung 74** dargestellten Verbindungen für die folgenden spektroskopischen und sensorischen Untersuchungen in hoher Reinheit zur Verfügung.



	R
32	-(CH ₂) ₂ -CH ₃
34	-CH ₃
35	-CH ₂ -CH ₃
36	-CH(CH ₃) ₂
37	-CH(CH ₂ -CH ₂)
38	-(CH ₂) ₃ -CH ₃
39	-CH ₂ -CH((CH ₃) ₂)
40	-(CH ₂) ₄ -CH ₃
41	-(CH ₂) ₅ -CH ₃
42	-furfuryl

Abbildung 74. Übersicht der synthetisierten Amide, basierend auf dem *N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**21**)-Grundgerüst.

Die Strukturaufklärung der Isolate erfolgte mittels HPLC-DAD, LC-TOF-MS, LC-MS und NMR-Spektroskopie, wobei besonderes Augenmerk auf die Bestimmung der korrekten Verknüpfung des Amins mit der Säurefunktion des glykierten Nukleotids gelegt wurde. Dazu wurde die Ausbildung der Verknüpfung zwischen den einzelnen Strukturteilen mittels eines HMBC-Experiments untersucht, wie es in **Abbildung 75** für das Ethylamid (**S**)-**35** dargestellt ist.

Dabei wiesen die Protonen der terminalen Methylgruppe H-C(2'''), deren Signal im hohen Feld bei 1,08 ppm als Triplet mit einer Kopplungskonstante von 7,3 Hz beobachtet wurde, eine heteronukleare Kopplung zum Kohlenstoffatom C(1''') auf, das hochfeldverschoben bei 35,2 ppm detektiert wurde. Die an C(1''') gebundenen Protonen, deren Signal als Quartett mit einer Kopplungskonstante von 7,2 Hz bei 3,20 ppm identifiziert wurde, zeigten neben den ¹H,¹³C-Kopplungen zu C(2''') bei 14,9 ppm eine zusätzliche homonukleare Kopplung zu einem stark tieffeldverschobenen C-Atom mit einer Resonanz bei 177,6 ppm. Dieses wurde durch seine charakteristische Verschiebung als die vormalige Carboxyfunktion C(1'') identifiziert, was die Verknüpfung der Strukturelemente an den erwarteten Positionen bestätigte. Da die weiteren Signale des Moleküls durch Vergleich mit der Ausgangsverbindung **21** bestätigt wurden, wurde die isolierte Verbindung eindeutig als (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Ethylamino)-carbonyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**S**)-**35**) verifiziert und die erwartete Verknüpfung der einzelnen Strukturteile bestätigt.

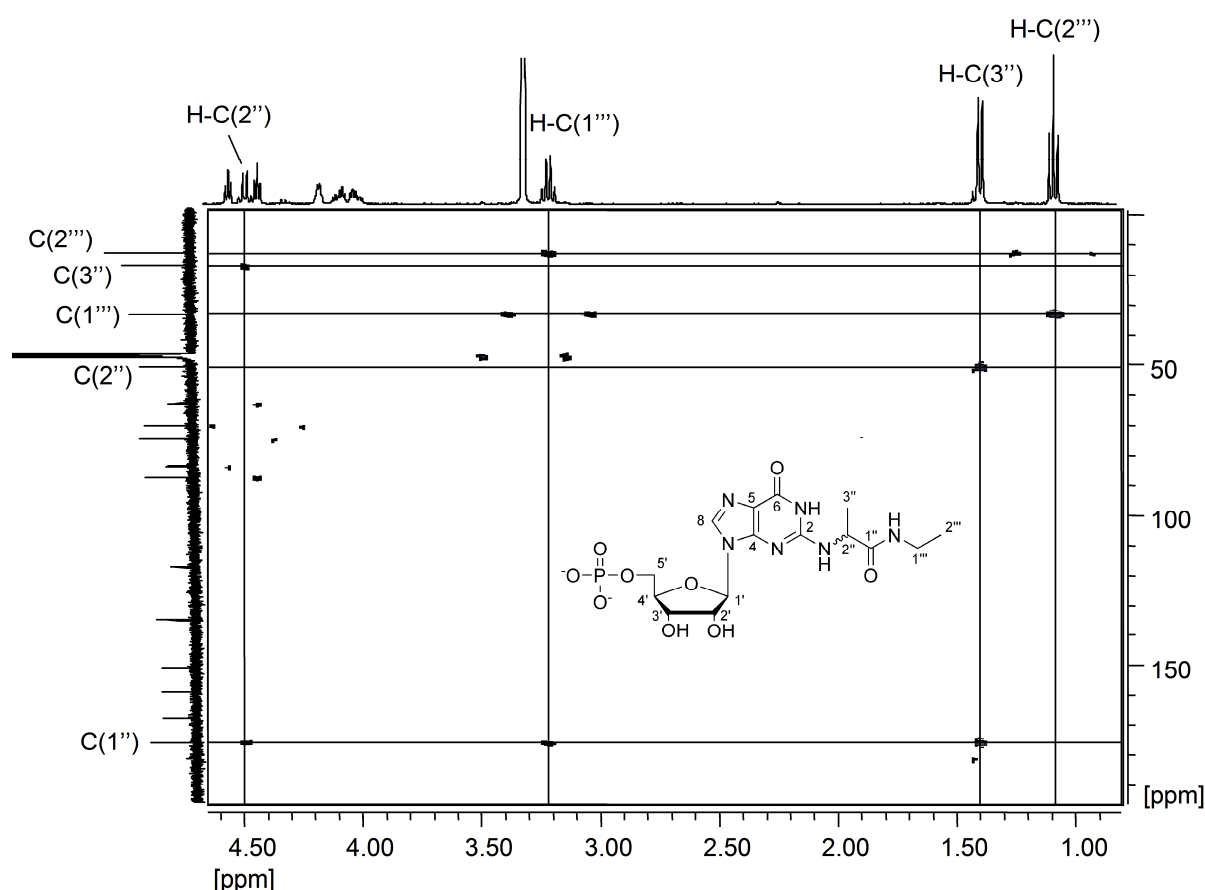


Abbildung 75. Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{NaOD}$) von (*S*)- N^2 -((1-(*N*-Ethylamino)-carbonyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**S**)-35).

Zusammenfassend gelang es eine einfache, synthetische Strategie erfolgreich zu entwickeln, um ausgehend von **2** über die α -Aminosäuren **21** zu den entsprechenden amidierten, diastereomerisch reinen Verbindungen zu gelangen (**Abbildung 72**).

3.5.3 Synthese von N^2 -acylierten Guanosin-5'-monophosphaten

Um den weiteren Einfluss struktureller Modifikation der exozyklischen Aminofunktion zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den oben erwähnten Amiden von N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) zusätzlich N^2 -acylierte 5'-GMP (**2**)-Derivate hergestellt. Neben den bereits in **Kapitel 3.2.6** beschriebenen Verbindungen N^2 -Laktoyl-5'-GMP (**12**) und N^2 -(*S*)-O-Acetyl-laktoyl-5'-GMP (**24**) wurden das in der Literatur synthetisierte Derivat N^2 -Acetyl-5'-GMP (**13**)^[30] sowie das bisher unbekannte N^2 -Furoyl-5'-GMP (**43**) hergestellt. Der synthetische Ansatz basierte, wie ebenfalls in **Kapitel 3.2.6** aufgeführt, auf einer bereits publizierten Methode^[116]. Dabei wurde zunächst Guanosin (**I**, **Abbildung 76**) in Dichlormethan/Pyridin suspendiert und mit Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) umgesetzt um eine bessere Löslichkeit zu erreichen sowie durch Schützen der O^6 -Position unerwünschte Nebenreaktionen zu unterdrücken und die

Aminoacylierung zu beschleunigen (**II, Abbildung 76**)^[116]. Anschließend wurde vorsichtig das entsprechende Acylchlorid zugegeben und durch Methanolyse eine Entfernung der TMS-Schutzgruppen bewirkt (**III, Abbildung 76**). Die Zielverbindungen wurden durch Zugabe von Methanol (im Falle von *N*²-Acetyl-guanosin) oder Wasser (im Falle von *N*²-Furoyl-guanosin) aus den eingeeengten Reaktionsgemischen präzipitiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Die strukturelle Übereinstimmung der isolierten Verbindungen mit den erwarteten, acylierten Derivaten wurde mittels LC-TOF-MS und NMR-spektroskopischen Untersuchungen verifiziert.

Die finale Umsetzung in die korrespondierenden, monophosphorylierten Substanzen wurde durch Reaktion mit Phosphoroxychlorid in Triethylphosphat erreicht (**Abbildung 76**)^[31]. Die Zielverbindungen wurden aus den Reaktionsansätzen mittels präparativer RP-HPLC isoliert und nach Entfernen des organischen Lösungsmittels im Vakuum wiederholt lyophilisiert, um die Verbindungen **12**, **13**, **24** und **43** in ausreichender Reinheit für die folgenden sensorischen Experimente zu erhalten. Dabei wurde der Syntheserfolg erneut mittels LC-MS, LC-TOF-MS sowie 1D- und 2D-NMR bestätigt.

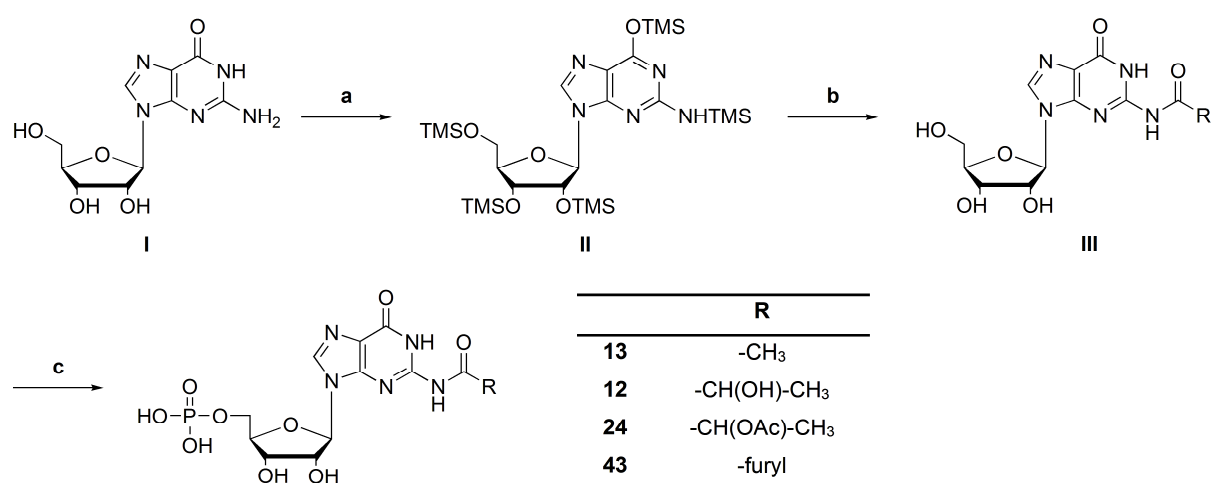


Abbildung 76. Übersicht der synthetisierten Amide, basierend auf dem Guanosin-5'-monophosphat (2)-Grundgerüst; Reagenzien: **a**) Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl), Pyridin, Dichlormethan; **b**) **1**) Acylchlorid; **2**) MeOH; **c**) POCl₃, (EtO)₃PO

3.5.4 Diskussion

Die Klasse der (*S*)-*N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl-guanosin-5'-monophosphate stellt aufgrund der vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten eine interessante Stoffklasse zur Studie von Struktur-Wirkungsbeziehungen dar.

Durch systematische Variation der Schlüsselreaktionsparameter, wie pH-Wert und Zeit, wurde im Modellsystem gezeigt, dass sich das Verhältnis zwischen gebildeter freien Aminosäure **21** und den amidierten Derivaten beeinflussen ließ. Allerdings erwies sich die

Trennung der stereoisomeren Amide als schwierig und die Bildung großer Mengen an Bräunungsprodukten als störend.

Abhilfe wurde durch die Entwicklung einer zweistufigen Synthese geschaffen, in der zunächst mittels *Maillard*-Reaktion die Ausgangsverbindung 5'-GMP (**2**) mit 1,3-Dihydroxyaceton umgesetzt wurde, um die diastereomeren Aminosäuren (*R*)-/(*S*)-*N*^ε-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ((*R*)-/(*S*)-**21**) zu generieren. Diese wurden nach entsprechender Aufreinigung in wässriger Lösung in Gegenwart des Kopplungsreagenzes *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid mit den Aminen umgesetzt. Hierbei wurde die Kopplung unter Erhalt der Stereochemie erreicht. Durch Anwendung dieser Strategie gelang es 19 bisher nicht in der Literatur beschriebene Amide zu synthetisieren. Darüber hinaus wurden durch Verwendung modifizierter Synthesevorschriften aus der Literatur ^[31, 116] die bereits beschriebenen *N*^ε-Acyl-guanosin-5'-monosphate *N*^ε-Lactoyl-5'-GMP (**12**), *N*^ε-Acetyl-5'-GMP (**13**) sowie die bisher nicht beschriebenen Substanzen *N*^ε-(*S*)-O-Acetyl-laktoyl-5'-GMP (**24**) und *N*^ε-Furoyl-5'-GMP (**43**) als Referenzen für die sensorischen Untersuchungen hergestellt.

3.6 Humansensorische Aktivität und Umamirezeptoraktivierung durch N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)- und N^2 -acylierte Nukleotidderivate

3.6.1 Humansensorik

Nach Bestätigung der benötigten Reinheit der Isolate wurden diese auf ihre umamiverstärkenden Eigenschaften untersucht, wobei das bereits in **Kapitel 3.3.5** ausführlich beschriebene Verfahren Verwendung fand. Die ermittelten β -Werte wurden im **Anhang** zusammengefasst.

Obwohl bereits die sensorischen Untersuchungen in **Kapitel 3.3.5** zeigten, dass die (*S*)-Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms eine Voraussetzung für die ausgeprägte umamiverstärkende Eigenschaft der Amide darstellte, wurden ebenfalls die Verbindungen der (*R*)-Reihe untersucht um sicherzustellen, dass es sich dabei um eine generelle Beobachtung handelte. Die Ergebnisse in **Abbildung 77** unterstrichen diese Hypothese. Dabei zeigten die (*R*)-konfigurierten Verbindungen in allen Fällen nahezu eine Inaktivität mit β -Werten um 0,1, was weiterhin die Annahme der hohen Stereoselektivität der Bindungsstellen im Umamigeschmacksrezeptor stärkte. Diese dramatisch reduzierte Aktivität erwies sich als unbeeinflusst von der chemischen Struktur des addierten Amins. Die Analyse der Daten der umamiverstärkenden Eigenschaften der Verbindungen der (*S*)-Reihe erwiesen sich auf den ersten Blick als widersprüchlich. Während die freie Aminosäure (*S*)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ((**S**)-**21**) eine stark ausgeprägte Aktivität aufwies (7,0), führte eine Substitution der freien Carboxyfunktion mit kurzkettigen, aliphatischen Aminen zu einer Reduktion des umamiverstärkenden Effekts. So wurden für (*S*)- N^2 -((1-(*N*-Methylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**34**) und (*S*)- N^2 -((1-(*N*-Ethylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**35**) β -Werte von 4,4 bzw. 4,9 evaluiert. Überraschenderweise kam es danach wieder zu ansteigenden Aktivitäten für das *n*-Propylamid ((**S**)-**32**; 6,0) und insbesondere das *n*-Butylamid ((**S**)-**38**; 7,6), das in der homologen Reihe der aliphatischen Amine eine maximale Aktivität aufzeigte. Eine weitere Verlängerung der Alkylkette resultierte wiederum in reduzierten Aktivitäten für (*R*)- N^2 -((1-(*N*-Pentylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**40**; 4,6) und (*S*)- N^2 -((1-(*N*-Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**41**; 4,0). Dabei beschrieben die Panelisten die unpolaren Derivate, substituiert mit einem langkettigen Amin, als deutlich länger anhaltend, was eine Differenzierung der Testlösung von der Referenz ermöglichte und somit eine objektive Bewertung der wahrgenommenen Umamiintensität erschwerte. Der sensorische Trend eines lang anhaltenden Umamieffektes wurde auch für die stark apolaren Verbindungen (**S**-**40** und (**S**-**41** beobachtet.

Um nun den Einfluss der sterischen Anordnung des Aminosubstituenten auf die geschmacksverstärkenden Eigenschaften zu untersuchen, wurden neben dem *n*-

Propylaminderivat ebenfalls Verbindungen untersucht, die einen Isopropyl- bzw. Cyclopropylaminrest enthielten. Während das verzweigte Isopropylamid (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Isopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**-36) mit demselben β -Wert wie die unverzweigte Verbindung evaluiert wurde (6,0), wurde für das zyklische Amid (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Cyclopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**-37) eine reduzierte Aktivität mit einem β -Wert von 3,4 beobachtet.

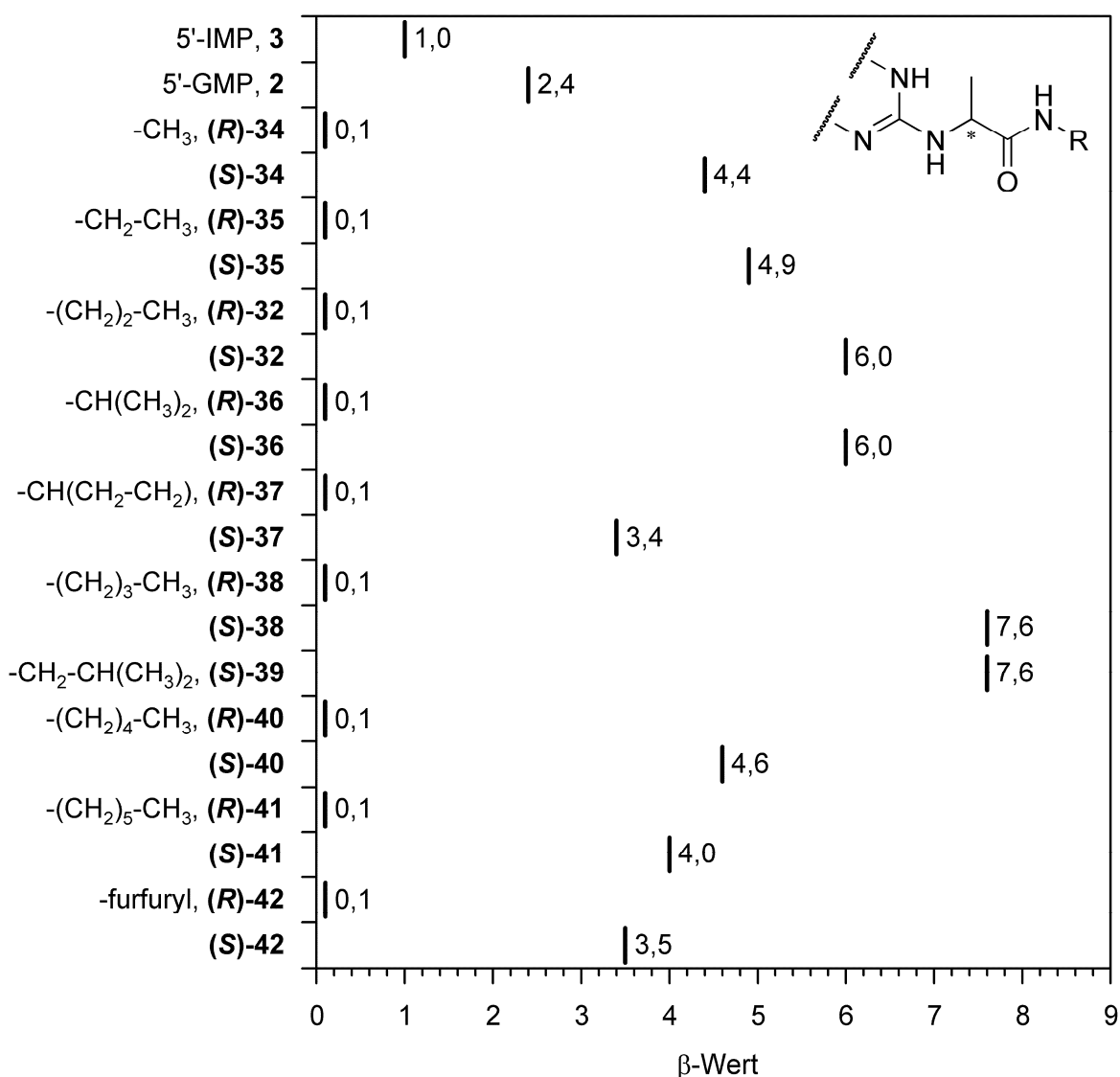


Abbildung 77. Ermittelte umamiverstärkende Aktivität (β -Werte) der synthetisierten *N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl-guanosin-5'-monophosphate (**32**, **34-42**) sowie der Ausgangsverbindung (5'-GMP, **2**) in Relation zu Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP, **3**). Oben rechts: Schematische Darstellung des modifizierten Strukturelementes des Nukleotids.

Um den zu vernachlässigenden Effekt der Verzweigung des Aminrestes zu verifizieren, wurden ebenfalls das unverzweigte (**S**-38 gegen das verzweigte (*S*)-*N*²-((1-(*N*-

Isobutylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**39**) sensorisch evaluiert, wobei für beide Konstitutionsisomere identische β -Werte von 7,6 bestimmt wurden. Damit stellten diese Verbindungen unter den synthetisierten Substanzen die potentesten Umamigeschmacksverstärker dar.

Ein weiterer Aspekt der mit Hilfe der vorliegenden Daten genauer untersucht werden sollte, war der Einfluss eines Furansubstituenten an Position N^2 des Puringrundgerüsts auf die geschmacksmodulierenden Eigenschaften der resultierenden Verbindungen. Dieses sollte insbesondere in Hinsicht auf die herausragende Stärke der in der Literatur beschriebenen Substanz 2-Furfuryl-thioinosin-5'-monophosphat (**8**, **Abbildung 5**) genauer beleuchtet werden, um den Effekt von (**S**)-**21** noch zu maximieren. Allerdings zeigte sich, dass es im Falle der Substitution der freien Carboxyfunktion von (**S**)-**21** mit Furfurylamin ((**S**)-**42**) zu einer Reduzierung der Aktivität kam (7,0 \rightarrow 3,5).

Als weiteres Beispiel eines furanhaltigen Moleküls wurde die acylierte Verbindung N^2 -Furoyl-5'-GMP (**43**) untersucht (**Abbildung 78**). Es zeigte sich auch hier eine im Vergleich zum Ausgangsmolekül **2** nur marginal erhöhte Aktivität (2,4 \rightarrow 2,7). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Beobachtungen in der Literatur nicht ausschließlich auf die Natur des Furanrestes zurückzuführen waren, sondern vielmehr die Struktur des Gesamtmoleküls von entscheidender Bedeutung zu sein schien. Um einen besseren Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten zu gewährleisten, wurden auch die publizierten Verbindungen N^2 -Laktoyl-5'-GMP (**12**), N^2 -Acetyl-5'-GMP (**13**) sowie das noch nicht beschriebene Syntheseintermediat N^2 -(*S*)-O-Acetyllaktoyl-5'-GMP (**24**) sensorisch evaluiert (**Abbildung 78**). Insbesondere **13** erwies sich als stark geschmacksverstärkend, wobei der Effekt allerdings weniger ausgeprägt war als beim entsprechenden natürlich vorkommenden Purin **2** (2,4 \rightarrow 1,9). Weiterhin beschrieben die Panelisten den hervorgerufenen sensorischen Effekt als stark abweichend von dem des Ausgangsnukleotids, da für **13** eine länger anhaltende Umamiperzeption beobachtet wurde. Für das entsprechende Laktamid **12** wurde überraschenderweise nur ein sehr schwacher geschmacksverstärkender Effekt festgestellt. Obwohl es sich strukturell um ein Analogon zu **21** handelte, zeigte sich eine große Diskrepanz zwischen den evaluierten β -Werten, die im Falle der Aminosäure mit 7,0, im Falle des Amids lediglich mit 0,4 bestimmt wurde. Das im Rahmen der Synthese von **12** erhaltene O-acetylgeschützte Milchsäurederivat **24** erwies sich unter den evaluierten, acylierten Substanzen als schwächste Verbindung (0,2).

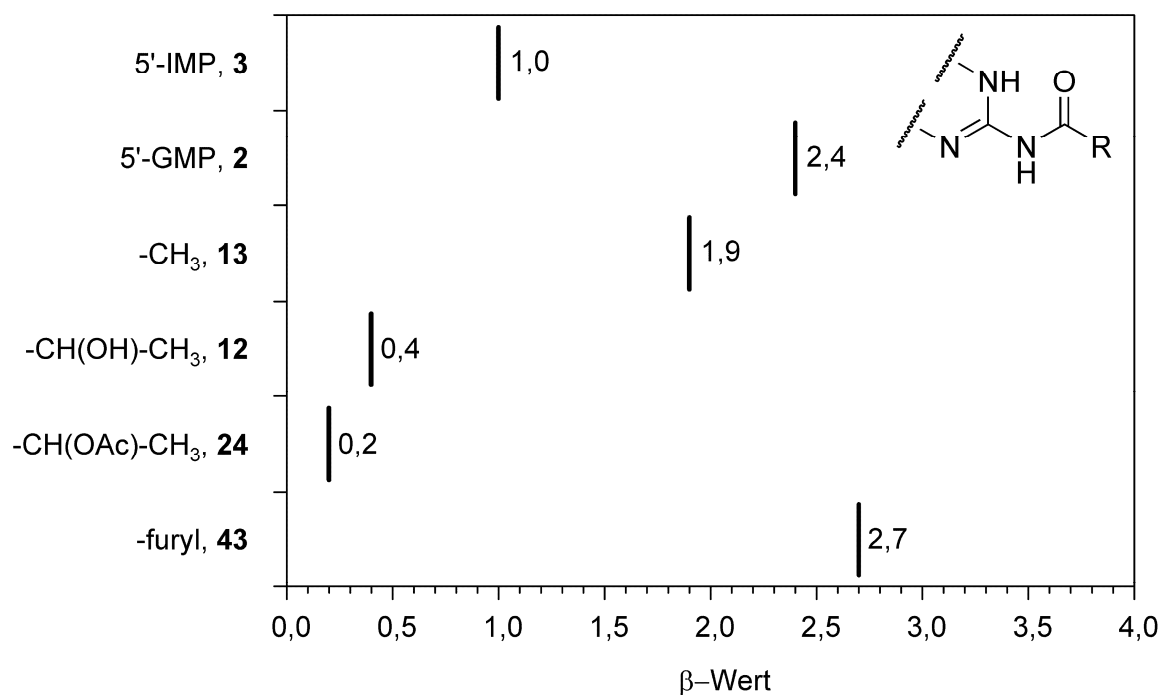


Abbildung 78. Ermittelte umamiverstärkende Aktivität (β -Werte) der synthetisierten N^2 -Acyl-guanosin-5'-monophosphate (**12**, **13**, **24**, **43**) sowie der Ausgangsverbindung (5'-GMP, **2**) in Relation zu Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP, **3**). Oben rechts: Schematische Darstellung des modifizierten Strukturelementes des Nukleotids.

3.6.2 Sensorische Studien zum Zeit-Intensitäts-Verlauf der Umamigeschmacksverstärkung ausgewählter 5'-GMP-Derivate

In den vorhergehenden sensorischen Untersuchungen bemerkten die Panelisten wiederholt, dass sich einige der Verbindungen deutlich in der Dauer des wahrgenommenen Umamieffekts unterschieden. Dieses Phänomen wurde im Folgenden daher näher untersucht. Dazu wurden neben dem Purin 5'-GMP (**2**), die freie Aminocarbonsäure (*S*)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ((**S**)-**21**) sowie die beiden Amide (*S*)- N^2 -((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**32**) und (*S*)- N^2 -((1-(*N*-Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP ((**S**)-**41**) als Beispielmoleküle für weitere sensorische Studien herangezogen.

Das Sensorikpanel wurde zu diesem Zweck instruiert die wahrgenommene Intensität mittels Mauszeiger auf einer linearen Skala von „nicht detektierbar“ bis „stark detektierbar“ zu bewerten, während die ermittelten Datenpunkte alle 100 ms mit Hilfe der Software FIZZ elektronisch aufgezeichnet wurden. Um die Teilnehmer mit dem experimentellen *Set-up* vertraut zu machen, wurden diese zuvor wiederholt trainiert den zeitlichen Verlauf der Umamiwahrnehmung einer Mischung von **2** (0,05 mM) in einer wässrigen Lösung von MSG (**1**) (3 mM, pH 6,0) aufzuzeichnen. Dazu wurden 10 mL der Testlösung für 5 s im Mundraum zirkuliert, bevor diese ausgespuckt wurden. Die Aufzeichnung der wahrgenommenen

Intensität begann sobald die Lösung in den Mundraum genommen wurde und endete, wenn kein Umamigeschmack mehr detektierbar war.

Nach ausreichendem Training wurden die Panelisten aufgefordert die zeitlichen Verläufe für die strukturell variierenden Verbindungen **2**, **(S)-21**, **(S)-32** und **(S)-41** aufzunehmen. Um Unterschiede in der wahrnehmbaren Gesamtdauer zu bestimmen, wurde über die gesamte Testgruppe eine Mittelwertskurve berechnet und die Dauer des Umamigeschmacks direkt als y-Achsenabschnitt extrahiert (**Abbildung 79**). Dabei zeigte das native Purinnukleotid **2** die kürzeste Effektdauer. Die berechnete Mittelwertskurve ergab für die Kontinuität der Umamigeschmackswahrnehmung einen Wert von 35,7 s. Dahingegen zeigte sich bereits bei der Substitution der exozyklischen N^2 -Aminofunktion mit einer Carboxyethylgruppe, wie in **(S)-21**, eine erhebliche Erhöhung der Umamipersistenz mit einem Wert von 57,2 s. Diese Dauer wurde durch Substitution der freien Carboxyfunktion mit einem unpolaren, aliphatischen Amin weiterhin gesteigert, wobei zwischen den untersuchten Propyl- (**(S)-32**) und Hexylamid (**(S)-41**) nur geringe Unterschiede beobachtet wurden (**Abbildung 79**).

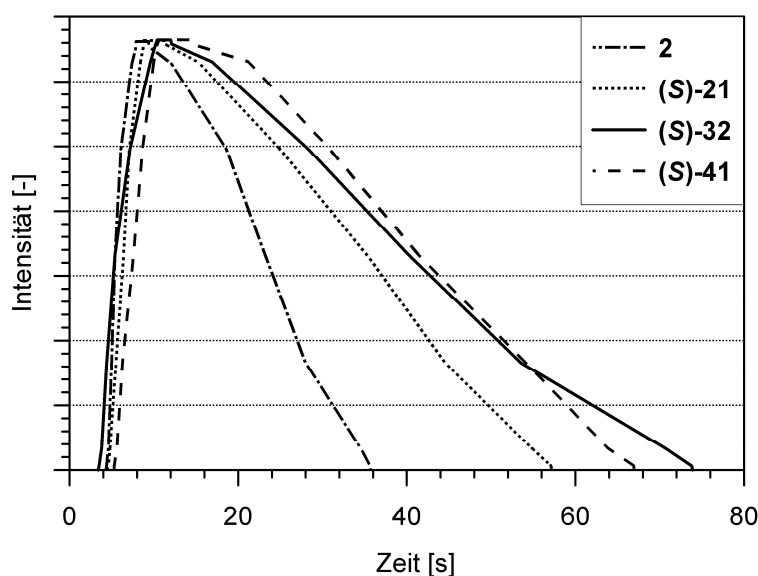


Abbildung 79. Berechnete Mittelwertskurven für die wahrgenommenen Zeit-Intensitäts-Verläufe der Umamiwahrnehmung von Guanosin-5'-monophosphat (5'-GMP, **2**), (S)- N^2 -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**(S)-21**), (S)- N^2 -((1-(N-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**(S)-32**) und (S)- N^2 -((1-(N-Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (**(S)-41**). Die Intensitäten sind normalisiert dargestellt.

Diese Ergebnisse bestätigten die bei der Evaluierung der β -Werte entdeckte Beobachtung, dass die zu untersuchenden Verbindungen nicht nur aufgrund ihrer Intensität, sondern vielmehr auch durch ihr differierendes *Time-Intensity*-Profil von den natürlich vorkommenden Purinnukleotiden zu unterscheiden waren. Weiterhin erwies sich die Aufnahme von Zeit-Intensitäts-Verläufen als geeignetes Mittel um die sensorischen Eigenschaften von

Nukleotidderivaten nicht nur im Hinblick auf ihre Intensität, sondern auch auf die Kontinuität der Geschmackswahrnehmung zu untersuchen.

3.6.3 Modulierende Eigenschaften von 5'-GMP-Derivaten auf den Response von hT1R1/rT1R3 Umamirezeptorzellen *in vitro*

Obwohl die potentiellen Rezeptorkandidaten für die Detektion des Umamigeschmacks bereits vor einigen Jahren entdeckt und beschrieben wurden ^[94, 99], existieren nur wenige Studien die humansensorische- mit Rezeptordaten korrelieren. Da die humansensorischen Werte für die untersuchten N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate auf eine hohe Stereoselektivität der Bindungsstellen am Umamirezeptor hindeuteten, wurde der geschmacksverstärkende Effekt einiger Nukleotidderivate auf den L-Glutamat-induzierten *Response* am chimären hT1R1/rT1R3-Rezeptor untersucht. Dazu wurde in humanen Embryonierzellen PEAK^{Rapid}, die die G-Protein-Untereinheit mGα15 exprimieren, die Aktivierung der Umamirezeptorkombination hT1R1 und rT1R3 untersucht. Durch die Messung der Fluoreszenz eines Farbstoffes, der auf die Calciumausschüttung aus intrazellulären Lagern reagierte, wurde eine Aktivierung messbar gemacht.

Eine schematische Darstellung der biochemischen Reaktionen innerhalb des verwendeten Umamirezeptorassays ist in **Abbildung 80** gezeigt.

Da in der Literatur bereits bekannt war, dass L-Glutamat sowie die umamiverstärkenden Nukleotide mit der T1R1-Untereinheit des Rezeptorheterodimerenpaares interagieren, war anzunehmen, dass der in dieser Studie verwendete Rezeptor vergleichbare Ergebnisse zu den humanen Geschmacksrezeptorzellen lieferte. In Hinblick auf die Sensitivität für L-Glutamat zeigten sich die pharmakologischen Kriterien des verwendeten Expressionssystem im Einklang mit in der Literatur publizierten *in vitro* Daten ^[100].

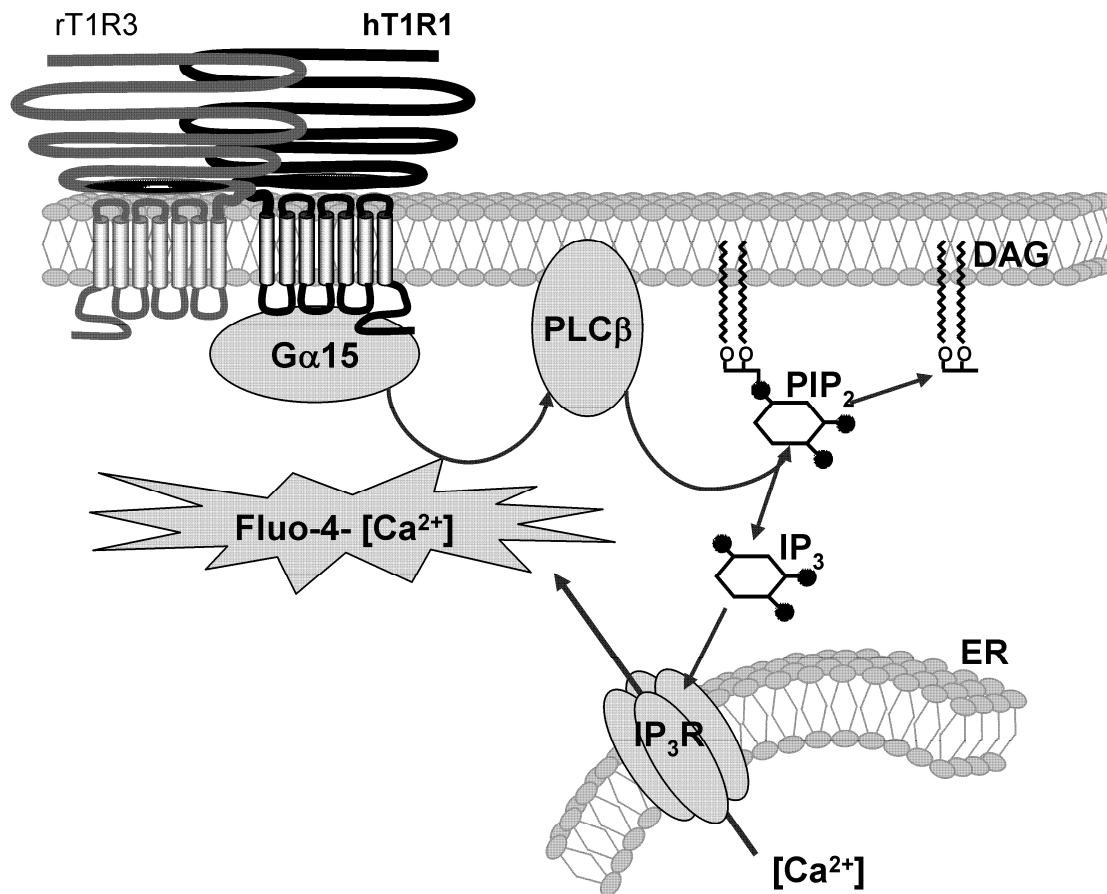


Abbildung 80. Schematische Darstellung der biochemischen Reaktionskaskade innerhalb des verwendeten Umamirezeptorassays. Der Agonist interagiert zunächst mit der T1R1-Einheit des Rezeptordimerenpaares (hT1R1/rT1R3). Als Resultat erfolgt die Interaktion von Rezeptor mit der G-Protein-Untereinheit mGα15 (Gα15) was eine Stimulation der Phospholipase C-β (PLCβ) bewirkt. Dieses resultiert in der Hydrolyse von membrangebundenen Phosphoinositolbisphosphat (PIP₂). Das freie Triphosphat (IP₃) öffnet den IP₃R Kanal (IP₃R) was das Ausströmen von [Ca²⁺] in das Zelllumen bewirkt. Das freigesetzte [Ca²⁺] bildet anschließend mit Fluo-4 eine mittels *Fluorometric Imaging Plate Reader* (FLIPR) messbare, fluoreszierende Verbindung (Fluo-4-[Ca²⁺]). Grafik mit freundlicher Genehmigung von Dr. Anne Brockhoff, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke.

Die Calciumspuren der hT1R1/rT1R3-exprimierenden Zellen und der Mock-transfizierten Zellen (Kontrolle) nach der Applikation der zu testenden Verbindungen 5'-GMP (**2**), 5'-IMP (**3**) und (*R*)-/(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (*R*)-/(*S*)-**21** (jeweils 0,05 mmol/L) in Gegenwart und Abwesenheit von L-Glutaminsäure (0,5 mmol/L) sind in **Abbildung 81, A** dargestellt.

Die Ergebnisse der rezeptorbasierten Untersuchungen zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten der Humansensorik. Dabei verstärkten die Nukleotide **2**, **3** und (*S*)-**21** bei einer Co-Applikation mit L-Glutaminsäure die Antwort der Umamirezeptorzellen, während sich das entsprechende Isomer (*R*)-**21** als inaktiv erwies (**Abbildung 81, A**).

Der Vergleich der ermittelten Zellantworten der hT1R1/rT1R3-exprimierenden Zellen auf die ausschließliche Applikation von L-Glutaminsäure (0,5 mmol/L) und die Co-Applikation verschiedener (S)/(R)-N²-(1-Alkylamino)carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate (**21**, **32**, **36**, **37**, **41**, **42**; jeweils 0,05 mmol/L) wies signifikant erhöhte Rezeptorantworten (P < 0.05) in Gegenwart der jeweiligen (S)-konfigurierten Isomere auf, während die entsprechenden (R)-Isomere nahezu keine Aktivität aufwiesen, was sich wiederum in guter Übereinstimmung mit den humansensorischen Daten befand (**Abbildung 81, B**).

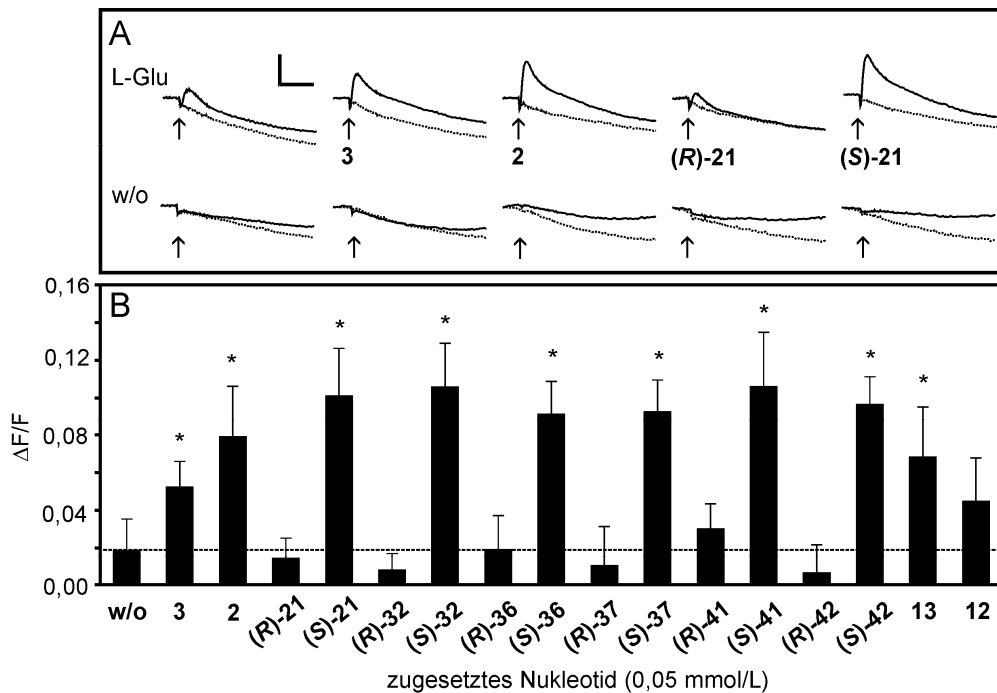


Abbildung 81. Verstärkender Effekt von Nucleotidderivaten auf den hT1R1/rT1R3 Umamirezeptor. **(A)** Calciumspuren der hT1R1/rT1R3-exprimierenden Zellen (durchgehende Linien) und der Mock-transfizierten Zellen (gepunktete Linien) nach Applikation (↑) der untersuchten Nucleotide (0,05 mmol/L) in Anwesenheit (0,5 mmol/L, obere Reihe) und Abwesenheit von L-Glutaminsäure (untere Reihe); Skalierung: y-Achse, 900 counts. x-Achse, 2 min. **(B)** Zellantwort der T1R1/T1R3-exprimierenden Zellen auf die ausschließliche Applikation von L-Glutaminsäure (w/o; 0,5 mmol/L) sowie Co-Applikation mit Nucleotiden (0,05 mmol/L). Fluoreszenzsignale wurden durch die Hintergrundfluoreszenz reduziert ($\Delta F/F$) und auf die Basisfluoreszenz im *Well* normalisiert. Signifikant erhöhte Zellantworten durch Co-Applikation der Nucleotide im Vergleich zu L-Glutaminsäure sind durch Sterne gekennzeichnet (P < 0.05). Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke.

Die zusätzlich untersuchten N²-Acyl-5'-GMP-Derivate **12** und **13** zeigten ebenfalls einen verstärkten Effekt auf den hT1R1/rT1R3-Rezeptor in der Gegenwart von L-Glutaminsäure, wobei allerdings ausschließlich N²-Acetyl-5'-GMP (**13**) einen signifikant erhöhten Effekt

aufwies (**Abbildung 81, B**). Die im Vergleich mit den (*S*)-*N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphaten verringerte Aktivität dieser *N*²-Acyl-guanosin-5'-monophosphate unterstützte humansensorischen Untersuchungen, die für diese Substanzklasse niedrigere β -Werte aufzeigte (siehe **Anhang**). Zur detaillierten Bestimmung der umamiverstärkenden Eigenschaften ausgesuchter Derivate wurden die Stereoisomere (**R**)-**21** und (**S**)-**21** (0,05 mmol/L) ausgewählt, um die *Dose-Response*-Kurven der hT1R1/rT1R3 exprimierenden Zellen im Vergleich zu **2** und **3** zu untersuchen (**Abbildung 82**). Die erhaltenen Mittelwerte der $\Delta F/F$ -Verhältnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden halblogarithmisch gegen die Konzentration an L-Glutaminsäure aufgetragen und zur Ermittlung der EC_{50} -Werte (zur halbmaximalen Aktivierung der Rezeptorzellen notwendige Konzentration) mittels nichtlinearer Regression verwendet (**Abbildung 82**).

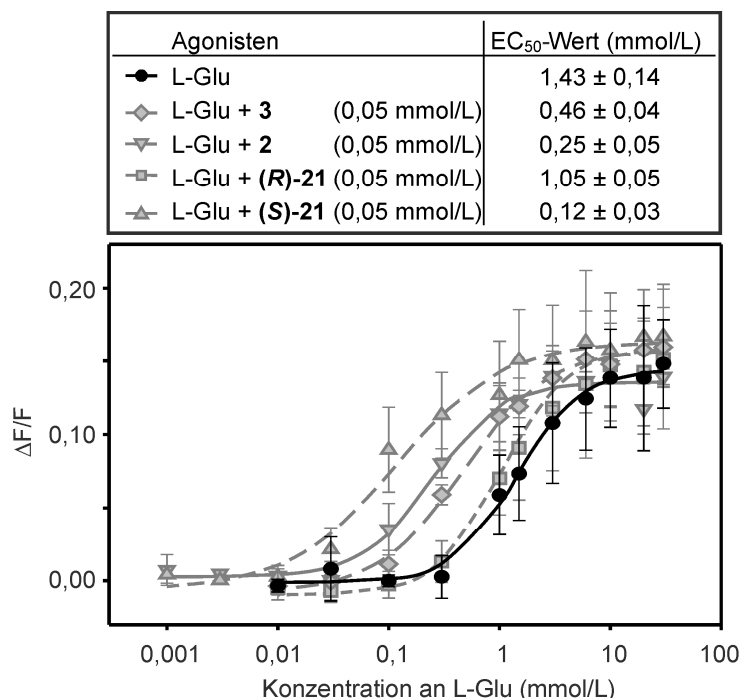


Abbildung 82. *Dose-Response*-Kurven von L-Glutaminsäure (L-Glu) in Abwesenheit (schwarze Linie) und Anwesenheit verschiedener Nukleotide (0,05 mmol/L, graue Linien), $n = 3$. Konzentrationen für die halbmaximale Rezeptoraktivierung (EC_{50}) wurden mittels SigmaPlot9 berechnet. Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke.

Die Anwesenheit der Nukleotide induzierte eine Verschiebung der *Dose-Response*-Kurve von L-Glutaminsäure in Richtung niedriger Aminosäurekonzentrationen, was auf eine umamiverstärkende Wirkung der Purine hindeutete. Innerhalb der evaluierten Verbindungen zeigte sich insbesondere (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ((**S**)-**21**) als äußerst potenter Geschmacksverstärker dessen EC_{50} -Wert von 0,12 mmol/L im Vergleich zu L-Glutaminsäure (1,43 mmol/L) bzw. dem binären Gemisch von L-Glutaminsäure und 5'-GMP (**2**, 0,25 mmol/L)

deutlich reduziert war. Wiederum zeigte das (*R*)-konfigurierte Diastereomer (**R**)-**21** lediglich eine marginale Aktivität mit einem EC₅₀-Wert von 1,05 mmol/L.

3.6.4 Diskussion

Nach der erfolgreichen Synthese diverser Verbindungen basierend auf dem Guanosin-5'-monophosphat-Grundgerüst, wurden diese sowohl mittels Humansensorik als auch durch rezeptorbasierte Messung am chimären hT1R1/rT1R3 untersucht. Der Vergleich der humansensorischen Daten (siehe **Anhang**) der freien Aminosäure (**S**)-**21** sowie der (*S*)-*N*²-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosine-5'-monophosphate (**S**)-**32** (Propylamid), (**S**)-**36** (Isopropylamid), (**S**)-**37** (Cyclopropylamid), (**S**)-**41** (Hexylamid) und (**S**)-**42** (Furfurylamid) mit dem *Response* des heterodimeren Rezeptorpaars hT1R1/rT1R3 wies einige augenscheinliche Differenzen auf. Während die Rezeptorantwort für die Nukleotidderivate vergleichbar war, erwiesen sich die humansensorisch evaluierten β -Werte für (**S**)-**21**, (**S**)-**32** und (**S**)-**36** als deutlich höher als die von (**S**)-**37** und (**S**)-**41**. Da das verwendete Rezeptorsystem, bestehend aus menschlichen T1R1 und Ratten T1R3, hochselektiv für L-Glutamat (**1**) war und sich in Übereinstimmung mit psychophysikalischen Belegen befand^[99], sollten die Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten nicht durch die Verwendung eines chimären Rezeptors erklärt werden können. Weiterhin wurden die Rezeptorbindungsstellen für die Interaktion mit L-Glutamat in der extrazellulären *Venus flytrap* Domäne des T1R1 lokalisiert^[100], was die Verwendung des Nagetier T1R3 im vorliegenden Assay als wenig bedeutsam für die Spezifität des Rezeptors erscheinen ließ. Ein möglicher Erklärungsansatz ergab sich aus einer kürzlich publizierten Beobachtung zur Wahrnehmung von Bierbitterstoffen. Dabei zeigte sich, dass es bei der Aufnahme der Verbindungen in den Mundraum zu Interaktionen mit der oralen Mukosa und/oder Proteinen kam, was dazu führte, dass die Substanzen nicht vollständig für die Interaktion mit den Geschmacksrezeptoren zur Verfügung standen^[89]. Dies könnte eine mögliche Erklärung darstellen, da insbesondere die sehr unpolaren (**S**)-**37** und (**S**)-**41** eine drastisch reduzierte Aktivität in den humansensorischen Untersuchungen aufwiesen. Zur Messung der *in-mouth* Retention ist die Entwicklung neuer Techniken notwendig, um in Zukunft genauere Aussagen über den Verbleib der Geschmacksstoffe treffen zu können.

Zuletzt wurde durch die Aufnahme von Zeit-Intensitäts-Kurven gezeigt, dass es durch die Substitution der exozyklischen Aminofunktion von **2** unter Bildung der freien Aminocarbonsäure (**S**)-**21** zu einer Verlängerung der Umamigeschmackswahrnehmung kam. Dieser Effekt wurde durch Substitution der freien Carboxyfunktion mit unpolaren, aliphatischen Aminen wie *n*-Propylamin ((**S**)-**32**) oder *n*-Hexylamin ((**S**)-**41**) verstärkt. Dieses stimmte mit den Beobachtungen der Panelisten bei der Bestimmung der β -Werte überein, da vielen Teilnehmern neben der Variation der Intensität zwischen den Verbindungen ein

deutlicher Unterschied im Geschmacksprofil auffiel. Eine mögliche Erklärung stellte dabei die schlechtere Wasserlöslichkeit der apolaren Verbindungen dar, die in einer erschwerten Reinigung des Mundraums und damit in einer längeren Wahrnehmung des Geschmacks resultierte. Zur Verifizierung dieser Annahme gilt es in Zukunft geeignete Messverfahren zu entwickeln. Die Daten der Zeit-Intensitäts-Messungen weisen auf die Notwendigkeit hin geschmacksverstärkende Nukleotide nicht nur in ihrer Intensität sondern auch in ihrer Kontinuität zu beschreiben.

4 Experimenteller Teil

4.1 Reagenzien und Materialien

1,3-Dihydroxyaceton Dimer, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2'-Desoxyadenosin Monohydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat Natriumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2',5'-Dideoxyadenosin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Furoylchlorid, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Aceton, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (Gradient Grade), Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Acetylchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Adenosin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Adenosin-5'-monophosphat Monohydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N⁶-(1,2-Dicarboxyethyl)-adenosin-5'-monophosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure (99 %), Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Ammoniumacetatlösung (~5 M), Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Argon 5.0, Westfalen AG, Münster, Deutschland
Butylamin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid gekörnt, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chlortrimethylsilan, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cyclopropylamin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cytidin-5'-monophosphat Dinatriumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-(-)-Erythrose, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
D-(+)-Glukose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-Maltose Monohydrat, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
D-(-)-Ribose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DL-Glycerinaldehyd ≥95 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dichlormethan (wasserfrei), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (99.5 %), Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Ethanol (absolut), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylamin-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Guanosin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Guanosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz Hydrat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Glyoxallösung (40 %-ig in Wasser), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Heptafluorbuttersäure, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Hexylamin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Hypoxanthin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Inosin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Inosin-5'-monophosphat Octahydrat Dinatriumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isobutylamin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropylamin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Alanin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Arginin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Asparagin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Asparaginsäure, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Glutaminsäure, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Glutamin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Histidin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Isoleucin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Leucin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Lysin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Methionin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Phenylalanin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Prolin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Serin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Threonin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Tryptophan, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Tyrosin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
L-Valin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Methanol (Gradient Grade), Mallinckrodt Baker, Griesheim
Methylamin-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Mononatrium-L-Glutamat Monohydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Deutschland
N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich (Fluka),
Steinheim, Deutschland
Natriumborat/-citratpuffer (0,2 mol/L, pH 8,6), Laborservice Onken GmbH, Gründau,
Deutschland
Natriumcitratpuffer (0,2 mol/L, pH 2,65), Laborservice Onken GmbH, Gründau, Deutschland
Natriumcitratpuffer (0,2 mol/L, pH 3,35), Laborservice Onken GmbH, Gründau, Deutschland
Natriumcitratpuffer (0,2 mol/L, pH 4,25), Laborservice Onken GmbH, Gründau, Deutschland
Natriumhydroxidlösung (0,4 mol/L), Laborservice Onken GmbH, Gründau, Deutschland

Natriumhydroxidlösung (0,1 mol/L, 1 mol/L), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pentylamin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Propylamin-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pyridin (wasserfrei), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
(S)-(-)-2-Acetoxypropionylchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäurelösungen (0,1 mol/L, 1 mol/L), Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Tetrabutylammoniumhydroxid, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Triethylamin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Uridine-5'-monophosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xanthin, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland
Xanthosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Das Wasser für die HPLC-Messungen wurde mittels eines Milli-Q Advantage A10 Systems (Millipore, Molsheim, Frankreich) aufgereinigt. Für alle sensorischen Untersuchungen wurde kommerziell erhältliches Mineralwasser (Evian[®], Danone, Wiesbaden, Deutschland) verwendet.

Isotopenmarkierte Substanzen

[²D₆]-Dimethylsulfoxid (0,03 % TMS), Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
DL-[¹³C₃]-Glycerinaldehyd, Omicron, South Bend, USA
[²D₄]-Methanol (0,03 % TMS), Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
Deuteriumoxid, Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
Natriumdeuteroxid (40 % w/w Lösung in D₂O), Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
[¹⁵N₅]-Adenosin-5'-monophosphate Dilithiumsalz, Euriso-top, Gif-sur-Yvette, Frankreich
3-(Trimethylsilyl)-propion-2,2,3,3-D₄-säure Natriumsalz 98 atom % D, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Materialien

0,45 µm Membranfilter, Satorius AG, Goettingen, Deutschland
LiChroprep[®] RP-18 (25-40 µm), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Norell SP 5000 oder ST 500 NMR Röhren, 178 x 5 mm ä.D., Norell, Landisville, USA
Schott Economic NMR Röhren, 178 x 5 mm ä.D., Schott AG, Mainz, Deutschland
Seesand (gereinigt und gegläht), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

4.2 Untersuchungsmaterial

Die verschiedenen Hefeextraktproben wurden von der Firma Bio Springer (Maisons-Alfort Cedex, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

4.3 Isolierung von Umamigeschmacksmodulatoren aus nukleotidreichen Hefeextrakten

4.3.1 RP-MPLC/GVA des Hefeextraktes 3

Zur Isolierung der geschmacksmodulierenden Verbindungen wird ein Aliquot von Hefeextrakt 3 (2 g) in Wasser gelöst (20 mL) und anschließend mittels RP-MPLC (siehe **Kapitel 4.7.1**) aufgereinigt. Die erhaltenen Subfraktionen werden getrennt voneinander aufgefangen. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen aus vier Läufen wird das organischen Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung zweimalig gefriergetrocknet bevor die Ausbeuten gravimetrisch bestimmt werden.

Die Fraktionen werden in zwei gleiche Teile aliquotiert, von denen einer mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA, siehe **Kapitel 4.8.5**), der andere mittels matrixsimulierter Geschmacksverdünnungsanalyse (mGVA, siehe **Kapitel 4.8.6**) untersucht wird.

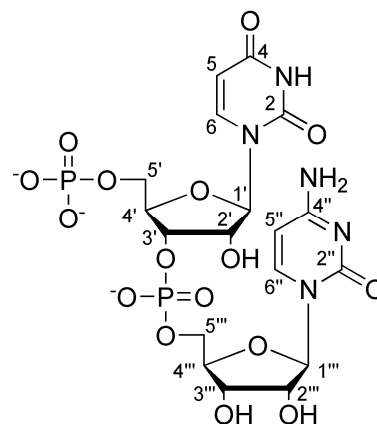
4.3.2 HPLC/vergleichende Geschmacksprofilanalyse der RP-MPLC Fraktion VI

Ein Aliquot der RP-MPLC Fraktion VI (25 mg) wird in Wasser (2 mL) gelöst und anschließend mittels präparativer HPLC an einer PFP-Phase getrennt (siehe **Kapitel 4.7.2**). Die vereinigten Fraktionen aus zehn Läufen werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, mit Wasser verdünnt und anschließend wiederholt gefriergetrocknet. Die erhaltenen Rückstände werden darauf folgend mittels der in **Kapitel 4.8.3** beschriebenen vergleichenden Geschmacksprofilanalyse sensorisch evaluiert.

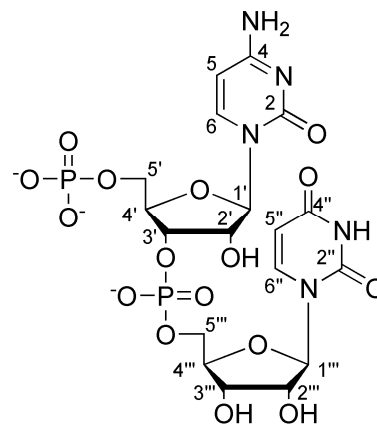
4.3.3 Isolierung der Dinukleotide aus RP-MPLC Fraktion VI

Ein Aliquot der RP-MPLC Fraktion VI (250 mg) wird wie in **Kapitel 4.7.2** beschrieben chromatographiert. Nach Rechromatographie unter den gleichen Bedingungen werden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die wässrigen Lösungen wiederholt gefriergetrocknet. Dabei wird aus Fraktion VI-6 die Verbindung Cytidylyl-(5'→3')-uridin-5'-monophosphat (**19**), und aus Fraktion VI-7 Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat (**20**) in Form weißer Pulver mit Reinheiten von etwa 90 % erhalten.

Cytidylyl-(5'→3')-uridin-5'-monophosphat, **19**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 268 nm; **LC/MS (ESI)**: m/z (%) 628 (100, [M-H]); **LC-TOF-MS**: m/z 628,0692 (gefunden), m/z 628,0699 (berechnet für [C₁₈H₂₄N₅O₁₆P₂]); **¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY)**: δ [ppm] = 4,01-4,08 [m, 2H, H-C(5'')], 4,14-4,21 [m, 3H, H-C(5'), H-C(4'')], 4,25 [m, 2H, H-C(2''), H-C(3'')], 4,37 [pt, 1H, J = 4,5 Hz, H-C(2')], 4,43 [m, 1H, H-C(4')], 4,57 [m, 1H, H-C(3'')], 5,84 [d, 1H, J = 8,1 Hz, H-C(5'')], 5,86 [m, 2H, H-C(1'), H-C(1'')], 6,21 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(5)], 7,82 [d, 1H, J = 8,1 Hz, H-C(6'')], 8,13 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(6)]; **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC)**: δ [ppm] = 66,5 [d, $^2J_{C,P}$ = 4,3 Hz, C(5')], 67,7 [d, $^2J_{C,P}$ = 5,8 Hz, C(5'')], 72,5 [C(3'')], 76,0 [d, $^2J_{C,P}$ = 5,5 Hz, C(3')], 76,6 [d, $^2J_{C,P}$ = 3,6 Hz, C(2')], 76,9 [C(2'')], 85,4 [dd, $^2J_{C,P}$ = 5,5 Hz, $^3J_{C,P}$ = 8,9 Hz, H-C(4')], 85,9 [d, $^3J_{C,P}$ = 9,0 Hz, H-C(4'')], 92,0 [C(1')], 92,6 [C(1'')], 98,3 [C(5)], 105,5 [C(5'')], 144,6 [C(6'')], 147,0 [C(6)], 151,4 [C(2)], 154,7 [C(2'')], 162,2 [C(4)], 169,1 [C(4'')].



Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat, **20**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 268 nm; **LC/MS (ESI)**: m/z (%) 628 (100, [M-H]); **LC-TOF-MS**: m/z 628,0691 (gefunden), m/z 628,0699 (berechnet für [C₁₈H₂₄N₅O₁₆P₂]); **¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY)**: δ [ppm] = 4,01-4,16 [m, 4H, H-C(5'), H-C(5'')], 4,20-4,28 [m, 3H, H-C(2''), H-C(3''), H-C(4'')], 4,37 [pt, 1H, J = 5,3 Hz, H-C(2')], 4,41 [m, 1H, H-C(4')], 4,56 [m, 1H, H-C(3'')], 5,83-5,86 [m, 2H, H-C(1''), H-C(5)], 5,89 [d, 1H, J = 5,4 Hz, H-C(1')], 6,24 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(5'')], 7,88 [d, 1H, J = 8,2 Hz, H-C(6)], 8,11 [d, 1H, J = 8,0 Hz, H-C(6'')]; **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC)**: δ [ppm] = 64,0 [pdd, $^2J_{C,P}$ = 5,3, 7,3 Hz C(5'/5'')], 68,8 [C(3'')], 72,9 [d, $^2J_{C,P}$ = 4,6 Hz, C(3')], 73,4 [d, $^2J_{C,P}$ = 5,4 Hz, C(2')], 74,2 [C(2'')], 82,5 [dd, $^2J_{C,P}$ = 4,1 Hz, $^3J_{C,P}$ = 9,0 Hz, H-C(4')], 82,9 [d, $^3J_{C,P}$ = 9,1 Hz, H-C(4'')], 88,2 [C(1')], 90,0 [C(1'')], 95,1 [C(5'')], 102,5 [C(5)], 141,3 [C(6)], 143,7 [C(6'')], 148,2 [C(2'')], 151,7 [C(2)], 159,0 [C(4'')], 166,0 [C(4)].

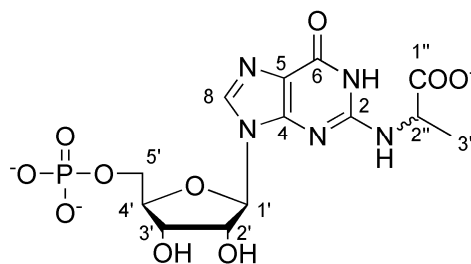


4.3.4 Isolierung von (S)-N²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat

Ein Aliquot der RP-MPLC Fraktion VIII (500 mg) wird in einem Gemisch aus wässrigem Triethylammoniumacetatpuffer (40 mM, pH 6,0) und Methanol (97/3, v/v) gelöst und anschließend mittels semipräparativer IP-HPLC vorgetrennt (siehe **Kapitel 4.7.2**). Die resultierenden Fraktionen werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und anschließend

lyophilisiert. Der Rückstand von Subfraktion VIII-8 wird in 1 %-iger Ameisensäure gelöst und mittels präparativer RP-HPLC (siehe **Kapitel 4.7.2**) aufgereinigt. Aus Fraktion VIII-8-5 wird nach Entfernen des Lösungsmittels und folgender wiederholter Lyophilisation (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**S**)-**21** als weißes Pulver erhalten.

(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-**21**: UV/Vis (100 mM PO₄³⁻ Puffer, pH 7,5): λ_{max} = 254, 276 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 434 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 434,0705 (gefunden), *m/z* 434,0719 (berechnet für [C₁₃H₁₇N₅O₁₀P]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,45 [d, 3H, *J* = 7,2 Hz, H-C(3'')], 3,97-4,10 [m, 2H, H-C(5')], 4,25 [q, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-C(2'')], 4,31 [m, 1H, H-C(4')], 4,44 [pt, 1H, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-C(3')], 4,72 [pt, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(2')], 6,02 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,17 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 20,2 [C(3'')], 55,4 [C(2'')], 66,7 [d, ²J_{C,P} = 4,6 Hz, C(5')], 73,1 [C(3')], 77,1 [C(2')], 86,7 [d, ³J_{C,P} = 8,7 Hz, C(4')], 89,9 [C(1')], 118,8 [C(5)], 140,4 [C(8)], 154,8 [C(4)], 155,0 [C(2)], 162,0 [C(6)], 184,2 [C(1'')].



4.4 Modellreaktionen

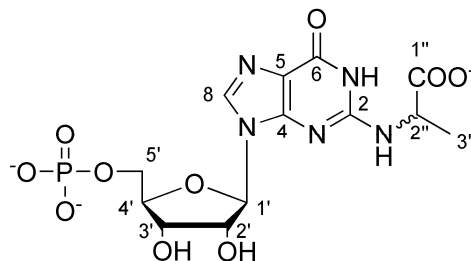
Alle Modellreaktionen werden in verschlossenen Glasgefäßen in gepufferten Lösungen durchgeführt. Im Falle analytischer Mikroansätze erfolgt die Umsetzung in 1,5 mL Glasvials in einem temperierbaren Aluminiumblock. Präparative Ansätze werden in einem FD 115 Trockenschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei den angegebenen Temperaturen gelagert, bevor sie wie beschrieben aufgearbeitet werden. Die Strukturabsicherung erfolgte mit Hilfe von Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie (NMR, MS) sowie in ausgewählten Fällen mittels Circular dichroismusspektroskopie (CD).

4.4.1 Reaktion von 5'-GMP mit DL-Glycerinaldehyd

Eine Suspension von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 2 mmol) und DL-Glycerinaldehyd (6 mmol) in Phosphatpuffer (5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) wird für mehrere Tage bei 40 °C inkubiert, wobei der Reaktionsverlauf mittels analytischer RP-HPLC geprüft wird. Nach 10 Tagen ist das Nukleotid unter Bildung zweier unbekannter Transformationsprodukte quantitativ abgebaut. Die Lösung wird mit Wasser (10 mL) verdünnt und, nach Membranfiltration, mittels präparativer RP-HPLC aufgetrennt. Die beiden Hauptprodukte werden separat aufgefangen und nach Entfernen des organischen Lösungsmittels am Rotationsverdampfer von Wasser- und Ameisensäureresten mittels wiederholter

Lyophilisation befreit. Die Verbindungen (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**21**) werden in Form amorpher, weißer Pulver mit Reinheiten über 95 % erhalten.

(*R*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-**21**: UV/Vis (100 mM PO₄³⁻ Puffer, pH 7,5): λ_{max} = 254, 276 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 434 (100, [M-H]⁻); LC-TOF-MS: *m/z* 434,0722 (gefunden), *m/z* 434,0719 (berechnet für [C₁₃H₁₇N₅O₁₀P]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,45 [d, 3H, *J* = 7,2 Hz, H-C(3'')], 3,95-4,07 [m, 2H, H-C(5')], 4,26 [q, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-C(2'')], 4,30 [m, 1H, H-C(4')], 4,47 [pt, 1H, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-C(3')], 4,83 [pt, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-C(2')], 5,97 [d, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-C(1')], 8,14 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 20,3 [C(3'')], 55,5 [C(2'')], 66,7 [d, ²J_{C,P} = 4,5 Hz, C(5')], 73,3 [C(3')], 76,4 [C(2')], 87,0 [d, ³J_{C,P} = 8,2 Hz, C(4')], 90,5 [C(1')], 119,0 [C(5)], 141,2 [C(8)], 154,6 [C(4)], 154,9 [C(2)], 162,1 [C(6)], 184,1 [C(1'')].



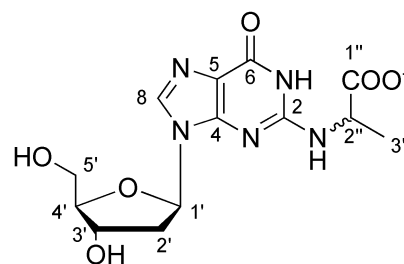
(*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*S*)-**21**: Die spektroskopischen Daten waren identisch mit denen der aus dem Hefeextrakt isolierten Verbindung (siehe Kapitel 4.4.1).

4.4.2 Reaktion von 2'-Desoxyguanosin mit 1,3-Dihydroxyaceton

Die Glykierung von 2'-Desoxyguanosin (**23**) mit 1,3-Dihydroxyaceton erfolgt in Anlehnung an die Reaktion mit Glycerinaldehyd, wie von *Ochs und Severin (1994)* ^[115] beschrieben.

Eine Mischung aus **23** (2 mmol) und 1,3-Dihydroxyaceton Dimer (3 mmol) wird mit Phosphatpuffer (5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) versetzt und für 24 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit Wasser (10 mL) verdünnt, membranfiltriert und mittels präparativer RP-HPLC, unter Verwendung von Ammoniumformiatpuffer und Methanol als Lösungsmitteln aufgereinigt (siehe Kapitel 4.7.2). Die beiden Hauptreaktionsprodukte werden aufgefangen und, nach Entfernen des Methanols im Vakuum, wiederholt gefriergetrocknet um Ammonium *N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin (**22**) als gelbliche Pulver hoher Reinheiten (>95 %) zu erhalten.

Ammonium (*R*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin, (**R**)-**22**: UV/Vis (100 mM PO₄³⁻ Puffer, pH 7,5): λ_{max} = 251, 278 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 338 (100) [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] = 1,50 [d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-C(3'')], 2,48 [ddd, 1H, *J* = 3,9, 6,8, 14,1 Hz, H-C(2'_a)], 3,13 [pdt, 1H, *J* = 6,8, 13,8 Hz, H-C(2'_b)], 3,82-3,93 [m, 2H, H-C(5')], 4,13 [m, 1H, H-C(4')], 4,27 [q, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-C(2'')], 4,69 [m, 1H, H-C(3')], 6,35 [t, 1H, *J* = 6,9 Hz, H-C(1')], 7,95 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 20,5 [C(3'')], 40,4 [C(2')], 55,6 [C(2'')], 64,7 [C(5')], 74,1 [C(3')], 87,7 [C(1')], 89,8 [C(4')], 119,7 [C(5)], 142,1 [C(8)], 154,4 [C(4)], 154,8 [C(2)], 162,0 [C(6)], 184,0 [C(1'')].

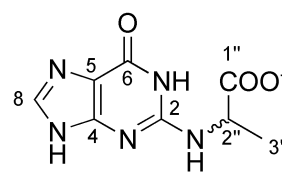


Ammonium (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin, (**S**)-**22**: UV/Vis (100 mM PO₄³⁻ Puffer, pH 7,5): λ_{max} = 251, 278 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 338 (100) [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] = 1,46 [d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H-C(3'')], 2,51 [ddd, 1H, *J* = 4,6, 6,8, 14,0 Hz, H-C(2'_a)], 2,94 [pdt, 1H, *J* = 7,0, 13,8 Hz, H-C(2'_b)], 3,71 [dd, 1H, *J* = 6,1, 12,3 Hz, H-C(5'_a)], 3,80 [dd, 1H, *J* = 4,0, 12,2 Hz, H-C(5'_b)], 4,07 [m, 1H, H-C(4')], 4,23 [q, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-C(2'')], 4,63 [m, 1H, H-C(3')], 6,30 [t, 1H, *J* = 6,6 Hz, H-C(1')], 7,92 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 20,4 [C(3'')], 40,9 [C(2')], 55,3 [C(2'')], 64,6 [C(5')], 73,9 [C(3')], 87,0 [C(1')], 89,6 [C(4')], 119,2 [C(5)], 141,1 [C(8)], 154,2 [C(4)], 154,7 [C(2)], 161,8 [C(6)], 184,0 [C(1'')].

4.4.3 Säurehydrolytische Spaltung der *N*²-carboxyethylierten Derivate

Ein Aliquot (10 mg) der Verbindungen (**R**)-**21**, (**S**)-**21**, (**R**)-**22** und (**S**)-**22** wird mit einer Salzsäurelösung (1 mL, 1 mol/L) versetzt und verschlossen für 2,5 Stunden bei 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die resultierenden Hydrolysate mit Wasser verdünnt (2 mL) und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung (1 mol/L) auf pH 3 eingestellt. Nach Isolierung mittels präparativer HPLC (siehe Kapitel 4.7.2) an einer Umkehrphase, Entfernung des Lösungsmittels und wiederholter Gefriertrocknung werden die Verbindungen (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanin (**25**) in Form amorpher, weißer Pulver mit Reinheiten von über 95 % erhalten.

(R)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanin, **(R)**-25: UV/VIS (100 mM PO₄³⁻ Puffer, pH 7,5): λ_{max} = 247, 279 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 222 (100) [M-H]⁻; ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] = 1,44 [d, 3H, *J* = 7,2 Hz, H-C(3'')], 4,24 [q, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-C(2'')], 7,98 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 20,4 [C(3'')], 55,0 [C(2'')], 116,0 [C(5)], 141,6 [C(8)], 155,1 [C(4)], 155,8 [C(2)], 160,9 [C(6)], 183,4 [C(1'')].

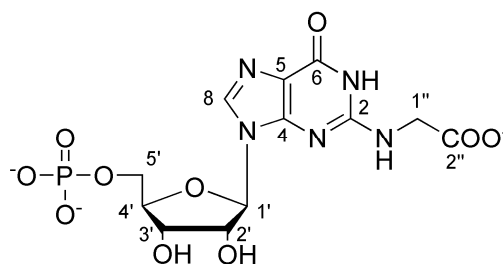


(S)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanin, **(S)**-25: Die spektroskopischen Daten von **(S)**-25 waren identisch mit denen von **(R)**-25.

4.4.4 Reaktion von 5'-GMP mit Glyoxal

Zu einer Lösung von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) in Phosphatpuffer (10 mL, 1 mol/L, pH 6,0, pH 7,0 oder pH 8,0) werden 0,15 mL einer ~40 %-igen wässrigen Glyoxallösung (~2 mmol) gegeben und die Mischung für 24 Stunden bei 70 °C gelagert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch des pH 8,0-Ansatzes mit Wasser verdünnt (10 mL), durch einen Membranfilter filtriert und mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Das Hauptprodukt wird gesammelt, vom Lösungsmittel befreit und anschließend wiederholt lyophilisiert um *N*²-Carboxymethyl-guanosin-5'-monophosphat (**26**) als weißen, amorphen Rückstand zu erhalten (Reinheit: > 95 %).

*N*²-Carboxymethyl-guanosin-5'-monophosphat, **26**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 420 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 420,0562 (gefunden), *m/z* 420,0562 (berechnet für [C₁₂H₁₅N₅O₁₀P]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 3,96 [s, 2H, H-C(2'')], 3,97-4,06 [m, 2H, H-C(5')], 4,31 [m, 1H, H-C(4')], 4,48 [t, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-C(3')], 4,77 [1H, überlagert durch Lösungsmittel, H-C(2')], 6,01 [d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-C(1')], 8,17 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 47,8 [C(2'')], 66,6 [d, ²*J*_{C,P} = 4,5 Hz, C(5')], 73,3 [C(3')], 76,8 [C(2')], 87,0 [d, ³*J*_{C,P} = 8,5 Hz, C(4')], 90,4 [C(1')], 118,9 [C(5)], 140,8 [C(8)], 154,8 [C(4)], 155,6 [C(2)], 162,1 [C(6)], 180,5 [C(1'')].

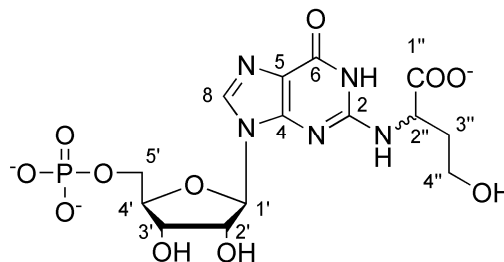


4.4.5 Reaktion von 5'-GMP mit Erythrose

Eine Mischung aus Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) und D-Erythrose (3 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) wird auf 70 °C erhitzt, wobei der Reaktionsverlauf mittels RP-HPLC verfolgt wird. Nach mehreren Stunden haben sich zwei Haupttransmutationsprodukte gebildet, die nach Verdünnen der Lösung mit Wasser (10 mL)

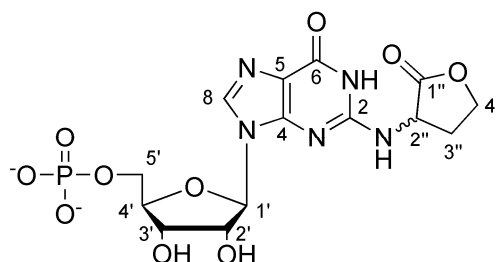
mittels RP-HPLC präparativ isoliert werden. Die beiden Hauptverbindungen werden nach Entfernen des Lösungsmittels mehrmals gefriergetrocknet um weiße Pulver mit Reinheiten über 95 % zu erhalten. Dabei befinden sich die offenkettigen Verbindungen **27a** unter sauren Bedingungen im Gleichgewicht mit den korrespondierenden Laktone **27b**.

(R)-*N*²-(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-**27a**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 464 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 464,0828 (gefunden), *m/z* 464,0824 (berechnet für [C₁₄H₁₉N₅O₁₁P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,90 [m, 1H, H-C(3''_a)], 2,08 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,66 [m, 2H, H-C(4'')], 4,09-3,87 [m, 1H, H-C(5'')], 4,23 [m, 1H, H-C(4')], 4,29 [dd, 1H, *J* = 4,5, 8,9 Hz, H-C(2'')], 4,37 [t, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-C(3')], 4,61 [t, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(2')], 5,89 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,07 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 32,8 [C(3'')], 52,1 [C(2'')], 58,0 [C(4'')], 63,5 [d, ²*J*_{C,P} = 4,7 Hz, C(5')], 69,0 [C(3')], 74,0 [C(2')], 83,4 [d, ³*J*_{C,P} = 8,3 Hz, C(4')], 89,7 [C(1')], 109,6 [C(5)], 136,1 [C(8)], 149,2 [C(4)], 153,5 [C(2)], 163,6 [C(6)], 176,1 [C(1'')].



(S)-*N*²-(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-**27a**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 464 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 464,0840 (gefunden), *m/z* 464,0824 (berechnet für [C₁₄H₁₉N₅O₁₁P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,86 [m, 1H, H-C(3''_a)], 2,06 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,65 [m, 2H, H-C(4'')], 4,02-3,78 [m, 2H, H-C(5'')], 4,22 [m, 1H, H-C(4')], 4,27 [dd, 1H, *J* = 4,6, 9,0 Hz, H-C(2'')], 4,37 [t, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-C(3')], 4,61 [t, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(2')], 5,89 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,07 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 32,8 [C(3'')], 52,1 [C(2'')], 58,2 [C(4'')], 63,5 [d, ²*J*_{C,P} = 4,6 Hz, C(5')], 69,0 [C(3')], 74,0 [C(2')], 83,5 [d, ³*J*_{C,P} = 8,2 Hz, C(4')], 89,8 [C(1')], 109,7 [C(5)], 136,1 [C(8)], 149,4 [C(4)], 153,5 [C(2)], 163,6 [C(6)], 176,6 [C(1'')].

(R)-*N*²-(Tetrahydro-2-oxofuran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-**27b**: UV/Vis (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 446 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 446,0727 (gefunden), *m/z* 446,0719 (berechnet für [C₁₄H₁₇N₅O₁₀P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] = 2,55-2,74 [m, 2H, H-C(3'')], 4,08-4,16 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,20-4,28 [m, 1H, H-



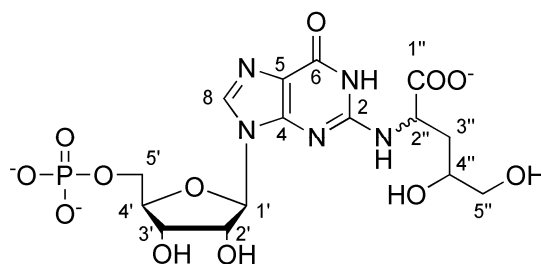
C(5'_b), 4,35 [m, 1H, H-C(4')], 4,43 [pt, 1H, $J = 5,5$ Hz, H-C(3')], 4,49 [dd, 1H, $J = 7,5, 9,7$ Hz, H-C(4''_a)], 4,68 [m, 1H, H-C(2')], 4,63 [dd, 1H, $J = 2,9, 4,6$ Hz, H-C(4''_b)], 4,88 [t, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-C(2'')], 6,05 [d, 1H, $J = 2,8$ Hz, H-C(1')], 8,92 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC)**: δ [ppm] = 26,1 [C(3'')], 50,7 [C(2'')], 63,3 [d, C(5')], 74,0 [C(4'')], 74,1 [C(2')], 83,2 [d, C(4')], 89,5 [C(1')], 109,6 [C(5)], 135,5 [C(8)], 148,5 [C(4)], 153,4 [C(2)], 160,4 [C(6)], 179,0 [C(1'')].

(*S*)-*N*²-(Tetrahydro-2-oxofuran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-**27b**: **UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN)**: $\lambda_{\max} = 256, 280$ nm (sh); **LC/MS (ESI⁻)**: m/z (%) 446 (100) [M-H]⁻; **¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY)**: δ [ppm] = 2,56-2,74 [m, 2H, H-C(3'')], 4,04-4,15 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,17-4,25 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,34 [m, 1H, H-C(4')], 4,45 [pt, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-C(3')], 4,49 [dd, 1H, $J = 7,1, 10,2$ Hz, H-C(4''_a)], 4,68 [pt, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-C(2'')], 4,71 [dd, 1H, $J = 7,6, 9,3$ Hz, H-C(4''_b)], 4,90 [t, 1H, $J = 10,2$ Hz, H-C(2'')], 5,99 [d, 1H, $J = 4,1$ Hz, H-C(1')], 8,47 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC)**: δ [ppm] = 29,8 [C(3'')], 53,8 [C(2'')], 66,9 [d, C(5')], 70,6 [C(4'')], 72,6 [C(3')], 77,6 [C(2')], 86,3 [d, $^3J_{C,P} = 8,6$ Hz, C(4')], 91,3 [C(1')], 116,9 [C(5)], 139,9 [C(8)], 153,0 [C(4)], 154,8 [C(2)], 160,4 [C(6)], 182,1 [C(1'')].

4.4.6 Reaktion von 5'-GMP mit Ribose, Glukose und Maltose

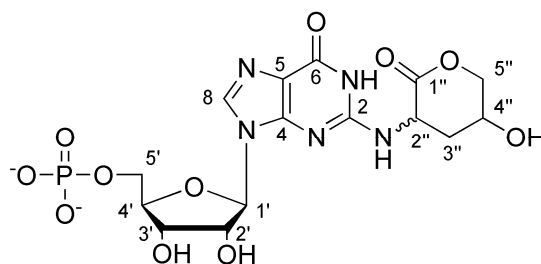
Gemische aus Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol), L-Alanin (89 mg, 1 mmol) und D-Ribose, D-Glukose oder D-Maltose Monohydrat (5 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 mL, im Falle der Maltose 5 mL, 1 mol/L, pH 7,0) werden für mehrere Tage auf 70 °C erhitzt. Regelmäßige Überprüfung der Reaktionsgemische mittels RP-HPLC zeigt, dass nach etwa 5 Tagen (im Falle der Ribose) bis etwa 14 Tagen (im Falle der Maltose) das Nukleotid nahezu vollständig abgebaut ist und die Isolierung der Umwandlungsprodukte mittels präparativer RP-HPLC durchgeführt werden kann. Dazu werden die Reaktionsgemische mit Wasser verdünnt (10 mL), membranfiltriert und anschließend aufgereinigt. Die Isolierung von (*R/S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**R**)-/-(**S**)-**28a**) erfolgt aus dem Riboseansatz, (*R/S*)-*N*²-(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**R**)-/-(**S**)-**29a**) wird als nicht trennbares Diastereomergemisch aus dem Glukoseansatz erhalten und (*R/S*)-*N*²-(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**R**)-/-(**S**)-**31a**) wird aus dem Maltose enthaltenden Reaktionsgemisch isoliert (Reinheiten etwa 95 %). Dabei befinden sich die offenkettigen Verbindungen **28a** unter sauren Bedingungen im Gleichgewicht mit den korrespondierenden Laktone **28b**.

(R)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)**-**28a**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 494 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 494,0938 (gefunden), *m/z* 494,0930 (berechnet für [C₁₅H₂₁N₅O₁₂P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,80 [m, 1H, H-C(3''_a)], 2,02 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,48 [dd, 1H, *J* = 6,5, 11,8 Hz, H-C(5''_a)], 3,59 [dd, 1H, *J* = 3,8, 11,8 Hz, H-C(5''_b)], 3,85 [m, 1H, H-C(4'')], 3,89-4,06 [m, 2H, H-C(5')], 4,17-4,34 [m, 2H, H-C(2''), H-C(4')], 4,40 [t, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-C(3')], 4,77 [t, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-C(2')], 5,90 [d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-C(1')], 8,04 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 35,1 [C(3'')], 55,0 [C(2'')], 64,0 [d, ²*J*_{C,P} = 4,6 Hz, C(5')], 65,1 [C(5'')], 69,8 [C(4'')], 70,3 [C(3')], 73,4 [C(2')], 83,9 [d, ³*J*_{C,P} = 8,5 Hz, C(4')], 87,7 [C(1')], 116,3 [C(5)], 138,3 [C(8)], 151,4 [C(4)], 152,0 [C(2)], 159,1 [C(6)], 179,7 [C(1'')].



(S)-*N*²-(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)**-**28a**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 494 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 494,0927 (gefunden), *m/z* 494,0930 (berechnet für [C₁₅H₂₁N₅O₁₂P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,74-1,90 [m, 2H, H-C(3'')], 3,46 [dd, 1H, *J* = 6,7, 11,7 Hz, H-C(5''_a)], 3,55 [dd, 1H, *J* = 4,0, 11,7 Hz, H-C(5''_b)], 3,79 [m, 1H, H-C(4'')], 3,83-3,97 [m, 2H, H-C(5')], 4,23 [m, 1H, H-C(4')], 4,38 [t, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-C(3')], 4,41 [dd, 1H, *J* = 4,1, 9,5 Hz, H-C(2'')], 4,63 [t, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(2')], 5,93 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,14 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 35,0 [C(3'')], 54,0 [C(2'')], 63,5 [d, ²*J*_{C,P} = 4,3 Hz, C(5')], 65,5 [C(5'')], 68,9 [C(4'')], 70,4 [C(3')], 74,3 [C(2')], 84,1 [d, ³*J*_{C,P} = 8,5 Hz, C(4')], 86,8 [C(1')], 115,9 [C(5)], 137,5 [C(8)], 151,8 [C(4)], 152,5 [C(2)], 159,2 [C(6)], 179,9 [C(1'')].

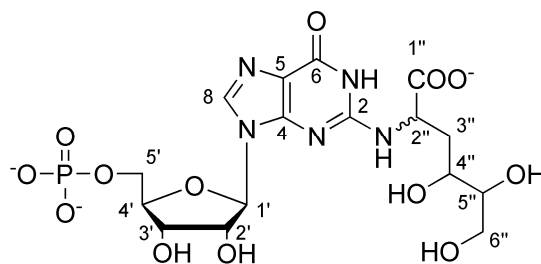
(R)-*N*²-(Tetrahydro-5-hydroxy-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)**-**28b**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁻): *m/z* (%) 476 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 476,0842 (gefunden), *m/z* 476,0824 (berechnet für [C₁₅H₁₉N₅O₁₁P]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] = 2,53 [m, 1H, H-C(3''_a)], 2,69 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,75 [dd, 1H, *J* = 4,3, 12,8 Hz, H-C(5''_a)], 3,92 [dd, 1H, *J* = 2,5, 12,8 Hz, H-C(5''_b)], 4,06-4,12 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,12-4,19 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,32 [m, 1H, H-C(4')], 4,44 [pt, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-C(3')], 4,72 [pt, 1H, *J* = 5,1 Hz, H-C(2')], 4,81 [dt, 1H, *J* = 7,0, 14,0 Hz, H-



C(2''), 5,03 [m, 1H, H-C(4'')], 5,94 [d, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-C(1')], 8,16 [s, 1H, H-C(8)]; **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O , HMQC, HMBC):** δ [ppm] = 31,2 [C(3'')], 54,0 [C(2'')], 66,2 [C(5'')], 67,3 [d, $^2J_{\text{C,P}} = 4,9$ Hz, C(5')], 73,0 [C(3')], 76,6 [C(2')], 83,4 [H-C(4'')], 86,3 [d, $^3J_{\text{C,P}} = 8,6$ Hz, C(4')], 90,5 [C(1')], 119,2 [C(5)], 140,5 [C(8)], 153,8 [C(4)], 154,0 [C(2)], 161,9 [C(6)], 182,3 [C(1'')].

(*S*)- N^2 -(Tetrahydro-5-hydroxy-2-oxo-2H-pyran-3-yl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-**28b**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\text{max}} = 256, 280$ nm (sh); **LC/MS (ESI)**: m/z (%) 476 (100) [M-H]⁻; **LC-TOF-MS**: m/z 476,0823 (found), m/z 476,0824 (berechnet für [C₁₅H₁₉N₅O₁₁P]⁻); **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O , COSY):** δ [ppm] = 2,36 [m, 1H, H-C(3''_a)], 2,71 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,84 [dd, 1H, $J = 6,2, 13,0$ Hz, H-C(5''_a)], 3,95 [dd, 1H, $J = 2,7, 13,0$ Hz, H-C(5''_b)], 4,05-4,19 [m, 2H, H-C(5'_{a,b})], 4,35 [m, 1H, H-C(4')], 4,48 [dd, 1H, $J = 4,3, 4,8$ Hz, 1H, H-C(3')], 4,68 [pt, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-C(2'')], 4,78 [1H, überlagert durch Lösungsmittel, H-C(4'')], 5,07 [dd, 1H, $J = 9,1, 11,6$ Hz, H-C(2'')], 6,02 [d, 1H, $J = 5,5$ Hz, H-C(1')], 8,29 [s, 1H, H-C(8)]; **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O , HMQC, HMBC):** δ [ppm] = 31,7 [C(3'')], 54,7 [C(2'')], 65,6 [C(5'')], 67,3 [d, $^2J_{\text{C,P}} = 5,0$ Hz, C(5')], 73,3 [C(3')], 77,4 [C(2')], 82,7 [C(4'')], 86,7 [d, $^3J_{\text{C,P}} = 8,9$ Hz, C(4')], 90,0 [C(1')], 118,2 [C(5)], 140,1 [C(8)], 153,8 [C(4)], 154,7 [C(2)], 161,4 [C(6)], 181,1 [C(1'')].

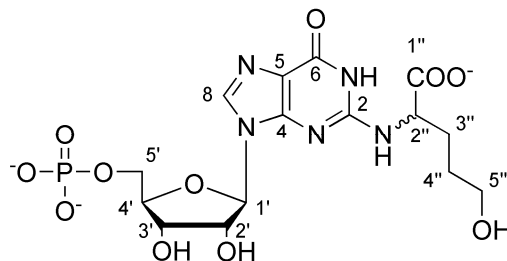
N^2 -(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-guanosin-5'-monophosphat, **29a**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\text{max}} = 256, 280$ nm (sh); **LC/MS (ESI)**: m/z (%) 524 (100) [M-H]⁻; **LC-TOF-MS**: m/z 524,1021 und 524,1028 (gefunden), m/z 524,1035 (berechnet für [C₁₆H₂₃N₅O₁₃P]⁻); **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, COSY):** δ [ppm] = 1,80-1,93 [m, 1H, H-C(3''_a)], 2,18 [ddd, 1H, $J = 3,6, 6,3, 14,4$ Hz, H-C(3''_b)], 3,56-3,63 [m, 1H, H-C(6'_a)], 3,63-3,71 [m, 1H, H-C(5'')], 3,72-3,81 [m, 1H, H-C(6'_b)], 3,82-3,89 [m, 1H, H-C(4'')], 3,89-4,03 [m, 2H, H-C(5')], 4,23 [m, 1H, H-C(4')], 4,29 [m, 1H, H-C(3')], 4,38 [t, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-C(2'')], 4,69 [pt, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-C(2'')], 5,86 [d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H-C(1')], 8,03 [s, 1H, H-C(8)]; **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, HMQC, HMBC):** δ [ppm] = 38,7 [C(3'')], 58,2 [C(2'')], 65,3 [C(6'')], 67,1 [d, $^2J_{\text{C,P}} = 5,0$ Hz, C(5')], 73,1 [C(4'')], 74,3 [C(3')], 77,4 [C(5'')], 77,7 [C(2')], 87,2 [d, $^3J_{\text{C,P}} = 8,7$ Hz, C(4')], 90,3 [C(1')], 120,2 [C(5)], 138,8 [C(8)], 155,0 [C(4)], 163,2 [C(2)], 171,0 [C(6)], 184,2 [C(1'')].



N^2 -(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-guanosin-5'-monophosphat, **29a**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\text{max}} = 256, 280$ nm (sh); **LC/MS (ESI)**: m/z (%) 524 (100) [M-H]⁻; **LC-TOF-MS**: m/z 524,1021 und 524,1028 (gefunden), m/z 524,1035 (berechnet für

[C₁₆H₂₃N₅O₁₃P]); **¹H-NMR (500 MHz, D₂O/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,81-1,93 [m, 1H, H-C(3''_a)], 1,93-2,03 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,56-3,63 [m, 1H, H-C(6'_a)], 3,63-3,71 [m, 1H, H-C(5'')], 3,72-3,81 [m, 2H, H-C(4''), H-C(6'_b)], 3,89-4,03 [m, 2H, H-C(5')], 4,23 [m, 1H, H-C(4')], 4,29 [m, 1H, H-C(3')], 4,50 [dd, 1H, *J* = 3,5, 10,9 Hz, H-C(2'')], 4,66 [t, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-C(2')], 5,82 [d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-C(1')], 8,07 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (125 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC):** δ [ppm] = 39,5 [C(3'')], 56,7 [C(2'')], 65,6 [C(6'')], 67,1 [d, ²*J*_{C,P} = 4,5 Hz, C(5')], 71,5 [C(4'')], 74,4 [C(3')], 77,5 [C(5'')], 77,9 [C(2')], 87,3 [d, ³*J*_{C,P} = 8,7 Hz, C(4')], 89,9 [C(1')], 120,0 [C(5)], 138,5 [C(8)], 155,0 [C(4)], 163,7 [C(2)], 171,0 [C(6)], 184,2 [C(1'')].

(*R*)-*N*²-(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-**31**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); **LC/MS (ESI):** *m/z* (%) 478 (100) [M-H]⁻; **LC-TOF-MS:** *m/z* 478,0974 (gefunden), *m/z* 478,0981 (berechnet für [C₁₅H₂₁N₅O₁₁P]); **¹H-NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,68 [m, 2H, H-C(4'')], 1,83 [m, 1H, H-C(3''_a)], 1,97 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,65 [t, 2H, *J* = 6,5 Hz, H-C(5'')], 3,93-4,12 [m, 2H, H-C(5')], 4,28-4,34 [m, 2H, H-C(2''), H-C(4')], 4,48 [t, 1H, *J* = 4,8 Hz, 1H, H-C(3')], 4,84 [t, 1H, *J* = 5,3 Hz, H-C(2')], 5,98 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,11 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC):** δ [ppm] = 30,7 [C(4'')], 31,0 [C(3'')], 59,4 [C(2'')], 64,2 [C(5'')], 67,0 [d, ²*J*_{C,P} = 4,4 Hz, C(5')], 73,2 [C(3')], 76,3 [C(2')], 86,7 [d, ³*J*_{C,P} = 8,3 Hz, C(4')], 90,5 [C(1')], 119,1 [C(5)], 141,1 [C(8)], 154,6 [C(4)], 155,0 [C(2)], 162,0 [C(6)], 182,8 [C(1'')].



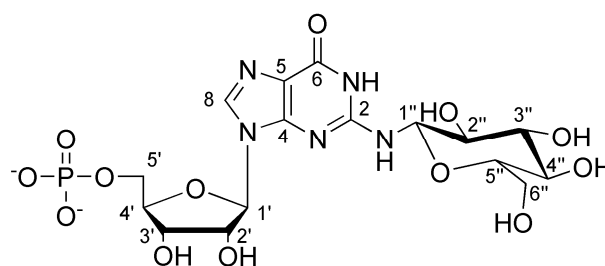
(*S*)-*N*²-(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-**31**: **UV/VIS** (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); **LC/MS (ESI):** *m/z* (%) 478 (100) [M-H]⁻; **LC-TOF-MS:** *m/z* 478,0981 (gefunden), *m/z* 478,0981 (berechnet für [C₁₅H₂₁N₅O₁₁P]); **¹H-NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,67 [m, 2H, H-C(4'')], 1,82 [m, 1H, H-C(3''_a)], 1,96 [m, 1H, H-C(3''_b)], 3,65 [t, 2H, *J* = 6,5 Hz, H-C(5'')], 3,97-4,10 [m, 2H, H-C(5')], 4,32 [m, 2H, H-C(2''), H-C(4')], 4,47 [pt, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-C(3')], 4,72 [pt, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(2')], 6,03 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,18 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC):** δ [ppm] = 27,9 [C(4'')], 28,0 [C(3'')], 56,5 [C(2'')], 61,3 [C(5'')], 63,9 [d, ²*J*_{C,P} = 4,6 Hz, C(5')], 70,2 [C(3')], 74,1 [C(2')], 83,7 [d, ³*J*_{C,P} = 8,6 Hz, C(4')], 87,1 [C(1')], 115,9 [C(5)], 137,5 [C(8)], 151,8 [C(4)], 152,2 [C(2)], 159,2 [C(6)], 180,1 [C(1'')].

4.4.7 Reaktion von 5'-GMP mit Glukose in Abwesenheit von L-Alanin

Eine Suspension von Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) und D-Glukose (10 mmol) in Phosphatpuffer (1,25 mL, 1 mol/L, pH 7,0) wird für 4 h bei 100 °C gelagert. Nachdem das

Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wird dieses mit Wasser verdünnt (10 mL) und anschließend mittels RP-MPLC vom Großteil des unreaktierten Zuckers befreit. Die hochpolare, bei 260 nm absorbierende Zielfraktion wird lyophilisiert und anschließend mittels RP-HPLC rechromatographiert. Nach erneuter Lyophilisation erhält man die Zielverbindung (**30**) als amorphes, weißes Pulver hoher Reinheit (> 95%).

*N*²-(β-D-Glukosyl)-guanosin-5'-monophosphat, **30**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI⁺): *m/z* (%) 524 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 524,1036 (gefunden), *m/z* 524,1035 (berechnet für [C₁₆H₂₃N₅O₁₃P]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 3,47 [t, 1H, *J* = 9,5 Hz, H-C(4'')], 3,50 [t, 1H, *J* = 9,2 Hz, H-C(2'')], 3,62-3,70 [m, 2H, H-C(3''), H-C(5'')], 3,72 [dd, 1H, *J* = 5,4, 12,5 Hz, H-C(6''_a)], 3,89 [dd, 1H, *J* = 2,2, 12,4 Hz, H-C(6''_b)], 3,96-4,07 [m, 2H, H-C(5')], 4,31 [m, 1H, H-C(4')], 4,48 [t, 1H, *J* = 4,5 Hz, H-C(3')], 4,84 [t, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-C(2')], 5,31 [d, 1H, *J* = 9,1 Hz, H-C(1'')], 6,03 [d, 1H, *J* = 5,8 Hz, H-C(1')], 8,22 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 63,5 [C(6'')], 66,7 [d, ²*J*_{C,P} = 4,5 Hz, C(5')], 72,3 [C(4'')], 73,6 [C(3'')], 74,9 [C(2'')], 76,6 [C(2')], 79,4 [C(3'')], 80,2 [C(5'')], 84,3 [C(1'')], 87,2 [d, ³*J*_{C,P} = 8,1 Hz, C(4')], 89,9 [C(1')], 120,1 [C(5)], 141,2 [C(8)], 154,1 [C(4)], 155,0 [C(2)], 162,0 [C(6)].



4.4.8 Reaktion von 5'-GMP mit Aminokomponenten in Gegenwart von Triosen

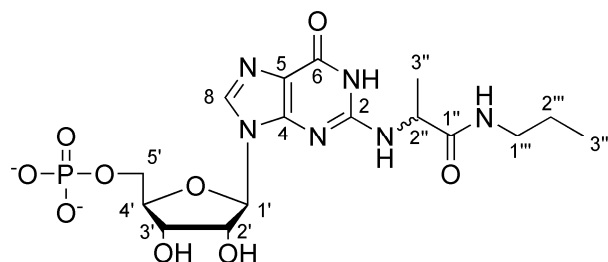
Die Umsetzung von Guanosin-5'-monophosphat (**2**), 1,3-Dihydroxyaceton und einem Überschuss einer Aminokomponente erfolgt nach einer modifizierten Literaturvorschrift [122].

Ein Gemisch aus **2** (1 mmol) und 1,3-Dihydroxyaceton Dimer (2 mmol) in Phosphatpuffer (1 mL, 1 mol/L, pH 7,4) wird in einem geschlossenen Schraubgefäß für 30 min auf 100 °C erhitzt. Anschließend wird eine Lösung von *n*-Propylamin-Hydrochlorid (8 mmol) oder Mononatrium-L-Glutamat Monohydrat (**1**, 8 mmol) in Phosphatpuffer (2,5 ml, 1 mol/L, pH 7,4) hinzugegeben und für weitere 4 Stunden bei 100 °C gelagert. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt (10 mL), membranfiltriert und anschließend mittels RP-MPLC aufgereinigt. Die Fraktionen, die eine starke Absorption bei 260 nm aufweisen, werden gesammelt und mittels analytischer RP-HPLC auf die Anwesenheit der Zielverbindungen untersucht. Abschließende präparative RP-HPLC ermöglicht neben der Isolierung der Hauptverbindungen (**R**)-**21** und (**S**)-**21**, auch die Aufreinigung der Amide (*R*)- und (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**R**)-/(**S**)-**32**) aus dem *n*-Propylamin Ansatz bzw. (*R*)- und (*S*)-*N*²-((1-(*N*-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-

guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**33**) aus dem Reaktionsgemisch mit MSG (**1**). Die Reinheit der Isolate wird mittels HPLC-UV/Vis, LC-MS und NMR als größer 95 % bestimmt.

(*R*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*R*)-**32**:
UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); **LC/MS (ESI⁺)**: *m/z* (%) 475 (100) [M-H]⁺; **LC-TOF-MS**: *m/z* 475,1381 (gefunden), *m/z* 475,1348 (berechnet für [C₁₆H₂₄N₆O₉P]⁺);
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY):

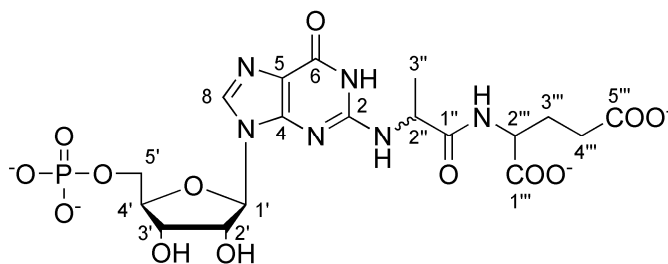
δ [ppm] = 0,82 [t, 3H, *J* = 7,4 Hz, H-C(3'''), 1,39 [d, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,48 [sext., 2H, *J* = 7,4 Hz, H-C(2''')], 3,13 [m, 2H, H-C(1'')], 3,97-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,15 [m, 1H, H-



C(4')], 4,38-4,45 [m, 2H, H-C(3'), H-C(2'')], 4,58 [pt, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-C(2')], 5,87 [d, 1H, *J* = 4,3 Hz, H-C(1')], 8,08 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT)**: δ [ppm] = 11,6 [C(3''')], 18,9 [C(3'')], 23,6 [C(2''')], 42,1 [C(1'')], 52,9 [C(2'')], 65,0 [d, ²*J*_{C,P} = 4,2 Hz, C(5')], 72,1 [C(3')], 76,5 [C(2')], 85,5 [d, ³*J*_{C,P} = 8,3 Hz, C(4')], 89,9 [C(1')], 119,6 [C(5)], 137,2 [C(8)], 152,9 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,7 [C(6)], 178,0 [C(1'')].

(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (*S*)-**32**:
UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); **LC/MS (ESI⁺)**: *m/z* (%) 475 (100) [M-H]⁺; **LC-TOF-MS**: *m/z* 475,1372 (gefunden), *m/z* 475,1348 (berechnet für [C₁₆H₂₄N₆O₉P]⁺);
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY): δ [ppm] = 0,83 [t, 3H, *J* = 7,4 Hz, H-C(3'''), 1,39 [d, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,48 [sext., *J* = 7,4 Hz, 2H, H-C(2''')], 3,14 [m, 2H, H-C(1'')], 3,96-4,04 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,38 [pt, 2H, H-C(3')], 4,50 [q, 1H, *J* = 7,1 Hz, H-C(2'')], 4,54 [pt, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-C(2')], 5,88 [d, 1H, *J* = 4,3 Hz, H-C(1')], 8,09 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT)**: δ [ppm] = 11,6 [C(3''')], 19,0 [C(3'')], 23,6 [C(2''')], 42,0 [C(1'')], 52,7 [C(2'')], 65,1 [d, ²*J*_{C,P} = 4,3 Hz, C(5')], 72,2 [C(3')], 76,9 [C(2')], 85,7 [d, ³*J*_{C,P} = 8,0 Hz, C(4')], 89,8 [C(1')], 119,5 [C(5)], 136,9 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,8 [C(1'')].

(R)-N²-((1-(N-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)-33**: UV/Vis (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 563 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 563,1159 (gefunden), *m/z* 563,1144 (berechnet für [C₁₈H₂₄N₆O₁₃P]⁻); ¹H-NMR (500 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,30 [d, 3H, *J* = 7,2 Hz, H-C(3'')], 1,60-1,70 [m, 1H, H-C(3'''_a)], 1,76-1,92 [m, 3H, H-C(3'''_b), H-C(4'')], 3,79-3,75 [m, 1H, H-C(5'_a)], 3,80-3,86 [m, 1H, H-C(5'_b)], 3,97 [dd, 1H, *J* = 5,1, 8,3 Hz, H-C(2'')], 4,10 [m, 1H, H-C(4')], 4,19-4,26 [m, 2H, H-C(2'), H-C(3')], 4,61 [pt, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-C(2')], 5,73 [d, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-C(1')], 7,90 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 17,1 [C(3'')], 28,4 [C(3''')], 33,5 [C(4'')], 51,6 [C(2'')], 54,9 [C(2'')], 64,0 [d, ²*J*_{C,P} = 4,5 Hz, C(5')], 70,3 [C(3')], 73,1 [C(2')], 83,9 [d, ³*J*_{C,P} = 8,6 Hz, C(4')], 87,8 [C(1')], 116,6 [C(5)], 138,6 [C(8)], 151,1 [C(4)], 151,5 [C(2)], 158,9 [C(6)], 175,3 [C(1'')], 178,2 [C(1''')], 181,7 [C(5'')].



(S)-N²-((1-(N-(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)-33**: UV/Vis (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 563 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS: *m/z* 563,1145 (gefunden), *m/z* 563,1144 (berechnet für [C₁₈H₂₄N₆O₁₃P]⁻); ¹H NMR (400 MHz, D₂O/NaOD, COSY): δ [ppm] = 1,38 [d, 3H, *J* = 7,2 Hz, H-C(3'')], 1,74-1,87 [m, 1H, H-C(3'''_a)], 1,88-1,98 [m, 1H, H-C(3'''_b)], 2,04-2,13 [m, 2H, H-C(4'')], 3,83-3,96 [m, 2H, H-C(5')], 4,01 [dd, 1H, *J* = 5,1, 8,3 Hz, H-C(2'')], 4,19 [m, 1H, H-C(4')], 4,34 [pt, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-C(3')], 4,43 [q, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-C(2'')], 4,54 [pt, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(2')], 5,90 [d, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(1')], 8,09 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 17,1 [C(3'')], 28,4 [C(3''')], 34,0 [C(4'')], 51,2 [C(2'')], 55,3 [C(2'')], 63,7 [d, ²*J*_{C,P} = 4,8 Hz, C(5')], 70,4 [C(3')], 74,3 [C(2')], 83,7 [d, ³*J*_{C,P} = 8,7 Hz, C(4')], 86,6 [C(1')], 116,2 [C(5)], 137,4 [C(8)], 151,6 [C(4)], 151,9 [C(2)], 159,1 [C(6)], 175,3 [C(1'')], 178,4 [C(1''')], 182,1 [C(5'')].

4.4.9 Reaktion von 5'-GMP mit [¹³C₃]-Glycerinaldehyd

Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 1 mmol) wird mit Kaliumdihydrogenphosphat (4 mmol) und Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (7 mmol) in 10 mL einer DL-[¹³C₃]-Glycerinaldehydlösung (0,119 mol/L) gelöst. Das resultierende Gemisch wird auf pH 7 eingestellt und für 14 Tage bei 40 °C gelagert, wobei der Reaktionsverlauf mittels analytischer RP-HPLC verfolgt wird. Anschließend wird die Mischung membranfiltriert und präparativ aufgereinigt. Die beiden Hauptreaktionsprodukte werden getrennt voneinander

gesammelt, im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und wiederholt lyophilisiert. Die Zielverbindungen werden in Form amorpher, weißer Pulver mit Reinheiten > 95 % erhalten.

(R)- N^2 -([$^{13}\text{C}_3$]-1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, [$^{13}\text{C}_3$]-**(R)**-21: UV/Vis (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS

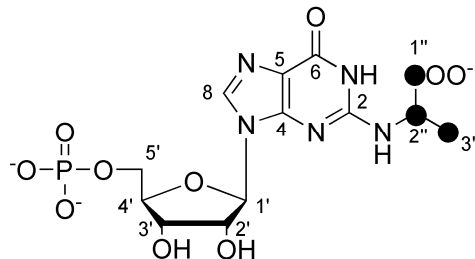
(ESI): m/z (%) 437 (100) [M-H]⁻; LC-TOF-MS:

m/z 437,0818 (gefunden); ^{13}C -NMR (100 MHz,

$\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 17,3 [d, J = 34,5 Hz, C(3'')], 52,5 [dd, J = 34,5, 54,5 Hz, C(2')],

63,7 [d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 4,8 Hz, C(5')], 70,3 [C(3')], 74,3 [C(2')],

84,0 [d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8,5 Hz, C(4')], 86,9 [C(1')], 115,8 [C(5)], 137,5 [C(8)], 151,9 [C(4)], 152,1 [d, J = 3,0 Hz, C(2)], 159,1 [C(6)], 171,0 [C(1'')], 181,0 [d, J = 54,5 Hz, C(1')].



(S)- N^2 -([$^{13}\text{C}_3$]-1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat, [$^{13}\text{C}_3$]-**(S)**-21: UV/Vis (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI): m/z (%) 437 (100) [M-H]⁻; LC-

TOF-MS: m/z 437,0852 (gefunden); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, HMQC, HMBC): δ

[ppm] = 17,3 [d, J = 34,5 Hz, C(3')], 52,6 [dd, J = 34,5, 54,6 Hz, C(2')], 63,6 [d, $^2J_{\text{C,P}}$ = 4,4 Hz,

C(5')], 70,3 [C(3')], 74,3 [C(2')], 84,0 [d, $^3J_{\text{C,P}}$ = 8,4 Hz, C(4')], 86,9 [C(1')], 115,8 [C(5)], 137,5

[C(8)], 151,9 [C(4)], 152,1 [d, J = 3,1 Hz, C(2)], 159,2 [C(6)], 171,0 [C(1'')], 181,0 [d,

J = 54,6 Hz, C(1')].

4.4.10 Bildungsstudien der N^2 -(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate

Referenzbedingungen

Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 0,1 mmol) und 1,3-Dihydroxyaceton Dimer (0,2 mmol) werden in 200 μL Phosphatpuffer (1 mol/L, pH 7,4) in einem 1,5 mL Vial suspendiert. Das verschlossene Vial wird im Aluminiumheizblock für 30 min bei 100 °C gelagert. Anschließend wird eine Lösung von *n*-Propylamin-Hydrochlorid (0,8 mmol in 250 μL Phosphatpuffer (1 mol/L, pH 7,4)) hinzugegeben und das Gemisch für weitere 240 min bei 100 °C thermisch behandelt.

Reaktionsdauer

Um den Einfluss der Reaktionsdauer zu überprüfen wird die oben beschriebene Reaktionsvorschrift dahingehend modifiziert, dass nach der Zugabe der Amidlösung das Gemisch für 60, 120, 240, 360 und 480 min auf 100 °C erhitzt wird.

pH-Wert

Zur Überprüfung der Bedeutung des pH-Wertes wird in der oben genannten Reaktionsvorschrift der Phosphatpuffer (1 mol/L, pH 7,4) durch Phosphatpufferlösungen der folgenden pH-Werte ersetzt: 4, 6, 7, 8 und 9. Die Konzentration beträgt in allen Fällen 1 mol/L.

Präinkubation

In Anlehnung an die obige Vorschrift werden drei Proben jeweils ohne Präinkubation nach der Zugabe der 1,3-Dihydroxyacetonlösung direkt mit der Lösung des Amins vermischt und für 240, 360 und 480 min bei 100 °C gelagert.

In allen Fällen wird nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 1 mL Wasser zu den Reaktionsgemischen hinzugegeben und die Lösung homogenisiert. Nach Membranfiltration wird die Lösung 1+9 (v/v) mit Wasser verdünnt und ein Aliquot mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Die semiquantitative Auswertung erfolgt dabei durch Abgleich der Summe der Peakflächen von (*R*)- und (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**21**), sowie (*R*)- und (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((*R*)-/(*S*)-**32**) mit denen der Referenzbedingungen, die als 100 % definiert werden.

4.5 Organische Synthesen

Soweit nicht anders vermerkt werden alle Synthesen unter Wasserausschluss in getrockneten Glasgeräten durchgeführt. Als Solventien werden ausschließlich getrocknete Lösungsmittel verwendet, als Schutzgas dient Argon. Die Verifizierung der synthetisierten Strukturen erfolgt mittels NMR und MS).

4.5.1 *N*²-acylierte Guanosinderivate

Die Acylierung von Guanosin erfolgt nach vorübergehender Silylierung und anschließender Umsetzung mit den entsprechenden Säurechloriden nach *Fan et al. (2004)* ^[116].

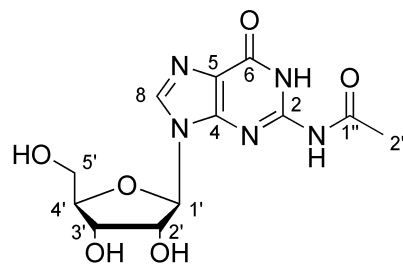
Guanosin Hydrat (2,5 mmol), das zuvor im Vakuum getrocknet wird, wird in einem Gemisch aus Dichlormethan (50 mL) und Pyridin (12,5 mL) unter Schutzgasatmosphäre im Eisbad gerührt. Anschließend wird tropfenweise, über etwa zwei Minuten unter weiterer Kühlung, Chlortrimethylsilan (22,5 mmol) zugegeben, bevor das Eisbad entfernt wird und das Gemisch für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird, wobei eine homogene Lösung entsteht. Nachdem die Lösung erneut im Eisbad platziert wird, erfolgt die Zugabe des entsprechenden Säurechlorids (2,75 mmol), bevor die Mischung für weitere drei Stunden im Eisbad verbleibt. Nach Zugabe von Methanol (10 mL) wird über Nacht gerührt um eine

vollständige Desilylierung zu erwirken, bevor die Lösung im Vakuum zu einem viskosen Öl eingeeengt wird.

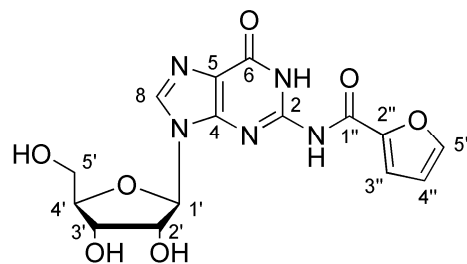
Der Rückstand des Acetylchloridansatzes wird nach Zugabe von Methanol (50 mL) für eine Stunde bei 0 °C gerührt, wobei *N*⁶-Acetyl-guanosin als weißer Niederschlag ausfällt, der abfiltriert und im Vakuum getrocknet wird. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben ^[116] überein.

Im Falle der Furoyl- und (*S*)-(-)-Acetoxypionylchloridansätze werden die Rückstände mindestens dreimal mit Wasser (50 mL) versetzt und im Vakuum einrotiert um Rückstände von Pyridin per Schleppe destillation zu entfernen. Anschließend wird *N*⁶-Furoyl-guanosin bei 0 °C aus Wasser (50 mL) auskristallisiert, während *N*⁶-(*S*)-O-Acetyl-laktoyl-guanosin mittels MPLC an RP-Material aufgereinigt wird. Nach dem Trocknen im Vakuum werden die Reinsubstanzen als weiße Pulver erhalten (Reinheiten > 95 %).

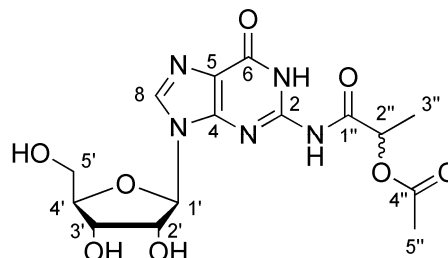
*N*⁶-Acetyl-guanosin: **UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN):** $\lambda_{\text{max}} = 256, 280 \text{ nm (sh)}$; **LC-TOF-MS:** m/z 324,0947 (gefunden), m/z 324,0950 (berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6]^-$); **¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO, COSY):** δ [ppm] = 2,18 [s, 3H, H-C(2'')], 3,50-3,57 [dd, 1H, $J = 4,1, 12,0$ Hz, H-C(5'_a)], 3,60-3,67 [dd, 1H, $J = 4,1, 12,0$ Hz, H-C(5'_b)], 3,90 [q, 1H, $J = 4,0$ Hz, H-C(4')], 4,14 [t, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-C(2')], 4,43 [t, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-C(3')], 4,90-5,64 [3 x bs, 3H, OH-C(3'), OH-C(4'), OH-C(5')], 5,80 [d, 1H, $J = 5,7$ Hz, H-C(1')], 8,27 [s, 1H, H-C(8)], 11,78 [s, 1H, H-N(2)], 12,05 [s, 1H, H-N(1)]; **¹³C-NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 23,8 [C(2'')], 61,1 [C(5')], 70,2 [C(3')], 74,0 [C(2')], 85,3 [C(4')], 86,7 [C(1')], 120,2 [C(5)], 137,7 [C(8)], 148,0 [C(4)], 148,8 [C(2)], 154,9 [C(6)], 173,5 [C(1'')].



*N*⁶-Furoyl-guanosin: **LC-TOF-MS:** m/z 376,0905 (gefunden), m/z 324,0899 (berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_7]^-$); **¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO, COSY):** δ [ppm] = 3,55 [dd, 1H, $J = 3,6, 11,5$ Hz, H-C(5'_a)], 3,67 [dd, 1H, $J = 3,6, 11,5$ Hz, H-C(5'_b)], 3,92 [m, 1H, H-C(4')], 4,13 [t, 1H, $J = 4,3$ Hz, H-C(2')], 4,46 [t, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-C(3')], 4,96-5,56 [3 x bs, 3H, OH-C(3'), OH-C(4'), OH-C(5')], 5,80 [d, 1H, $J = 6,0$ Hz, H-C(1')], 6,77 [dd, 1H, $J = 1,6, 3,6$ Hz, H-C(4'')], 7,79 [d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-C(3'')], 8,07 [d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-C(5'')], 8,30 [s, 1H, H-C(8)], 11,89 [s, 1H, H-N(2)], 12,12 [s, 1H, H-N(1)]; **¹³C-NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 61,2 [C(5')], 70,3 [C(3')], 74,0 [C(2')], 85,4 [C(4')], 86,3 [C(1')], 112,6 [C(4'')], 118,2 [C(3'')], 120,4 [C(5)], 137,7 [C(8)], 145,1 [C(4)], 148,0 [C(4)], 148,2 [C(2)], 149,0 [C(5'')], 155,5 [C(6)], 158,6 [C(1'')].



*N*²-(*S*)-*O*-Acetyl-laktoyl-guanosin: **UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN):** λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 396,1153 (gefunden), m/z 396,1161 (berechnet für [C₁₅H₁₈N₅O₈]); **¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO, COSY):** δ [ppm] = 1,45 [d, 3H, J = 6,9 Hz, H-C(3'')], 2,10 [s, 3H, H-C(5'')], 3,49-3,70 [m, 2H, H-C(5')], 3,91 [q, 1H, J = 3,9 Hz, H-C(4')], 4,13 [m, 1H, H-C(3')], 4,44 [dd, 1H, J = 4,9, 9,8 Hz, H-C(2')], 5,06 [t, 1H, J = 5,2 Hz, OH-C(5')], 5,11 [q, 1H, J = 6,9 Hz, H-C(2'')], 5,20 [d, 1H, J = 3,1 Hz, OH-C(3')], 5,49 [bd, 1H, J = 5,3 Hz, OH-C(4')], 5,82 [d, 1H, J = 5,7 Hz, H-C(1')], 8,30 [s, 1H, H-C(8)], 11,77 [s, 1H, H-N(2)], 12,02 [s, 1H, H-N(1)]; **¹³C-NMR (400 MHz, d₆-DMSO, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 16,8 [C(5'')], 20,3 [C(3'')], 61,0 [C(5')], 69,4 [C(2'')], 70,0 [C(3')], 74,0 [C(2')], 85,1 [C(4')], 86,4 [C(1')], 120,3 [C(5)], 137,7 [C(8)], 147,3 [C(4)], 148,5 [C(2)], 154,7 [C(6)], 171,8 [C(4'')], 173,5 [C(1'')].

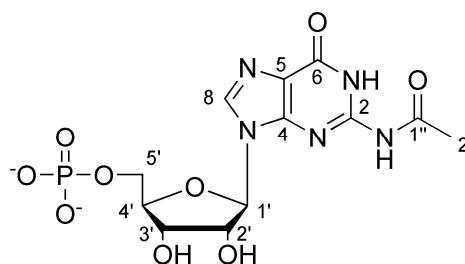


4.5.2 *N*²-acylierte Guanosin-5'-monophosphatderivate

Die Phosphorylierung der *N*²-acylierten Guanosine erfolgt, in Anlehnung an die von *Cairoli et al.* (2008) ^[31] publizierte Methode, durch Umsetzung mit Phosphoroxychlorid in Triethylphosphat.

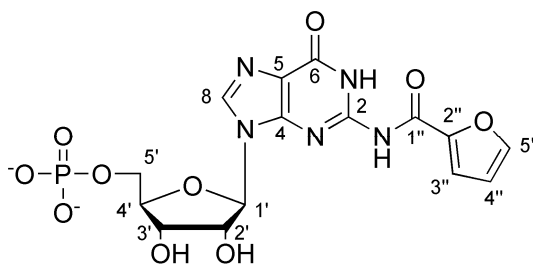
Ein Gemisch aus dem *N*²-acylierten Guanosin (1 mmol) und Triethylphosphat (2,5 mL) wird, unter ständigem Rühren unter Schutzgasatmosphäre, im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend erfolgt vorsichtig die tropfenweise Zugabe von Phosphoroxychlorid (6 mmol). Die Lösung wird weitere vier Stunden unter Rühren im Eisbad belassen, wobei gelegentlich mittels analytischer RP-HPLC der Reaktionsverlauf geprüft wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von Eis (10 mL) beendet, der pH-Wert mit Hilfe von Natriumhydroxidlösung (3 mol/L) auf pH 3 eingestellt und die Zielverbindung anschließend mittels präparativer HPLC isoliert. Nach Lösungsmittelentfernung im Vakuum und wiederholter Lyophilisation werden die acylierten Guanosin-5'-monophosphate als amorphe, weiße Pulver erhalten (Reinheiten > 95 %).

*N*²-Acetyl-guanosin-5'-monophosphat, **13:** **UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN):** λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC/MS (ESI):** m/z (%) 404 (100, [M-H]); **LC-TOF-MS:** m/z 404,0605 (gefunden), m/z 404,0613 (berechnet für [C₁₂H₁₅N₅O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY):** δ [ppm] = 2,29 [s, 3H, H-C(2'')], 4,10-4,18 [m, 1H, H-C(5'_a)], 3,97-4,10 [m, 2H, H-C(5'_b)], 4,36 [m, 1H, H-C(4')], 4,51 [dd, 1H, J = 3,3, 5,1 Hz, H-C(3')], 4,72 [pt, 1H, J = 5,4 Hz, H-C(2')], 6,01 [d, 1H, J = 6,2 Hz, H-C(1')], 8,26 [s,

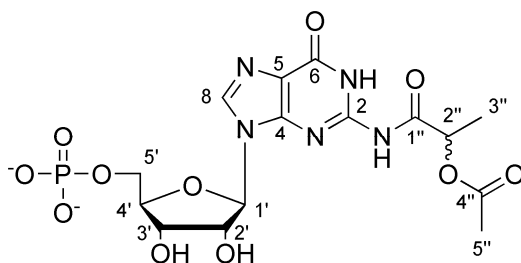


1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 26,3 [C(2'')], 67,4 [d, ²J_{C,P} = 4,8 Hz, C(5')], 73,4 [C(3')], 76,4 [C(2')], 87,1 [d, ³J_{C,P} = 8,7 Hz, C(4')], 90,6 [C(1')], 123,0 [C(5)], 142,9 [C(8)], 150,6 [C(4)], 152,4 [C(2)], 160,3 [C(6)], 178,3 [C(1'')].

*N*²-Furoyl-guanosin-5'-monophosphat, **43**: LC/MS (ESI): *m/z* (%) 456 (100, [M-H]⁻); LC-TOF-MS: *m/z* 456,0577 (gefunden), *m/z* 456,0562 (berechnet für [C₁₅H₁₅N₅O₁₀P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY): δ [ppm] = 3,96-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,14 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,22 [m, 1H, H-C(4')], 4,37 [pt, 1H, *J* = 5,0 Hz, H-C(3')], 4,56 [pt, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-C(2')], 5,96 [d, 1H, *J* = 4,5 Hz, H-C(1')], 6,55 [dd, 1H, *J* = 1,8, 3,4 Hz, H-C(4'')], 7,17 [d, 1H, *J* = 3,4 Hz, H-C(3'')], 7,64 [d, 1H, *J* = 1,8 Hz, H-C(5'')], 8,33 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 64,6 [d, C(5')], 71,5 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,8 [d, C(4')], 89,5 [C(1')], 112,5 [C(3'')], 114,5 [C(4'')], 120,5 [C(5)], 139,0 [C(8)], 145,6 [C(5'')], 152,8 [C(4)], 153,2 [C(2'')], 159,3 [C(2)], 162,7 [C(6)], 169,9 [C(1'')].



*N*²-(*S*)-*O*-Acetyl-laktoyl-guanosin-5'-monophosphat, **24**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 476 (100, [M-H]⁻); LC-TOF-MS: *m/z* 476,0811 (gefunden), *m/z* 476,0824 (berechnet für [C₁₅H₁₉N₅O₁₁P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, COSY): δ [ppm] = 1,54 [d, 3H, *J* = 7,0 Hz, H-C(3'')], 2,14 [s, 3H, H-C(5'')], 4,11-4,29 [m, 3H, H-C(4'), H-C(5')], 4,51 [dd, 1H, *J* = 3,0, 5,0 Hz, 1H, H-C(3')], 4,72 [pt, 1H, *J* = 5,4 Hz, H-C(2')], 5,13 [q, 1H, *J* = 6,9 Hz, H-C(2'')], 5,95 [d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-C(1')], 8,22 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 17,4 [C(5'')], 20,5 [C(3'')], 66,8 [d, ²J_{C,P} = 5,2 Hz, C(5')], 71,5 [C(2'')], 72,2 [C(3')], 75,3 [C(2')], 85,3 [d, ³J_{C,P} = 8,8 Hz, C(4')], 90,1 [C(1')], 121,7 [C(5)], 140,5 [C(8)], 150,4 [C(4)], 156,3 [C(2)], 157,3 [C(6)], 172,1 [C(4'')], 175,4 [C(1'')].



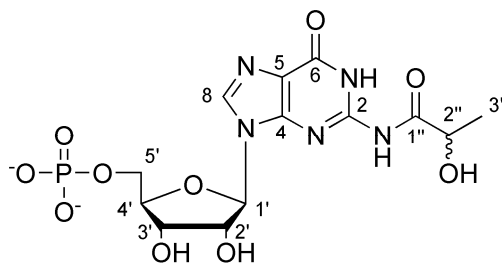
4.5.3 *N*²-Laktoyl-guanosin-5'-monophosphat

Die Deacetylierung von *N*²-(*S*)-*O*-Acetyl-laktoyl-guanosin-5'-monophosphat (**24**) wird leicht modifiziert nach Stark und Hofmann (2005) ^[134] durchgeführt.

24 (0,1 mmol) wird mit einer K₂CO₃-Lösung (2 mL, 0,25 mol/L in Wasser/Methanol (1/1, v/v)) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird durch Zugabe von Salzsäure (1 mol/L) ein pH Wert von 3-4 eingestellt und die Lösung mittels präparativer

HPLC an einer Umkehrphase aufgereinigt. Die Fraktion der bei 260 nm absorbierenden Zielverbindung wird gesammelt, vom Lösungsmittel befreit und wiederholt lyophilisiert um einen weißen, amorphen Rückstand zu erhalten, dessen Reinheit mittels spektroskopischer Techniken auf > 95 % bestimmt wird.

*N*²-(*S*)-Laktolyl-guanosin-5'-monophosphat, **12**: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); LC/MS (ESI): *m/z* (%) 434 (100, [M-H]⁻); LC-TOF-MS: *m/z* 434,0716 (gefunden), *m/z* 434,0719 (berechnet für [C₁₃H₁₇N₅O₁₀P]⁻); ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY): δ [ppm] = 1,50 [d, 3H, *J* = 7,0 Hz, H-C(3'')], 4,03-4,20 [m, 2H, H-C(5')], 4,36 [m, 1H, H-C(4')], 4,49 [m, 1H, H-C(3')], 4,53 [q, 1H, H-C(2'')], 4,72 [pt, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-C(2')], 6,03 [d, 1H, *J* = 6,0 Hz, H-C(1')], 8,33 [s, 1H, H-C(8)]; ¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, HMQC, HMBC): δ [ppm] = 22,3 [C(3'')], 67,5 [d, ²*J*_{C,P} = 5,0 Hz, C(5')], 70,8 [C(2'')], 73,5 [C(3')], 76,9 [C(2')], 87,1 [d, ³*J*_{C,P} = 8,8 Hz, C(4')], 90,5 [C(1')], 123,1 [C(5)], 142,7 [C(8)], 150,3 [C(4)], 152,3 [C(2)], 160,3 [C(6)], 181,3 [C(1'')].



4.5.4 Synthese von amidierten *N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphatderivaten

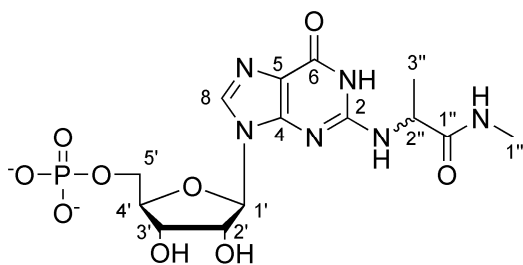
Die Amidierung des carboxyaktivierten Nukleotids *N*²-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**) wird in wässriger, saurer Lösung in Gegenwart von *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC·HCl) und einem Überschuss des entsprechendenamins durchgeführt.

Eine Lösung von (**R**)- oder (**S**)-**21** (0,1 mmol), EDC·HCl (0,5 mmol) und dem jeweiligen Amin bzw. dessen Hydrochlorid (2 mmol) in Wasser (4 mL) wird auf einen pH-Wert von 4,7-5,0 eingestellt. Anschließend wird die Lösung für etwa vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert in regelmäßigen Abständen kontrolliert und auf pH 4,7-5,0 nachreguliert wird. Nachdem die Überprüfung der Reaktion mittels analytischer RP-HPLC die quantitative Umwandlung des Ausgangsmaterials in das entsprechende Amid bestätigt, wird das Reaktionsgemisch mittels präparativer HPLC an einer Umkehrphase aufgereinigt. Die Zielfraktion wird am Rotationsverdampfer eingedunstet und unter den gleichen Bedingungen rechromatographiert. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels und wiederholter Lyophilisation, werden die Verbindungen als amorphe, weiße Pulver hoher Reinheit (>95 %) erhalten.

(R)-*N*²-((1-(*N*-Methylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)-34**:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS**: *m/z* 447,1037 (gefunden), *m/z* 447,1035 (berechnet für [C₁₄H₂₀N₆O₉P]⁻); **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD/NaOD,

COSY): δ [ppm] = 1,39 [d, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-C(3'')], 2,74 [s, 3H, H-C(1''')], 3,97-4,04 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,06-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,15 [m, 1H, H-C(4')], 4,40-4,48 [m, 2H, H-C(3'), H-C(2'')], 4,68 [t, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-C(2')], 5,83 [d, 1H, *J* = 4,6 Hz, H-C(1')], 8,00 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR** (100 MHz,



CD₃OD/NaOD, **HMQC, HMBC, DEPT**): δ [ppm] = 19,0 [C(3'')], 26,4 [C(1''')], 52,7 [C(2'')], 65,1 [d, ²*J*_{C,P} = 4,6 Hz, C(5')], 72,3 [C(3')], 76,0 [C(2')], 85,6 [d, ³*J*_{C,P} = 8,3 Hz, C(4')], 90,2 [C(1')], 119,8 [C(5)], 137,4 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,7 [C(6)], 178,7 [C(1'')].

(S)-*N*²-((1-(*N*-Methylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)-34**:

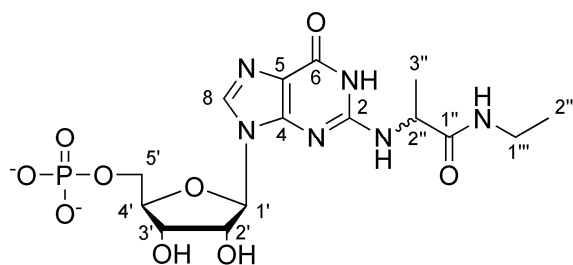
UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS**: *m/z* 447,1038 (gefunden), *m/z* 447,1035 (berechnet für [C₁₄H₂₀N₆O₉P]⁻); **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD/NaOD,

COSY): δ [ppm] = 1,40 [d, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-C(3'')], 2,74 [s, 3H, H-C(1''')], 3,94-4,00 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,07-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,16 [m, 1H, H-C(4')], 4,31 [t, 1H, *J* = 5,2 Hz, H-C(3')], 4,51 [q, 1H, *J* = 7,0 Hz, H-C(2'')], 4,60 [t, 1H, *J* = 5,0 Hz, H-C(2')], 5,83 [d, 1H, *J* = 4,3 Hz, H-C(1')], 7,99 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃OD/NaOD, **HMQC, HMBC, DEPT**): δ [ppm] = 19,1 [C(3'')], 26,4 [C(1''')], 52,2 [C(2'')], 65,7 [d, ²*J*_{C,P} = 4,6 Hz, C(5')], 73,0 [C(3')], 77,0 [C(2')], 85,5 [d, ³*J*_{C,P} = 8,3 Hz, C(4')], 90,7 [C(1')], 119,7 [C(5)], 136,9 [C(8)], 153,1 [C(4)], 161,2 [C(2)], 169,8 [C(6)], 178,3 [C(1'')].

(R)-*N*²-((1-(*N*-Ethylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)-35**:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS**: *m/z* 461,1186 (gefunden), *m/z* 461,1191 (berechnet für [C₁₅H₂₂N₆O₉P]⁻); **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD/NaOD,

COSY): δ [ppm] = 1,08 [t, 3H, *J* = 7,3 Hz, H-C(2''')], 1,39 [d, 3H, *J* = 7,1 Hz, H-C(3'')], 3,20 [q, 2H, *J* = 7,2 Hz, H-C(1''')], 3,96-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,16 [m, 1H, H-C(4')], 4,38-4,48 [m, 2H, H-C(3'), H-C(2'')], 4,61 [t, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-C(2')], 5,87



[d, 1H, *J* = 4,6 Hz, H-C(1')], 8,06 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃OD/NaOD, **HSQC, HMBC**): δ [ppm] = 14,9 [C(2''')], 19,0 [C(3'')], 35,2 [C(1''')], 52,8 [C(2'')], 65,0 [d, ²*J*_{C,P} = 4,4 Hz, C(5')], 72,2 [C(3')], 76,4 [C(2')], 85,6 [d, ³*J*_{C,P} = 8,3 Hz, C(4')], 89,9 [C(1')], 119,7 [C(5)], 137,2 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,7 [C(6)], 177,7 [C(1'')].

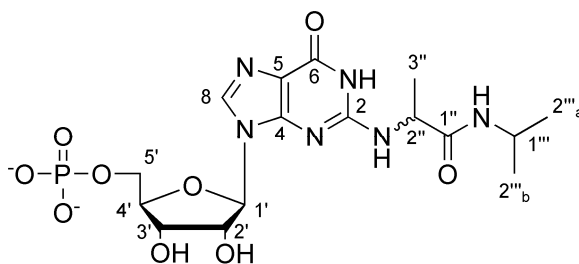
(S)-*N*²-((1-(*N*-Ethylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)-35**:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 461,1190 (gefunden), m/z 461,1191 (berechnet für [C₁₅H₂₂N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,08 [t, 3H, J = 7,3 Hz, H-C(2'')], 1,38 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 3,20 [q, 2H, J = 7,2 Hz, H-C(1'')], 3,97-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,43 [t, 1H, J = 4,9 Hz, H-C(3')], 4,48 [q, 1H, J = 7,1 Hz, H-C(2'')], 4,55 [t, 1H, J = 4,8 Hz, H-C(2')], 5,90 [d, 1H, J = 4,4 Hz, H-C(1')], 8,12 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HSQC, HMBC):** δ [ppm] = 14,9 [C(2'')], 19,0 [C(3'')], 35,2 [C(1'')], 52,6 [C(2')], 64,9 [d, $^2J_{C,P}$ = 4,5 Hz, C(5')], 72,1 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,7 [d, $^3J_{C,P}$ = 8,5 Hz, C(4')], 89,5 [C(1')], 119,5 [C(5)], 137,0 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,7 [C(6)], 177,6 [C(1'')].

Die spektroskopischen Daten von (*R*)- und (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat (**32**) stimmten mit denen in **Kapitel 4.4.8** überein.

(R)-*N*²-((1-(*N*-Isopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)-36**:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 475,1354 (gefunden), m/z 475,1348 (berechnet für [C₁₆H₂₄N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,08 [d, 3H, J = 6,6 Hz, H-C(2'''_a)], 1,12 [d, 3H, J = 6,6 Hz, H-C(2'''_b)], 1,37 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 3,93 [sept, 1H, J = 6,6 Hz, H-C(2'')], 3,98-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,15 [m, 1H, H-C(4')], 4,40 [q, 1H, J = 7,1 Hz, H-C(2'')], 4,46 [pt, 1H, J = 4,9 Hz, H-C(3')], 4,56 [pt, 1H, J = 4,7 Hz, H-C(2')], 5,90 [d, 1H, J = 4,4 Hz, H-C(1')], 8,12 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 18,9 [C(3'')], 22,6 [C(2'''_{a,b})], 42,4 [C(1'')], 52,8 [C(2')], 64,8 [d, $^2J_{C,P}$ = 4,4 Hz, C(5')], 72,1 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,6 [d, $^3J_{C,P}$ = 8,6 Hz, C(4')], 89,5 [C(1')], 119,5 [C(5)], 137,1 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,7 [C(6)], 178,0 [C(1'')].



(S)-*N*²-((1-(*N*-Isopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)-36**:

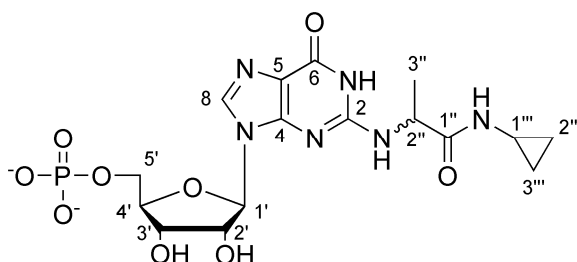
UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 475,1359 (gefunden), m/z 475,1348 (berechnet für [C₁₆H₂₄N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,08 [d, 3H, J = 6,6 Hz, H-C(2'''_a)], 1,12 [d, 3H, J = 6,6 Hz, H-C(2'''_b)], 1,37 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 3,89-3,98 [m, 1H, J = 6,6 Hz, H-C(2'')], 3,98-4,04 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,04-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,41 [t, 1H, J = 4,9 Hz, H-C(3')], 4,47 [q, 1H, J = 7,1 Hz, H-C(2'')], 4,54 [t, 1H, J = 4,7 Hz, H-C(2')], 5,91 [d, 1H, J = 4,4 Hz, H-C(1')], 8,13 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT):** δ

[ppm] = 18,9 [C(3'')], 22,5 [C(2'''_{a,b})], 42,2 [C(1''')], 52,5 [C(2'')], 64,7 [d, $^2J_{C,P} = 4,9$ Hz, C(5')], 72,0 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,5 [d, $^3J_{C,P} = 8,4$ Hz, C(4')], 89,3 [C(1')], 119,3 [C(5)], 136,8 [C(8)], 152,9 [C(4)], 161,0 [C(2)], 169,6 [C(6)], 176,7 [C(1'')].

(*R*)-*N*²-((1-(*N*-Cyclopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-

37: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\max} = 256, 280$ nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 473,1205 (gefunden), m/z 473,1191 (berechnet für [C₁₆H₂₂N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD,**

COSY): δ [ppm] = 0,50 [m, 2H, H-C(2'''_a)], H-C(3'''_a)], 0,67 [m, 2H, H-C(2'''_b)], H-C(3'''_b)], 1,37 [d, 3H, $J = 7,1$ Hz, H-C(3'')], 2,63 [m, 1H, H-C(1''')], 3,95-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,39 [q, 1H, $J = 7,1$ Hz, H-C(2'')], 4,44 [pt, 1H,



$J = 4,9$ Hz, H-C(3')), 4,63 [pt, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-C(2')], 5,86 [d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H-C(1')], 8,06 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 6,5 [C(2''), C(3'')], 18,8 [C(3'')], 23,3 [C(1''')], 52,5 [C(2'')], 65,0 [d, $^2J_{C,P} = 4,8$ Hz, C(5')], 72,2 [C(3')], 76,3 [C(2')], 85,7 [d, $^3J_{C,P} = 8,4$ Hz, C(4')], 89,8 [C(1')], 119,6 [C(5)], 137,2 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,7 [C(6)], 179,7 [C(1'')].

(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Cyclopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-

37: UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\max} = 256, 280$ nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 473,1191 (gefunden), m/z 473,1191 (berechnet für [C₁₆H₂₂N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD,**

COSY): δ [ppm] = 0,49 [m, 2H, H-C(2'''_a)], H-C(3'''_a)], 0,67 [m, 2H, H-C(2'''_b)], H-C(3'''_b)], 1,37 [d, 3H, $J = 7,1$ Hz, H-C(3'')], 2,64 [m, 1H, H-C(1''')], 3,97-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,41 [pt, 1H, $J = 4,9$ Hz, H-C(3')], 4,46 [q, 1H, $J = 7,1$ Hz, H-C(2'')], 4,57 [pt, 1H, $J = 4,8$ Hz, H-C(2')], 5,89 [d, 1H, $J = 4,4$ Hz, H-C(1')], 8,10 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HSQC, HMBC):** δ [ppm] = 6,5-6,6 [C(2''), C(3'')], 19,0 [C(3'')], 23,3 [C(1''')], 52,4 [C(2'')], 65,0 [d, $^2J_{C,P} = 4,5$ Hz, C(5')], 72,2 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,7 [d, $^3J_{C,P} = 8,3$ Hz, C(4')], 89,7 [C(1')], 119,5 [C(5)], 137,0 [C(8)], 153,1 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 179,5 [C(1'')].

(R)-N²-((1-(*N*-Butylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(R)-38:**

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 489,1528 (gefunden), m/z 489,1504 (berechnet für [C₁₇H₂₆N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD,**

COSY): δ [ppm] = 0,82 [t, 3H, J = 7,4 Hz,

H-C(4'''), 1,24 [m, 2H, H-C(3''')], 1,39 [d,

3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,45 [m, 2H, H-

C(2''')], 3,12 [dt, 1H, J = 7,0, 13,7 Hz, H-

C(1'''_a)], 3,22 [dt, 1H, J = 13,7, 7,0 Hz, H-

C(1'''_b)], 3,98-4,06 [m, 1H, H-C(5'_a)],

4,06-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,16 [m, 1H, H-C(4')], 4,41 [q, 1H, J = 7,1 Hz, H-C(2'')], 4,46 [pt,

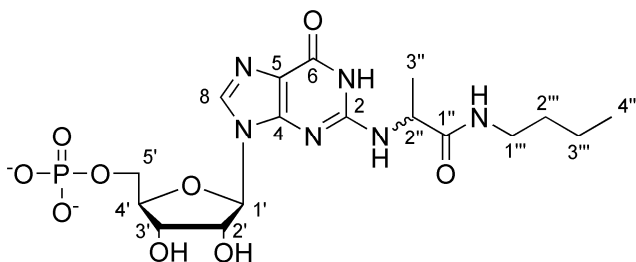
1H, J = 5,0 Hz, H-C(3')], 4,57 [pt, 1H, J = 4,7 Hz, H-C(2')], 5,88 [d, 1H, J = 4,2 Hz, H-C(1')],

8,09 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] =

14,2 [C(4''')], 19,0 [C(3'')], 21,1 [C(3''')], 32,7 [C(2''')], 40,1 [C(1''')], 53,1 [C(2'')], 65,0 [d, ² $J_{C,P}$

= 4,6 Hz, C(5')], 72,2 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,6 [d, ³ $J_{C,P}$ = 8,3 Hz, C(4')], 90,0 [C(1')], 119,8

[C(5)], 137,3 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,2 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,1 [C(1'')].



(S)-N²-((1-(*N*-Butylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)-38:**

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 489,1512 (gefunden), m/z 489,1504 (berechnet für [C₁₇H₂₆N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD,**

COSY): δ [ppm] = 0,85 [t, 3H, J = 7,3 Hz, H-C(4'''), 1,26 [dq, 2H, J = 7,3, 14,5 Hz, H-C(3''')],

1,39 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,45 [m, 2H, H-C(2''')], 3,17 [t, 2H, J = 7,0 Hz, H-C(1''')],

3,97-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,16 [m, 1H, H-C(4')], 4,40 [pt, 1H, J

= 5,0 Hz, H-C(3')], 4,46-4,55 [m, 2H, H-C(2'), H-C(2'')], 5,89 [d, 1H, J = 4,2 Hz, H-C(1')], 8,11

[s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HSQC, HMBC):** δ [ppm] = 14,1 [C(4''')],

19,0 [C(3'')], 21,0 [C(3''')], 32,5 [C(2''')], 40,0 [C(1''')], 52,7 [C(2'')], 65,0 [d, ² $J_{C,P}$ = 3,6 Hz,

C(5')], 72,1 [C(3')], 76,9 [C(2')], 85,7 [d, ³ $J_{C,P}$ = 8,3 Hz, C(4')], 89,8 [C(1')], 119,6 [C(5)], 137,0

[C(8)], 153,1 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,7 [C(1'')].

(S)-N²-((1-(*N*-Isobutylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, **(S)-39:**

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 489,1493 (gefunden), m/z 489,1504 (berechnet für

[C₁₇H₂₆N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz,**

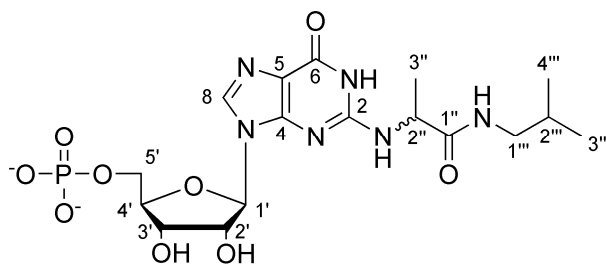
CD₃OD/NaOD, COSY): δ [ppm] = 0,81 [dd,

6H, J = 6,7, 8,6 Hz, H-C(3'''), H-C(4''')], 1,40

[d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,75 [m, 1H, H-

C(2''')], 2,96 [dd, 1H, J = 7,0, 13,2 Hz, H-

C(1'''_a)], 3,03 [dd, 1H, J = 6,9, 13,2 Hz, H-C(1'''_b)], 3,98-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,11 [m,

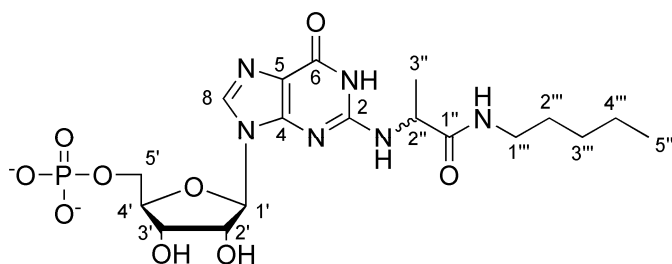


1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,41 [pt, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-C(3')], 4,48-4,53 [m, 2H, H-C(2'), H-C(2'')], 5,90 [d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-C(1')], 8,13 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HSQC, HMBC)**: δ [ppm] = 19,0 [C(3''')], 20,4-20,5 [C(3'''), C(4''')], 29,6 [C(2''')], 47,7 [C(1''')], 52,7 [C(2'')], 64,9 [d, $^2J_{C,P} = 4,3$ Hz, C(5')], 72,0 [C(3')], 76,8 [C(2')], 85,6 [d, $^3J_{C,P} = 8,4$ Hz, C(4')], 89,6 [C(1')], 119,5 [C(5)], 137,0 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,9 [C(1'')].

(*R*)-*N*²-((1-(*N*-Pentylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-40:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\max} = 256, 280$ nm (sh); **LC-TOF-MS**: m/z 503,1682 (gefunden), m/z 503,1661 (berechnet für [C₁₈H₂₈N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY)**: δ [ppm] = 0,82 [t, 3H, $J = 7,4$

Hz, H-C(5'''), 1,24 [m, 4H, H-C(3'''), H-C(4''')], 1,39 [d, 3H, $J = 7,1$ Hz, H-C(3'')], 1,45 [m, 2H, H-C(2'')], 3,12 [dt, 1H, $J = 7,0, 13,5$ Hz, H-C(1'''_a)], 3,22 [dt, 1H, $J = 7,0, 13,9$ Hz, H-C(1'''_b)],



3,98-4,06 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,06-4,13 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,16 [m, 1H, H-C(4')], 4,41 [q, 1H, $J = 7,1$ Hz, H-C(2'')], 4,46 [pt, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-C(3')], 4,57 [pt, 1H, $J = 4,7$ Hz, H-C(2')], 5,88 [d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-C(1')], 8,09 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT)**: δ [ppm] = 14,2 [C(5''')], 19,0 [C(3'')], 21,1 [C(4'')], 32,7 [C(3''')], 32,7 [C(2''')], 40,1 [C(1''')], 53,1 [C(2'')], 65,0 [d, $^2J_{C,P} = 4,6$ Hz, C(5')], 72,2 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,6 [d, $^3J_{C,P} = 8,3$ Hz, C(4')], 90,0 [C(1')], 119,8 [C(5)], 137,3 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,2 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,1 [C(1'')].

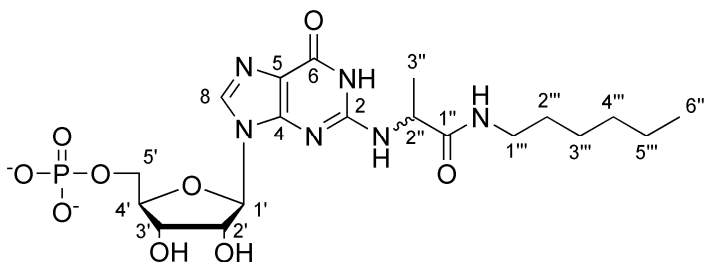
(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Pentylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-40:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\max} = 256, 280$ nm (sh); **LC-TOF-MS**: m/z 503,1657 (gefunden), m/z 503,1661 (berechnet für [C₁₈H₂₈N₆O₉P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY)**: δ [ppm] = 0,82 [t, 3H, $J = 7,0$ Hz, H-C(5'''), 1,24 [m, 4H, H-C(3'''), H-C(4''')], 1,39 [d, 3H, $J = 7,1$ Hz, H-C(3'')], 1,46 [m, 2H, H-C(2'')], 3,17 [t, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-C(1''')], 3,96-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,16 [m, 1H, H-C(4')], 4,40 [pt, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-C(3')], 4,46-4,54 [m, 2H, H-C(2'), H-C(2'')], 5,89 [d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-C(1')], 8,11 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HSQC, HMBC)**: δ [ppm] = 14,4 [C(5''')], 19,0 [C(3'')], 23,4 [C(4'')], 30,1 [C(2'''/3''')], 40,3 [C(1''')], 52,7 [C(2'')], 64,9 [d, $^2J_{C,P} = 3,8$ Hz, C(5')], 72,1 [C(3')], 76,9 [C(2')], 85,6 [d, $^3J_{C,P} = 8,2$ Hz, C(4')], 89,7 [C(1')], 119,5 [C(5)], 136,9 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,7 [C(1'')].

(*R*)-*N*²-((1-(*N*-Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-41:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS**: m/z 517,1818 (gefunden), m/z 517,1817 (berechnet für [C₁₉H₃₀N₆O₉P]⁻); **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD/NaOD,

COSY): δ [ppm] = 0,82 [t, 3H, J = 6,8 Hz, H-C(6''), 1,21 [m, 6H, H-C(3''), H-C(4''), H-C(5'')], 1,39 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,45 [m, 2H, H-C(2'')], 3,17 [m, 2H, H-C(1'')], 3,97-4,04 [m, 1H, H-C(5'_a)],



4,06-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,14 [m, 1H, H-C(4')], 4,40 [pt, 1H, J = 5,3 Hz, H-C(3')], 4,43 [q, 1H, J = 7,1 Hz, H-C(2')], 4,55 [pt, 1H, J = 4,5 Hz, H-C(2')], 5,84 [d, 1H, J = 4,0 Hz, H-C(1')], 8,02 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR** (100 MHz, CD₃OD/NaOD, **HMQC**, **HMBC**, **DEPT**): δ [ppm] = 14,5 [C(6'')], 19,0 [C(3'')], 23,7 [C(5'')], 27,7 [C(4'')], 30,5 [C(3'')], 32,7 [C(2'')], 40,5 [C(1'')], 53,1 [C(2')], 65,5 [d, ² $J_{C,P}$ = 4,4 Hz, C(5')], 72,5 [C(3')], 77,2 [C(2')], 85,8 [d, ³ $J_{C,P}$ = 8,0 Hz, C(4')], 90,8 [C(1')], 119,8 [C(5)], 137,2 [C(8)], 153,1 [C(4)], 161,3 [C(2)], 170,0 [C(6)], 178,1 [C(1')].

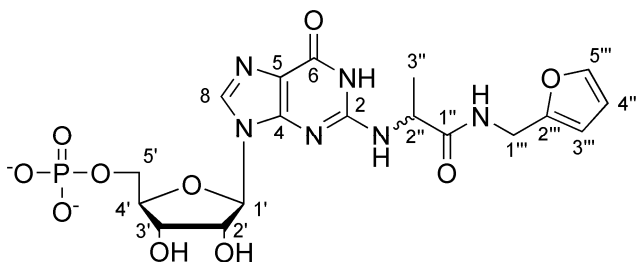
(*S*)-*N*²-((1-(*N*-Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-41:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS**: m/z 517,1823 (gefunden), m/z 517,1817 (berechnet für [C₁₉H₃₀N₆O₉P]⁻); **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD/NaOD,

COSY): δ [ppm] = 0,84 [t, 3H, J = 6,7 Hz, H-C(6''), 1,22 [m, 6H, H-C(3''), H-C(4''), H-C(5'')], 1,38 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-C(3'')], 1,44 [m, 2H, H-C(2'')], 3,16 [t, J = 7,1 Hz, 2H, H-C(1'')], 3,98-4,05 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,05-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,42 [t, 1H, J = 5,0 Hz, H-C(3')], 4,49 [q, 1H, J = 7,1 Hz, H-C(2')], 4,52 [t, 1H, J = 4,7 Hz, H-C(2')], 5,90 [d, 1H, J = 4,2 Hz, H-C(1')], 8,13 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C NMR** (100 MHz, CD₃OD/NaOD, **HMQC**, **HMBC**, **DEPT**): δ [ppm] = 14,4 [C(6'')], 18,9 [C(3'')], 23,6 [C(5'')], 27,6 [C(4'')], 30,4 [C(3'')], 32,7 [C(2'')], 40,3 [C(1'')], 52,7 [C(2')], 64,8 [d, ² $J_{C,P}$ = 4,7 Hz, C(5')], 72,0 [C(3')], 76,8 [C(2')], 85,6 [d, ³ $J_{C,P}$ = 8,5 Hz, C(4')], 89,5 [C(1')], 119,5 [C(5)], 137,0 [C(8)], 153,0 [C(4)], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,7 [C(1')].

(*R*)-*N*²-((1-(*N*-Furfurylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**R**)-42:

UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): λ_{\max} = 256, 280 nm (sh); **LC-TOF-MS**: m/z 513,1166 (gefunden), m/z 513,1141 (berechnet für [C₁₈H₂₂N₆O₁₀P]⁻); **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃OD/NaOD, **COSY**): δ [ppm] = 1,40 [d, 3H, J = 7,1 Hz, H-



C(3')], 3,97-4,04 [m, 1H, H-C(5'_a)], 3,98-4,16 [m, 2H, H-C(4'), H-C(5'_b)] ,4,30-4,43 [m, 3H, H-C(3'), H-C(1''')], 4,48 [q, 1H, $J = 7,1$ Hz, H-C(2'')], 4,55 [pt, 1H, $J = 4,6$ Hz, H-C(3')], 5,82 [d, 1H, $J = 4,0$ Hz, H-C(1)], 6,15 [d, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-C(3''')], 6,25 [dd, 1H, $J = 1,9, 3,2$ Hz, H-C(4''')], 7,32 [d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-C(5''')], 8,01 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 19,0 [C(3'')], 37,3 [C(1''')], 53,0 [C(2'')], 65,6 [d, $^2J_{C,P} = 4,3$ Hz, C(5')], 72,5 [C(3')], 77,2 [C(2')], 85,8 [d, $^3J_{C,P} = 8,2$ Hz, C(4')], 91,0 [C(1')], 108,0 [C(3''')], 111,5 [C(4''')], 119,9 [C(5)], 137,3 [C(8)], 143,3 [C(5''')], 153,1 [C(4)], 153,3 [C(2''')], 161,3 [C(2)], 169,9 [C(6)], 178,2 [C(1'')].

(*S*)-N²-((1-(*N*-Furfurylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat, (**S**)-42:
UV/VIS (1 % aq. HCOOH/MeCN): $\lambda_{\max} = 256, 280$ nm (sh); **LC-TOF-MS:** m/z 513,1147 (gefunden), m/z 513,1141 (berechnet für [C₁₈H₂₂N₆O₁₀P]); **¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/NaOD, COSY):** δ [ppm] = 1,40 [d, 3H, $J = 7,1$ Hz, H-C(3')], 3,98-4,06 [m, 1H, H-C(5'_a)], 4,06-4,12 [m, 1H, H-C(5'_b)], 4,17 [m, 1H, H-C(4')], 4,36 [d, 2H, $J = 2,0$ Hz, H-C(1''')], 4,43 [pt, 1H, $J = 5,0$ Hz, H-C(3')], 4,48-4,56 [m, 2H, H-C(3'), H-C(2'')], 5,90 [d, 1H, $J = 4,2$ Hz, H-C(1)], 6,14 [d, 1H, $J = 3,2$ Hz, H-C(3''')], 6,25 [dd, 1H, $J = 1,9, 3,2$ Hz, H-C(4''')], 7,32 [d, 1H, $J = 1,9$ Hz, H-C(5''')], 8,14 [s, 1H, H-C(8)]; **¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/NaOD, HMQC, HMBC, DEPT):** δ [ppm] = 18,8 [C(3'')], 37,2 [C(1''')], 52,7 [C(2'')], 64,7 [d, $^2J_{C,P} = 4,6$ Hz, C(5')], 71,9 [C(3')], 76,7 [C(2')], 85,6 [d, $^3J_{C,P} = 8,4$ Hz, C(4')], 89,6 [C(1')], 107,8 [C(3''')], 111,3 [C(4''')], 119,6 [C(5)], 137,0 [C(8)], 143,1 [C(5''')], 153,0 [C(4)], 153,2 [C(2''')], 161,1 [C(2)], 169,8 [C(6)], 177,8 [C(1'')].

4.6 Quantitative Bestimmungen

4.6.1 Nukleotide, Nukleoside sowie ausgewählte Derivate

Zur Bestimmung der 5'-Nukleotide, Nukleoside sowie ausgewählter Derivate werden in Abhängigkeit von den erwarteten Konzentrationen zwischen 100-500 mg Hefeextrakt genau eingewogen und in 100 mL Wasser gelöst. Nach Membranfiltration wird ein Aliquot der Lösung mit dem internen Standard [¹⁵N₅]-5'-AMP versetzt und anschließend mittels HPLC-MS/MS (siehe **Kapitel 4.7.7**) unter Verwendung der in **Tabelle 10** dargestellten Parameter analysiert.

Die Quantifizierung erfolgt über den internen Standard [¹⁵N₅]-5'-AMP.

Tabelle 10. Ausgewählte Massenübergänge sowie die optimierten Parameter zur quantitativen Analyse ausgewählter Nukleotide, Nucleoside sowie deren Derivate

Substanz (Nr.)	Massen- übergang	Massenverlust (amu)	DP ^a [V]	CE ^b [V]	CXP ^c [V]
5'-GMP (2)	362 → 211	151	-100	-26	-17
5'-IMP (3)	347 → 135	212	-100	-42	-7
5'-AMP (4)	346 → 134	212	-95	-42	-7
5'-XMP (5)	363 → 211	152	-85	-26	-11
5'-UMP (16)	323 → 97	226	-95	-34	-5
5'-CMP (17)	322 → 97	225	-75	-28	-5
[¹⁵ N ₅]-5'-AMP	351 → 97	254	-80	-32	-13
[¹⁵ N ₅]-5'-AMP	351 → 139	212	-80	-46	-7
Hypoxanthin	135 → 92	43	-70	-24	-5
Adenosylsuccinat	462 → 134	328	-80	-64	-7
Xanthin	151 → 108	43	-80	-24	-7
Inosin	267 → 135	132	-80	-30	-7
Guanosin	282 → 150	132	-80	-26	-9
3'-5'-cAMP (18)	328 → 134	194	-105	-36	-7
Adenosin	266 → 134	132	-75	-24	-1
2,5-Didesoxyadenosin	234 → 134	100	-85	-28	-1
2'-Desoxyadenosin	250 → 134	116	-95	-30	-7
2'-Desoxyadenosin-3'- monophosphat	330 → 195	135	-65	-20	-11

^a declustering potential. ^b collision energy. ^c cell exit potential.

4.6.2 Aminosäuren

Entsprechend den zu erwartenden Konzentrationen wird das Untersuchungsmaterial in Natriumcitratpuffer (0,2 M, pH 2,65) gelöst, membranfiltriert und, falls erforderlich, verdünnt. Die chromatografische Trennung erfolgt mittels Aminosäureanalysator (siehe **Kapitel 4.7.4**), die Detektion mittels photometrischer Messung nach Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin.

Die Quantifizierung erfolgt über externe Kalibration mit den Referenzsubstanzen.

4.6.3 Kationen

Zur Bestimmung der Kationen werden 300 mg Hefeextrakt genau eingewogen und in 100 mL

Wasser gelöst. Die resultierende Lösung wird membranfiltriert, anschließend 1:10 und 1:100 verdünnt und mittels HPIC (siehe **Kapitel 4.7.3**) analysiert.

Die Quantifizierung erfolgt über externe Kalibration mit den Referenzsubstanzen.

4.6.4 Anionen und organische Säuren

Die Analyse der Anionen und organischen Säuren erfolgt mittels HPIC (siehe **Kapitel 4.7.3**). Zur Herstellung der Probenlösung werden 300 mg Hefeextrakt präzise eingewogen, in 100 mL Wasser gelöst, membranfiltriert und 1:10 sowie 1:100 verdünnt.

Die Quantifizierung erfolgt über externe Kalibration mit den Referenzsubstanzen.

4.6.5 Kohlenhydrate und Polyole

Die Bestimmung der Kohlenhydrate und Polyole wird aus einer wässrigen Hefeextraktlösung mittels HPIC (siehe **Kapitel 4.7.3**) durchgeführt. Dazu werden 250 mg des Probenmaterials genau eingewogen, in 50 mL Wasser gelöst, membranfiltriert und für die Analyse 1:10 verdünnt.

Die Quantifizierung erfolgt über externe Kalibration mit den Referenzsubstanzen.

4.6.6 Glutamylpeptide

Für die quantitative Bestimmung der Glutamylpeptide werden in Abhängigkeit von den zu erwartenden Konzentrationen 200-400 mg Hefeextrakt exakt eingewogen und in 100 mL Wasser gelöst. Nach Membranfiltration wird ein Aliquot mittels HPLC-MS/MS (siehe **Kapitel 4.7.7**) unter Verwendung der in **Tabelle 11** dargestellten Parameter analysiert.

Die Quantifizierung erfolgt über externe Kalibration mit den Referenzsubstanzen.

Tabelle 11. Ausgewählte Massenübergänge sowie die optimierten Parameter zur quantitativen Analyse ausgewählter α - und γ -Glutamylpeptide

Substanz (Nr.)	Massen- übergang	Massenverlust (amu)	DP ^a [V]	CE ^b [V]	CXP ^c [V]
α -L-Glu-L-Gly	205 → 84	121	51	31	14
γ -L-Glu-L-Gly	205 → 84	121	51	31	14
α -L-Glu-L-Val	247 → 72	175	51	31	12
γ -L-Glu-L-Val	247 → 72	175	51	31	12
α -Glu-Ala	219 → 90	129	51	17	14
γ -L-Glu-L-Ala	219 → 90	129	51	17	14
α -L-Glu-L-Tyr	311 → 136	175	71	31	10

Substanz (Nr.)	Massen- übergang	Massenverlust (amu)	DP ^a [V]	CE ^b [V]	CXP ^c [V]
γ-L-Glu-L-Tyr	311 → 136	175	71	31	10
α-L-Glu-L-Glu	277 → 84	193	56	43	14
γ-L-Glu-L-Glu	277 → 84	193	56	43	14
α-L-Glu-L-Lys	276 → 147	129	66	17	12
γ-L-Glu-L-Lys	276 → 147	129	66	17	12
α-L-Glu-L-Gln	276 → 147	129	66	17	12
γ-L-Glu-L-Gln	276 → 147	129	66	17	12
α-L-Glu-L-Asp	263 → 134	129	56	23	10
α-L-Glu-L-Thr	249 → 120	129	51	23	8
α-L-Glu-L-Trp	334 → 188	146	61	33	14
γ-L-Glu-L-His	285 → 156	129	66	17	12
γ-L-Glu-L-Phe	295 → 166	129	71	19	12
γ-L-Glu-L-Met	279 → 150	129	61	21	12
γ-L-Glu-L-Leu	261 → 86	175	66	27	14

^a declustering potential. ^b collision energy. ^c cell exit potential.

4.6.7 Glutathion

Die Bestimmung von Glutathion (GSH) erfolgt nach vorheriger Derivatisierung mit *N*-Methyl-4-vinylpyridiniumiodid (*N*-MVP) mittels HPLC-MS/MS (siehe **Kapitel 4.7.7**).

Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes werden 50 mg *N*-Methyl-4-vinylpyridiniumiodid unmittelbar vor den Analysen frisch in 1 L Wasser gelöst. 40 mg Hefeextrakt werden präzise eingewogen, mit 10 mL der Reagenzlösung versetzt und bei Raumtemperatur 30 min gerührt. Die Lösung wird membranfiltriert und 1 mL anschließend mit dem internen Standard (40 µL, GSH-[²D₃]-*N*-MVP, 25,6 µg/mL) versetzt und ohne weitere Aufreinigung zur Analyse eingesetzt.

Die Quantifizierung erfolgt über den internen Standard GSH-[²D₃]-*N*-MVP.

Tabelle 12. Ausgewählte Massenübergänge sowie die optimierten Parameter zur quantitativen Analyse von Glutathion

Substanz (Nr.)	Massen- übergang	Massenverlust (amu)	DP ^a [V]	CE ^b [V]	CXP ^c [V]
GSH- <i>N</i> -MVP	427 → 120	307	91	35	8
GSH-[² D ₃]- <i>N</i> -MVP	430 → 123	307	86	39	8

^a declustering potential. ^b collision energy. ^c cell exit potential.

4.6.8 *N*²-modifizierte Nukleotide

Zur Quantifizierung der glykierten 5'-GMP-Derivate werden die Hefeextrakte exakt eingewogen und in Wasser gelöst (Endkonzentration etwa 10 mg/mL). Ein aliquoter Teil der Lösung wird nach Membranfiltration mit dem internen Standard (*R*)- und (*S*)-*N*²-[¹³C₃]- (1-Carboxyethyl)-5'-GMP versetzt. Die Analyse wird mittels HPLC-MS/MS (siehe **Kapitel 4.7.7**) unter Verwendung der in **Tabelle 13** dargestellten Parameter durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses der thermischen Behandlung auf die Bildung der 5'-GMP Transformationsprodukte werden Lösungen von Hefeextrakt 3 (500 mg) in Abwesenheit oder Gegenwart von 1,3-Dihydroxyaceton, D-Ribose, D-Glukose oder D-Maltose Monohydrat (jeweils 3 mmol) in Wasser (50 mL) hergestellt. Ein aliquoter Teil der Lösungen (1,5 mL) wird in Vials abgefüllt und für die vorgegebenen Zeiten (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h) erhitzt. Nach der Reaktion werden die Proben wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Die Quantifizierung erfolgt über die internen Standards (*R*)- und (*S*)-*N*²-[¹³C₃]- (1-Carboxyethyl)-5'-GMP (**21**).

Tabelle 13. Ausgewählte Massenübergänge sowie die optimierten Parameter zur Analyse ausgewählter *Maillard*-modifizierter Guanosin-5'-monophosphatderivate

Substanz (Nr.)	Massen- übergang	Massenverlust (amu)	DP ^a [V]	CE ^b [V]	CXP ^c [V]
<i>N</i> ² -(Carboxymethyl)-5'-GMP (26)	420 → 189	231	-50	-38	-18
<i>N</i> ² -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP (21)	434 → 336	98	-55	-22	-28
<i>N</i> ² -[¹³ C ₃]- (1-Carboxyethyl)-5'-GMP (21)	437 → 339	98	-45	-24	-28
<i>N</i> ² -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'- GMP (27)	464 → 234	230	-55	-46	-22
<i>N</i> ² -(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-5'- GMP (31)	478 → 380	98	-50	-26	-32
<i>N</i> ² -(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-	494 → 396	98	-70	-26	-34

Substanz (Nr.)	Massen- übergang	Massenverlust (amu)	DP ^a [V]	CE ^b [V]	CXP ^c [V]
5'-GMP (28)					
<i>N</i> ² -(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-5'-GMP (29)	524 → 79	445	-65	-66	-10
<i>N</i> ² -(β-D-Glukosyl)-5'-GMP (30)	524 → 79	445	-65	-66	-10
<i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -(1',3'-Dicarboxypropyl-amino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP (33)	563 → 204	359	-60	-52	-20

^a declustering potential. ^b collision energy. ^c cell exit potential.

4.7 Spektroskopische, spektrometrische und chromatographische Methoden

4.7.1 Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)

Pumpe	2 x C-605 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Pumpensteuerung	C-620 Control Unit (Büchi, Flawil, Schweiz)
Detektor	C-635 UV Photometer (Büchi, Flawil, Schweiz)
Fraktionssammler	C-660 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Probenaufgabe	Manuelle Injektion mit 20 mL Probenschleife
Säulenpackmodul	C-670 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Software	SepacoreControl Version 1.8.6.1 (Büchi, Flawil, Schweiz)

Trennbedingungen Hefeextrakte

Stationäre Phase	PP Kartusche (150 x 40 mm i.D. (Büchi, Flawil, Schweiz)), gefüllt mit LiChroprep [®] RP-18 Material (25-40 μm, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)		
Fluss	50 mL/min		
Detektionswellenlänge	λ = 260 nm		
Eluent	A: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Methanol		
Gradient	0 min	100 % A	0 % B
	5 min	100 % A	0 % B
	20 min	80 % A	20 % B
	35 min	0 % A	100 % B
	40 min	0 % A	100 % B

Trennbedingungen N^{β} -modifizierte Nukleotide

Stationäre Phase	PP Kartusche (150 x 40 mm i.D. (Büchi, Flawil, Schweiz)), gefüllt mit LiChroprep [®] RP-18 Material (25-40 μ m, Merck KGaA, Darmstadt)		
Fluss	40 mL/min		
Detektionswellenlänge	$\lambda = 260$ nm		
Eluent	A: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Methanol		
Gradient	0 min	100 % A	0 % B
	5 min	100 % A	0 % B
	60 min	0 % A	100 % B

4.7.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

System A: Analytische HPLC

Pumpe	PU-2080 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Degaser	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Gradientenmischer	LG-2080-02 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Detektor	MD-2010 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Probenaufgabe	AS-2055 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Interface	LC-Net II / ADC (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Software	ChromPass Version 1.8.6.1 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

Trennbedingungen Hefeextrakte (RP Bedingungen)

Stationäre Phase	Outstanding B C18 Säule, 250 x 4.6 mm i.D., 5 μ m (Trentec, Rutesheim, Deutschland)		
Fluss	1 mL/min		
Detektionswellenlänge	$\lambda = 260$ nm		
Eluent	A: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Acetonitril		
Gradient	0 min	100 % A	0 % B
	5 min	100 % A	0 % B
	15 min	95 % A	5 % B
	20 min	90 % A	10 % B
	30 min	70 % A	30 % B
	40 min	0 % A	100 % B
	45 min	0 % A	100 % B

55 min	100 % A 0 % B
60 min	100 % A 0 % B

Trennbedingungen Hefeextrakte (IP Bedingungen)

Stationäre Phase	Outstanding B C18 Säule, 250 x 4.6 mm i.D., 5 µm (Trentec, Rutesheim, Deutschland)	
Fluss	0,8 mL/min	
Detektionswellenlänge	$\lambda = 260$ nm	
Eluent	A: Triethylammoniumacetatpuffer (40 mM, pH 6,0) B: Methanol	
Gradient	0 min	97 % A 3 % B
	5 min	97 % A 3 % B
	30 min	60 % A 40% B
	37 min	0% A 100 % B
	40 min	0 % A 100 % B
	50min	97 % A 3 % B
	60 min	97 % A 3 % B

System B: Semipräparative und präparative HPLC

Pumpe	2 x PU-2087 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Degaser	Degasys DG-1310 (Uniflows Co., Tokyo, Japan)
Mischkammer	1000 µL (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Detektor	MD-2010 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Probenaufgabe	Typ 7725 i Injektionsventil (Rheodyne, Bensheim, Deutschland)
Interface	LC-Net II / ADC (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Software	Borwin Version 1.50 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

Trennbedingungen RP-MPLC Fraktion VI

Stationäre Phase	Monochrom MS Säule, 250 x 21.2 mm i.D., 5 µm (Varian, Darmstadt, Deutschland)	
Fluss	18 mL/min	
Detektionswellenlänge	$\lambda = 260$ nm	
Eluent	A: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Acetonitril	
Gradient	0 min	100 % A 0 % B
	10 min	100 % A 0 % B

25 min	95 % A	5 % B
30 min	90 % A	10 % B
35 min	60 % A	40 % B
40 min	60 % A	40 % B
45 min	100 % A	0 % B
55 min	100 % A	0 % B

Trennbedingungen RP-MPLC Fraktion VIII (RP Bedingungen) und Modellansätze

Stationäre Phase	Microsorb-MV C18 Säule, 250 x 21.2 mm i.D., 5 µm (Varian, Darmstadt, Deutschland)	
Fluss	18 mL/min	
Detektionswellenlänge	$\lambda = 260$ nm	
Eluent	A: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Acetonitril	
Gradient	0 min	100 % A 0 % B
	5 min	100 % A 0 % B
	15 min	95 % A 5 % B
	20 min	90 % A 10 % B
	30 min	70 % A 30 % B
	40 min	0 % A 100 % B
	45 min	0 % A 100 % B
	55 min	100 % A 0 % B
	60 min	100 % A 0 % B

Trennbedingungen RP-MPLC Fraktion VIII (IP Bedingungen)

Stationäre Phase	Microsorb-MV C18 Säule, 250 x 10 mm i.D., 5 µm (Varian, Darmstadt, Deutschland)	
Fluss	3,8 mL/min	
Detektionswellenlänge	$\lambda = 260$ nm	
Eluent	A: Triethylammoniumacetatpuffer (250 mM, pH 6,0) B: Methanol	
Gradient	0 min	97 % A 7 % B
	10 min	97 % A 7 % B
	30 min	75 % A 25 % B
	32 min	60 % A 40 % B
	40 min	93 % A 7 % B
	45 min	93 % A 7 % A

Trennbedingungen *N*⁶-(1-Carboxyethyl)-2'-desoxyguanosin

Stationäre Phase	Microsorb-MV C18 Säule, 250 x 21.2 mm i.D., 5 µm (Varian, Darmstadt, Deutschland)		
Fluss	15 mL/min		
Detektionswellenlänge	λ = 260 nm		
Eluent	A: Ammoniumformiatpuffer (5 mM, pH 7,0) B: Methanol		
Gradient	0 min	95 % A	5 % B
	5 min	95 % A	5 % B
	40 min	0 % A	100% B
	42 min	0% A	100 % B
	47 min	95 % A	5 % B
	50 min	95 % A	5 % B

Trennbedingungen Synthesen

Stationäre Phase	Microsorb-MV C18 Säule, 250 x 21.2 mm i.D., 5 µm (Varian, Darmstadt, Deutschland)		
Fluss	15 mL/min		
Detektionswellenlänge	λ = 260 nm		
Eluent	A: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Methanol		
Gradient	0 min	95 % A	5 % B
	5 min	95 % A	5 % B
	35 min	0 % A	100 % B
	37 min	0 % A	100 % B
	45 min	95 % A	5 % B
	50 min	95 % A	5 % B

4.7.3 High Performance Ion Chromatography (HPIC)

System A: Kationen

System	ICS-2000 RFIC (Dionex, Idstein, Deutschland)
Detektor	DS 6 Heated Conductivity Cell (Dionex, Idstein, Deutschland)
Probenaufgabe	AS-1 Autosampler (Dionex, Idstein, Deutschland)
Eluentengenerator	RFIC™ EluGen® ausgestattet mit einer EGC II MSA Kartusche (Dionex, Idstein, Deutschland)
Software	Chromeleon Version 6.80 (Dionex, Idstein, Deutschland)

Trennbedingungen Kationen

Stationäre Phase	IonPac [®] CS18, 250 x 2 mm (Dionex, Idstein, Deutschland); Vorsäule: IonPac [®] CG18, 50 x 2 mm (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Supressor	CSRS [®] 300 2-mm (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Injektionsvolumen	2 µL	
Fluss	0,3 mL/min	
Detektion	Leitfähigkeitsdetektion mit selbstregenerierenden Suppressor (AutoSuppression [®] recycle mode), Suppressorstrom 37 mA, Untergrundleitfähigkeit < 1 µS, Data collection rate 5,0 Hz	
Eluent	A: Methansulfonsäurelösung (5 mM in Wasser)	
Gradient	0 min	100 % A
	20 min	100 % A

System B: Anionen, organische Säuren, Kohlenhydrate und Polyole

System	ICS-2500 (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Pumpe	GS 50 (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Detektor	ED 50A Elektrochemischer Detektor (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Probenaufgabe	AS 50 Autosampler (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Säulenofen	AS 50 (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Software	Chromeleon Version 6.80 (Dionex, Idstein, Deutschland)	

Trennbedingungen Anionen und organische Säuren

Stationäre Phase	IonPac [®] AS11-HC, 250 x 2 mm (Dionex, Idstein, Deutschland); Vorsäule: IonPac [®] AG11-HC, 50 x 2 mm (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Supressor	ASRS [®] Ultra II 2-mm (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Injektionsvolumen	10 µL	
Fluss	0,38 mL/min	
Temperatur	30 °C	
Detektion	Leitfähigkeitsdetektion mit selbstregenerierenden Suppressor (AutoSuppression [®] recycle mode), Suppressorstrom 76 mA, Untergrundleitfähigkeit < 1 µS, Data collection rate 5,0 Hz	
Eluent	A: Entionisiertes Wasser	

B: Natriumhydroxidlösung (5 mM in Wasser)

C: Natriumhydroxidlösung (100 mM in Wasser)

Gradient	0 min	80 % A	20 % B	0 % C
	8 min	80 % A	20 % B	0 % C
	18 min	85 % A	0 % B	15 % C
	28 min	75 % A	0 % B	25 % C
	38 min	40 % A	0 % B	60 % C
	40 min	80 % A	20 % B	0 % C
	50 min	80 % A	20 % B	0 % C

Trennbedingungen organische Säuren mittels Ionenausschluss

Stationäre Phase	IonPac [®] ICE-AS6, 250 x 9 mm (Dionex, Idstein, Deutschland)		
Supressor	AMMS [®] ICE II (Dionex, Idstein, Deutschland)		
Injektionsvolumen	10 µL		
Fluss	1 mL/min		
Temperatur	20 °C		
Detektion	Leitfähigkeitsdetektion mit Suppressor, Regenerent: 5 mM Tetrabutylammoniumhydroxid in Wasser, Regenerentfluss: 5 mL/min, Untergrundleitfähigkeit < 20 µS, Data collection rate 5,0 Hz		
Eluent	A: Entionisiertes Wasser B: Heptafluorbuttersäurelösung (1 mmol/L in Wasser)		
Gradient	0 min	60 % A	40 % A
	30 min	60 % A	40 % A

Trennbedingungen Kohlenhydrate und Polyole

Stationäre Phase	CarboPac [®] MA1, 250 x 4 mm (Dionex, Idstein, Deutschland); Vorsäule: CarboPac [®] MA1, 50 x 4 mm (Dionex, Idstein, Deutschland)		
Injektionsvolumen	5 µL		
Fluss	0,4 mL/min		
Temperatur	30 °C		
Detektion	gepulste Amperometrie an einer Goldelektrode, Referenzelektrode: Ag/AgCl, Data collection rate 2,0 Hz		
Detektorwellenform	0,00 sec: 0,10 V; 0,20 sec: 0,10 V (Integrationsbeginn); 0,40 sec: 0,10 V (Integrationsende); 0,41 sec: -2,00 V;		

	0,42 sec: -2,00 V; 0,43 sec: 0,60 V; 0,44 sec: -0,10 V; 0,50 sec: -0,10 V
Eluent	A: Entionisiertes Wasser B: Natriumhydroxidlösung (2 mol/L in Wasser)
Gradient	0 min 76 % A 24 % A 70 min 76 % A 24 % A

4.7.4 Aminosäureanalysator (ASA)

System	Aminosäureanalysator Biochrom 30 (Ltd. Biochrom, Cambridge, UK)
Vorsäule	PEEK-Vorwaschsäule, Hydrolysat (10 x 4,6 mm, Ltd. Biochrom, Cambridge, UK) gefüllt mit Ultropac 8 Remaining Resin (Ltd. Biochrom, Cambridge, UK) Kationentauscherharz
Stationäre Phase	PEEK-Trennsäule, HP, LUFA (20 x 4,6 mm, Ltd. Biochrom, Cambridge, UK) gefüllt mit Ultropac 4 Remaining Resin (Ltd. Biochrom, Cambridge, UK) Kationenaustauscherharz
Fluss	35 mL/h
Injektionsvolumen	20 µL
Detektionswellenlänge	$\lambda = 440 \text{ nm}, 570 \text{ nm}$
Eluent	A: Natriumcitratpuffer (0,2 mol/L, pH 3,35) B: Natriumcitratpuffer (0,2 mol/L, pH 4,25) C: Natriumcitratpuffer (0,2 mol/L, pH 2,65) D: Natriumborat/-citratpuffer (0,5 mol/L, pH 8,6) E: Natriumhydroxidlösung (0,4 mol/L)
Gradient	C: 0-1 min, A: 1-16,3 min, B: 16,3-28,3 min, D: 28,3-30,3 min, D: 30,3-58,3 min, E: 58,3-62,3 min, C: 62,3-66,3 min
Temperaturgradient	53 °C: 0-16,3 min, 58 °C: 16,3-28,3 min, in 2 min auf 92 °C: 30,3-58,3 min, 8 min halten (Reaktionsschleife: 135 °C)

4.7.5 UV-VIS-Spektroskopie (UV)

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgt während der chromatographischen Trennungen mittels eines MD-2010 Plus Detektors (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) in den entsprechenden Eluenten, oder mit Hilfe eines J-810 Spektropolarimeters (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) im angegebenen Messpuffer.

4.7.6 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)

Messungen der CD-Spektren werden an einem J-810 Spektropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland), ausgestattet mit einer 0,1 cm Quartzküvette 106-QS (Hellma, Müllheim, Deutschland), durchgeführt. Die Spektren werden im Wellenlängenbereich von 220 bis 360 nm bei 20 °C durch Akkumulation von 16 Einzelmessungen (bandwidth 1 nm, scan speed 100 nm/min, D.I.T. 4 sec) erhalten. Als Lösungsmittel dient ein Phosphatpuffer (100 mmol/L, pH 7,5) der zuvor mindestens 30 min im Ultraschallbad behandelt wird um gelöste Gase zu entfernen, und anschließend durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert wird. Die Proben werden vor der Messung frisch gelöst, auf eine Konzentration von ~500 µmol/L verdünnt und erneut membranfiltriert. Nach Abzug des durch den Puffer hervorgerufenen Untergrundrauschens werden die Spektren mit Hilfe der Gerätesoftware bearbeitet. Umrechnung der gemessenen Elliptizität in die molare circular-dichroistische Absorption $\Delta\epsilon$ [$\text{cm}^2\cdot\text{mmol}^{-1}$] erfolgt mittels folgender Formel $\Delta\epsilon = \theta_{\text{obs}}/(32980\cdot c\cdot l)$, wobei θ_{obs} [mdeg] die gemessene Elliptizität, c [mol/L] die Konzentration der Probe, und l [cm] die Pfadlänge der Quartzküvette repräsentiert.

4.7.7 HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

System A: Nukleotide, Glutamylpeptide und Glutathion

System	1200er Serie (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Pumpe	G1312A (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Degaser	G1379B (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Probenaufgabe	G1329A Autosampler mit G1330B FC/ALS Therm (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Säulenofen	G1316A (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Massenspektrometer	4000 QTRAP [®] LC/MS/MS (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)
Software	Analyst Version 1.5.1 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)

Trennbedingungen Nukleotide

Stationäre Phase	TSK-Gel [®] Amide-80 (300 x 7,8 mm i.D., 10 µm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Deutschland)
Fluss	1 mL/min
Splitter	P-451 Micro Splitter (Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA)
Splitverhältnis	250 µL/min (in das MS) : 750 µL (in den Abfall)
Injektionsvolumen	25 µL
Eluent	A: Acetonitril/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v)

Experimenteller Teil

Gradient	0 min	75 % A	25 % B
	10 min	75 % A	25 % B
	40 min	50 % A	50 % B
	50 min	0 % A	100 % B
	60 min	0 % A	100 % B
	65 min	75 % A	25 % B
	75 min	75 % A	25 % B
Ionisation	Elektrospray Ionization (ESI)		
Polarität	negativ		
Modus	Multiple Reaction Monitoring Mode		

Trennbedingungen Glutamylpeptide

Stationäre Phase	TSK-Gel [®] Amide-80 (300 x 7,8 mm i.D., 10 µm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Deutschland)		
Fluss	1 mL/min		
Splitter	P-451 Micro Splitter (Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA)		
Splitverhältnis	250 µL/min (in das MS) : 750 µL (in den Abfall)		
Detektion	Multiple Reaction Monitoring Mode		
Injektionsvolumen	25 µL		
Eluent	A: Acetonitril/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v)		
Gradient	0 min	75 % A	25 % B
	10 min	75 % A	25 % B
	40 min	50 % A	50 % B
	45 min	0 % A	100 % B
	50 min	0 % A	100 % B
	55 min	75 % A	25 % B
	65 min	75 % A	25 % B
Ionisation	Elektrospray Ionization (ESI)		
Polarität	positiv		
Modus	Multiple Reaction Monitoring Mode		

Trennbedingungen Glutathion

Stationäre Phase	Monochrom MS (150 x 2 mm i.D., 5 µm, Varian, Darmstadt)		
Fluss	200 µL/min		
Detektion	Multiple Reaction Monitoring Mode		
Injektionsvolumen	5 µL		

Experimenteller Teil

Eluent	A: Acetonitril/Ameisensäure (99/1, v/v) B: Wasser/Ameisensäure (99/1, v/v)		
Gradient	0 min	0 % A	100 % B
	6 min	0 % A	100 % B
	16 min	100 % A	0 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	25 min	0 % A	100 % B
	35 min	0 % A	100 % B
Ionisation	Elektrospray Ionization (ESI)		
Polarität	positiv		
Modus	Multiple Reaction Monitoring Mode		

System B: 3200er

System	Kombination 1100er, 1200er Serie (Agilent, Waldbronn, Deutschland)		
Pumpe	1100-G1312A (Agilent, Waldbronn, Deutschland)		
Degaser	1100-G1379A (Agilent, Waldbronn, Deutschland)		
Probenaufgabe	1200-G1329A Autosampler mit 1200-G1330B FC/ALS Therm (Agilent, Waldbronn, Deutschland)		
Massenspektrometer	API 3200™ LC/MS/MS (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)		
Software	Analyst Version 1.5.1 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)		

Trennbedingungen N^2 -glykierte Nukleotide

Stationäre Phase	Luna PFP (150 x 2 mm i.D., 3 µm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)		
Fluss	200 µL/min		
Injektionsvolumen	5 µL		
Eluent	A: Acetonitril/Ameisensäure (99,9/0,1, v/v) B: Wasser/Ameisensäure (99,9/0,1, v/v)		
Gradient	0 min	3 % A	97 % B
	3 min	3 % A	97 % B
	25 min	100 % A	0 % B
	27 min	100 % A	0 % B
	37 min	3 % A	97 % B
	45 min	3 % A	97 % B
Ionisation	Elektrospray Ionization (ESI)		
Polarität	negativ		

Modus

Multiple Reaction Monitoring Mode

4.7.8 Time of Flight Massenspektrometrie (TOF-MS)

Die Bestimmung der exakten Massen erfolgt an einem Bruker micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Die Proben werden mit Hilfe einer Spritzenpumpe (KD Scientific Inc., Holliston, USA) bei einem Fluss von 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das Massenspektrometer transferiert und mittels Elektronensprayionisation in entsprechend geladene Ionen überführt. Die Referenzierung erfolgt intern gegen Natriumformiat (5 mM), die Datenauswertung mit Hilfe der Daltonics Data Analysis Software Version 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland).

4.7.9 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der NMR Spektren erfolgt entweder an einem 400 MHz DRX 400 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Gerät ausgestattet mit einem QNP 1H/14N/13C/31P Z-GRD Probenkopf (Bruker, Rheinstetten, Deutschland), oder an einem 500 MHz Avance III (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) Gerät ausgestattet mit einem Cryo Probe TCI Probenkopf (Bruker, Rheinstetten, Deutschland), jeweils bei 298 K. Die Proben werden in den angegebenen deuterierten Lösungsmitteln gelöst und vor der Messung in NMR Röhrchen gefüllt. Weisen die Substanzen eine schlechte Löslichkeit unter sauren Bedingungen auf, werden zur Messung Lösungsmittelgemische von 750 μL des entsprechenden deuterierten Solvens und 10 μL einer 40 %-igen Lösung von Natriumdeuteroxid in D_2O verwendet, wobei eventuell weitere Lauge zugegeben wird, um ein vollständiges Lösen der Probe zu gewährleisten. Während zum Prozessieren der Daten TopSpin™ Version 1.3 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) verwendet wird, erfolgt die individuelle Interpretation der Spektren mittels MestReNova 5.1.0-2940 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spanien). Die Referenzierung der Signale erfolgt auf TMS bzw. TMSP als interne Referenz.

4.7.9.1 ^1H -NMR

Die ^1H -NMR-Spektren dienen zum einen zur Bestimmung der Protonenzahl, weiterhin zur Ermittlung der chemischen Verschiebung (δ , in ppm) bezogen auf TMS oder TMSP sowie zur Ermittlung der Kopplungskonstanten (J , in Hz) benachbarter Protonen. Finden protische Lösungsmittel Verwendung wird ausschließlich die Anzahl kohlenstoffgebundener Protonen ermittelt.

4.7.9.2 ^{13}C -NMR

Aus den ^{13}C -NMR-Spektren werden Anzahl und chemische Natur der im Molekül enthaltenen Kohlenstoffatome bestimmt. Die Messungen erfolgen unter ^1H -Breitbandentkopplung um heteronukleare J -Kopplungen zu unterdrücken und das Signal-Rausch Verhältnis zu verbessern.

4.7.9.3 ^{13}C -DEPT-(135°)-NMR

Beim DEPT-Experiment (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) handelt es sich um eine Polarisationstransfer-Technik, welche die hohe Polarisation und die kurzen Relaxationszeiten der ^1H -Atome ausnützt. Durch Anwendung entsprechender Pulsfrequenzen resultiert das Experiment in separaten ^{13}C -Subspektren für Methyl-, Methylen- und Methinsignale. Unter Verwendung eines 135° Pulswinkels für den finalen ^1H -Puls, erhält man Signale mit positiver Orientierung für CH- und CH_3 -Gruppen und negativer Orientierung für CH_2 -Gruppen, während quartäre Kohlenstoffatome nicht beobachtet werden.

4.7.9.4 gradient selected Correlation Spectroscopy (gsCOSY)

Durch eine Reihe von Messungen, bei denen zwei 90° Pulse durch inkrementell veränderte Wartezeiten getrennt sind, werden $^1\text{H}, ^1\text{H}$ korrelierte 2D Spektren erhalten. Im 2D Konturprogramm erhält man auf beiden Achsen die Abbildung des ^1H -NMR, wobei Kopplungen zwischen geminalen und vicinalen Protonen als Kreuzsignale erkennbar sind, die sich nicht auf der Diagonalen befinden, die von der Restmagnetisierung der individuellen Kerne und nicht von Kopplungen chemisch diverser Kerne herrühren.

4.7.9.5 Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)

Mit Hilfe einer speziellen Pulsabfolge wird zunächst eine Übertragung der Protonen Magnetisierung auf die benachbarten Kohlenstoffkerne bewirkt, die nach einer inkrementellen Entwicklungsphase wiederum auf die Protonen transferiert wird. Es wird ein 2-dimensionales korreliertes Spektrum erhalten, das auf der x-Achse eine Projektion des ^1H -NMR und auf der y-Achse ein breitbandentkoppeltes ^{13}C -Spektrum zeigt. Bei kohlenstoffgebundenen Protonen ist im 2D-Plot ein Kreuzsignal zu verzeichnen, über das eine direkte Zuordnung der Verschiebung des Bindungskohlenstoffs möglich ist. Quartäre Kohlenstoffatome werden in diesem Experiment nicht detektiert.

4.7.9.6 Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC)

Beim verwendeten Experiment handelt es sich um ein phasensensitives HSQC, das die Eigenschaften des HMQC und DEPT Experiments kombiniert. Es wird eine

zweidimensionale Projektion erhalten, die sowohl die C,H-Kopplungen über eine Bindung zeigt sowie die Phase der entsprechenden Kohlenstoffatome, die im Plot farblich unterscheidbar gemacht wird. Auch in diesem Experiment werden quartäre Kohlenstoffatome nicht erfasst.

4.7.9.7 Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC)

Das HMBC-Experiment stellt eine modifizierte Version des HMQC Experiments dar, wobei heteronukleare ^1H , ^{13}C -Kopplungen über mehrere Bindungen (v.a. $^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$, $^4J_{\text{C,H}}$) detektiert werden, während geminale Kopplungen unterdrückt werden. Folglich bietet dieses Experiment die Möglichkeit ebenfalls quartäre Kohlenstoffkerne zu detektieren, falls diese über mehrere Bindungen mit einem Proton koppeln.

4.8 Humansensorische Analysen

Die Durchführung der sensorischen Experimente erfolgt in kommerziell erhältlichem, mineralstoffarmen Wasser (Evian®), das auf pH 6,0 eingestellt wird. Generell werden zur Einstellung der pH-Werte für die sensorischen Untersuchungen Ameisensäure (1 % in Wasser) oder wässrige Natriumhydroxidlösung (0,1 mol/L, 1 mol/L) verwendet. Das Sensorikpanel setzt sich aus bis zu 12 Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik (Technische Universität München) zusammen, die zuvor ihre Bereitschaft zur Teilnahme an den sensorischen Evaluierungen erklärt haben, keine bekannten Störungen der Geschmackswahrnehmung besitzen und mit den angewandten Techniken wie z.B. dem Triangeltest vertraut sind. Die Panelisten werden gebeten mindestens 30 min vor Beginn der Sitzung, die in einem Sensorikraum bei Raumtemperatur stattfindet, auf Essen und Trinken, mit Ausnahme von Mineralwasser, zu verzichten. Um retronasale Empfindungen zu unterdrücken wird bei allen Experimenten, mit Ausnahme der *Time-Intensity*-Messungen (siehe **Kapitel 4.8.8**), eine Nasenklammer verwendet. Zur Schulung der sensorischen Fähigkeiten, wird das Panel in regelmäßigen Abständen mit den in **Tabelle 14** angegebenen Lösungen in der Wahrnehmung der Grundgeschmacksarten sowie der Adstringenz und des Kokumigeschmacks trainiert.

Zur Differenzierung unterschiedlicher Umamigeschmacksqualitäten wird das Panel mit Lösungen von Mononatrium-L-Glutamat (3 mmol/L) für das flache glutamat-artige umami, Dinatriumsuccinat (5 mmol/L) für das säuerliche carbonsäure-artige umami und einer binären Mischung aus Mononatrium-L-Glutamat (3 mmol/L) und Guanosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz (0,1 mmol/L) für das volle, lang anhaltende nukleotid-artige umami vertraut gemacht.

Tabelle 14. Zur sensorischen Schulung der Grundgeschmacksarten verwendete Substanzen, sowie die verwendeten Konzentrationen der Lösungen

Geschmacksqualität	Substanz	Konzentration
Süß	Saccharose	50 mmol/L
Sauer	Milchsäure	20 mmol/L
Salzig	Natriumchlorid	20 mmol/L
Bitter	Koffein	1 mmol/L
Umami	Mononatrium-L-Glutamat	3 mmol/L
Rauh-adstringierend	Tannin	0,05 g/100 g
Samtig-adstringierend	Quercitin-3-O- β -D-galactopyranosid	0,01 mmol/L
Kokumi	Glutathion ^a	5 mmol/L

^a appliziert in einer Modellbrühe, bestehend aus Hefeextrakt, Maltodextrin, Mononatrium-L-Glutamat und Natriumchlorid

4.8.1 Geschmacksprofilanalysen

Zur Aufnahme von Geschmacksprofilen der einzelne Hefeextrakte werden diese in Wasser gelöst (1 g/100 mL) und der pH-Wert der erhaltenen Lösung auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend werden die Sensorikteilnehmer gebeten die wahrgenommenen Geschmackseindrücke für süß, sauer, salzig, bitter, adstringierend und umami auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) zu bewerten.

4.8.2 Erstellen und sensorische Beurteilung von Rekombinaten

Zur Erstellung der Hefeextrakt Rekombinate werden die in **Tabelle 15** aufgeführten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen in Wasser gelöst. Der pH-Wert der resultierenden Lösungen wird mit Ameisensäure auf 6,0 eingestellt. Die Verkostung erfolgt im Vergleich mit den entsprechenden wässrigen Lösungen der Hefeextrakte (1 g/100 mL), wobei die sensorischen Attribute auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet werden.

Tabelle 15. Zusammenfassung der in den Hefeextraktrekombinaten eingesetzten Verbindungen

Substanz	Rekombinat 1	Rekombinat 2
	Konzentration [mg/L]	Konzentration [mg/L]
Mononatrium-L-Aspartat Monohydrat	249,6	136,2
Mononatrium-L-Glutamat (1) Monohydrat	764,0	598,8
5'-AMP (4) Monohydrat	0,2	13,4
3'-5'-cAMP (18)	2,4	11,2

Experimenteller Teil

Substanz	Rekombinat 1 Konzentration [mg/L]	Rekombinat 2 Konzentration [mg/L]
5'-GMP (2) Dinatriumsalz	---	9,0
5'-UMP	0,2	5,4
5'-CMP (17) Dinatriumsalz	---	4,1
5'-XMP (5) Dinatriumsalz	2,5	0,8
5'-IMP (3)	0,5	---
Dinatriumsuccinat	65,9	81,1
α -Glu-Glu	---	1,2
L-Alanin	311,9	305,0
Glycin	125,7	80,2
L-Serin	199,4	141,1
L-Threonin	279,8	207,1
L-Prolin	83,9	61,6
L-Methionin	74,0	63,2
Glycerin	7,4	59,1
D-Glukose	147,6	106,2
L-Phenylalanin	198,8	152,3
L-Tyrosin	28,6	29,5
L-Leucin	334,6	264,4
L-Isoleucin	189,8	137,0
L-Histidin	106,2	70,5
L-Arginin	149,6	92,9
L-Valin	228,4	184,4
L-Lysin	179,1	102,7
Xanthin	16,1	10,6
Hypoxanthin	0,8	3,5
Inosin	1,7	2,5
Adenosin	70,3	43,0
Guanosin	11,3	9,8
Natriumchlorid	1306,9	1377,6
Kaliumchlorid	524,8	601,0
Ammoniumchlorid	57,7	59,5
Magnesiumchlorid	85,4	30,5
Calciumchlorid	47,1	48,2
Dinatriumhydrogenphosphat	478,1	390,4
Natriumhydroxid	23,1	19,3

Substanz	Rekombinat 1 Konzentration [mg/L]	Rekombinat 2 Konzentration [mg/L]
γ -Glu-Leu	7,3	5,0
γ -Glu-Val	6,3	3,7
γ -Glu-Ala	0,7	0,6
γ -Glu-Lys	0,4	0,4
γ -Glu-Gln	0,3	0,2
γ -Glu-Phe	0,3	0,2
Glutathion	11,1	11,0
Natriumacetat	90,2	148,4
Trinatriumcitrat Dihydrat	46,3	---
Natrium-L-Laktat	16,2	28,5

4.8.3 Vergleichende Geschmacksprofilanalysen

Um den geschmacksmodulierenden Einfluss der Verbindungen in RP-MPLC Fraktion VI zu untersuchen werden diese einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse unterzogen. Dazu wird der nach der Gefriertrocknung erhaltene Rückstand in einer Mononatrium-L-Glutamatlösung (1, 8 mL, 3 mmol/L, pH 6,0) aufgenommen und sensorisch mit der reinen Matrixlösung verglichen. Die wahrgenommene Umamiintensität wird auf einer linearen Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet, wobei der reinen MSG (1)-Lösung ein Wert von 1 zugeordnet wird.

4.8.4 Schwellenwertsbestimmung

Die Bestimmung der Geschmacksschwellenwertkonzentration erfolgt mittels Triangeltest. Dazu wird der zu untersuchende Geschmacksstoff in Wasser (10 mL) gelöst, und schrittweise 1+1 mit Wasser verdünnt. Die Probelösungen werden, zusammen mit jeweils zwei Blindproben die lediglich Wasser enthalten, dem Teilnehmer gereicht und dieser wird angewiesen die geschmacklich abweichende Probe zu markieren sowie deren Geschmacksqualität zu vermerken. Die Degustation erfolgt in Reihenfolge steigender Konzentrationen.

Um zufällig korrekte Antworten auszuschließen, gilt erst diejenige als richtig erkannte Probe, ab der alle weiteren Proben der Verdünnungsreihe richtig erkannt werden. Die Berechnung der Schwellenwertkonzentration erfolgt über das geometrische Mittel (ASU: L 00.90-9,1999).

4.8.5 Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA)

Die von *Frank et al. (2001)* ^[62] entwickelte Geschmacksverdünnungsanalyse bezeichnet ein humansensorisches Screeningverfahren zur Differenzierung stark geschmacksaktiver Substanzen von weniger geschmacksaktiven bzw. geschmacklosen Verbindungen und dient dazu die Isolierung und Strukturaufklärung auf die Schlüsselgeschmacksstoffe in einer komplexen Matrix zu konzentrieren. Dazu werden die mittels flüssigchromatographischer Techniken erhaltenen Fraktionen zunächst vom organischen Lösungsmittel befreit und nach Lyophilisation in einer definierten Menge Sensorikwasser (10 mL, pH 6,0) aufgenommen. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wird auf pH 6,0 eingestellt und diese anschließend sukzessive 1+1 mit Wasser verdünnt. Die Verdünnungsreihe wird in Reihenfolge steigender Konzentration dem Panelisten gereicht. Dieser wird angewiesen die Lösungen zu markieren die einen sensorischen Unterschied zur Blindlösung aufweisen. Die Verdünnungsstufe bei dem das Sensorikpanel gerade noch einen Unterschied zur Referenz wahrnehmen kann wird als Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) bezeichnet.

4.8.6 Matrixsimulierende Geschmacksverdünnungsanalyse (mGVA)

Die matrixsimulierende Geschmacksverdünnungsanalyse stellt eine Modifikation der klassischen GVA dar und dient zur Identifizierung und sensorischen Beurteilung von geschmacksmodulierenden bzw. geschmacksverstärkenden Verbindungen. Im Gegensatz zur GVA werden im Falle des *Screenings* nach Umamimodulatoren die Fraktionen nicht in Wasser, sondern in einer Lösung von Mononatrium-L-Glutamat (**1**) in Sensorikwasser (10 mL, 3 mmol/L, pH 6,0) aufgenommen, der pH-Wert der erhaltenen Lösung auf pH 6,0 eingestellt, und diese schrittweise 1+1 durch Zugabe weiterer Glutamatlösung verdünnt. Der Panelist wird gebeten die Lösungen zu kennzeichnen die im Vergleich zur reinen Glutamatlösung als Kontrolle einen verstärkten Umamigeschmack aufweisen. Im Vergleich zur komparativen GVA, bei der das Verhältnis von Agonist und Modulator konstant bleibt, wird bei der mGVA die modulierende Fraktion bis zur Inaktivität verdünnt, während die Konzentration des Agonisten konstant bleibt.

4.8.7 Bestimmung der umamiverstärkenden Eigenschaften

In Anlehnung an *Yamaguchi et al. (1971)* ^[18] erfolgt die Bestimmung der geschmacksverstärkenden Eigenschaften ausgewählter Nukleotidderivate in Gegenwart von Mononatrium-L-Glutamat (MSG, **1**) durch eine paarweise Vergleichsprüfung. Dazu wird zunächst eine binäre Lösung des zu testenden Nukleotids (0,05 mmol/L) und **1** (3 mmol/L) in Sensorikwasser (pH 6,0) hergestellt. Diese so genannte „fixed sample“ Lösung wird den Panelisten paarweise mit Vergleichslösungen („reference samples“) dargereicht, die eine

konstante Konzentration an Agonist aufweisen (**1**, 3 mmol/L) aber steigende Konzentrationen an Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP, **3**) als Synergist. Die Konzentration des Synergisten wird ansteigend in logarithmisch gleichen Abständen (30 % Intervalle) gewählt. In den jeweiligen Sensoriksitzungen wird der Teilnehmer aufgefordert für jeweils fünf Probenpaare, die in zufällig kodierten Polypropylenbechern präsentiert werden, diejenige Probe zu bestimmen die den stärkeren Umamigeschmack aufweist. Die sensorische Evaluierung erfolgt unter „forced choice“ Bedingungen. Die erhaltenen Rohdaten werden zunächst in den prozentualen Anteil der positiven Antworten umgerechnet, wobei eine Bewertung als positiv gewertet wird wenn die „fixed sample“ den stärkeren Umamigeschmackseindruck aufweist. Unter Anwendung der *Probit*-Methode wird die 5'-IMP (**3**) Konzentration am Punkt äquivalenten Umamigeschmacks (50 % Wert) bestimmt. Der β -Wert für das jeweilige Nukleotid, relativ zu **3** als Referenzsubstanz, wird nach folgender Formel berechnet: $v = \beta \cdot v'$, wobei v die 5'-IMP (**3**) Konzentration am Punkt äquivalenten Umamigeschmacks [mmol/L] und v' die Konzentration des getesteten Nukleotids [mmol/L] darstellt.

4.8.8 Bestimmung von Zeit-Intensitäts-Verläufen

Für die Bestimmung der zeitlich aufgelösten Intensitätsverläufe ausgesuchter Nukleotidderivate wird ein reduziertes sensorisches Panel, bestehend aus vier weiblichen und einem männlichen Subjekt im Alter zwischen 22 und 29 Jahren eingesetzt.

Um die Teilnehmer sowohl mit dem experimentellen Ablauf, als auch mit dem Zeit-Intensitäts-Modul der Sensoriksoftware (FIZZ, Biosystemes, Couternon, Frankreich) vertraut zu machen wird wiederholt der zeitliche Verlauf der Umamigeschmacksintensität einer wässrigen, binären Mischung aus Guanosin-5'-monophosphat (**2**, 0,05 mmol/L) und Mononatrium-L-Glutamat (**1**, 3 mmol/L) aufgezeichnet.

Die zu evaluierende Lösung (10 mL) wird den Teilnehmern in zufällig kodierten Polypropylen Bechern gereicht. Anschließend werden diese gebeten die gesamte Lösung in den Mundraum zu überführen und für 5 sec zu zirkulieren bevor diese ausgespuckt wird. Die wahrgenommene Umamigeschmacksintensität wird auf einer horizontalen Skala, die am linken Ende mit „nicht detektierbar“ und am rechten Ende mit „stark detektierbar“ verankert ist, mittels Mauszeiger bewertet. Die Datenaufzeichnung (Zeit zwischen Datenpunkten: 100 ms) beginnt sofort nachdem die Lösung in den Mund geführt wird und stoppt entweder nachdem die wahrgenommene Intensität „nicht detektierbar“ erreicht hat, oder nach maximal 245 sec.

Um die verschiedenen Zeit-Intensitäts-Verläufe für die Nukleotidderivate im Vergleich zur Ausgangsverbindung zu evaluieren werden wässrige Lösungen von Mononatrium-L-Glutamat (**1**, 3 mmol/L) und den folgenden Substanzen wie oben beschrieben evaluiert: Guanosin-5'-monophosphat (**2**) , (*S*)-*N*²-(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**S**)-

21), (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**S**)-**32**) und (*S*)-*N*²-((1-(*N*-Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-guanosin-5'-monophosphat ((**S**)-**41**).

Die Analyse der Daten und die Berechnung der Durchschnittskurven für das gesamte sensorische Panel erfolgt mit Hilfe des Auswertemoduls der Sensoriksoftware (FIZZ, Biosystemes, Couternon, Frankreich).

4.9 Umamirezeptorstudien

Sämtliche Studien zur Rezeptoraktivierung durch die isolierten Umamigeschmacksverstärker wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE), Potsdam-Rehbrücke in Kooperation mit Prof. Dr. W. Meyerhof und Dr. A. Brockhoff durchgeführt.

Die Experimente werden in der menschlichen, embryonischen Nierenzelllinie PEAK^{Rapid} (American Type Culture Collection, Manassas, USA), die die Umamirezeptorunterheit hT1R1 und die G-Protein-Untereinheit mGα15 stabil exprimiert, durchgeführt. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Feuchte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose GlutaMAX[™] (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), versetzt mit FCS (10 %, Tetrazyklin-frei), Penicilin G (10000 Units/mL), und Streptomycin (10 mg/mL), kultiviert. Die Selektion der hT1R1 und mGα15 stabil exprimierenden Zellen erfolgt mit Hilfe von G418 (50 µg/mL, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Zeocin (100 µg/mL, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Hygromycin (100 µg/mL, Invitrogen, Karlsruhe) und Puromycin (1,0 µg/mL, Sigma-Aldrich, Deutschland).

Für die funktionellen Experimente werden die Zellen in 96-well Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gesät, die zuvor mit poly-D-Lysin (10 µg/mL, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) beschichtet werden um eine bessere Zelladhäsion zu gewährleisten. Zur Expression des Umamirezeptors werden die Zellen mit der Untereinheit rT1R3 (in pcDNA3, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mittels Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in Serum-freiem DMEM Low Glucose GlutaMAX[™] Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) transfiziert. Anschließend werden die Zellen für 24 Stunden in DMEM Low Glucose GlutaMAX[™] mit dialysierten, Tetrazyklin-freiem FCS kultiviert.

Vor den Experimenten werden die Zellen für eine Stunde mit Fluo4-AM (2 µmol/L, Molecular Probes) in Serum-freiem DMEM Low Glucose GlutaMAX[™] beladen. Dabei wird dem Medium 2,5 mM Probenicid zugesetzt um die Leckage des Fluoreszenzfarbstoffes zu hemmen. Die Zellen werden dreimal mit Puffer (130 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L Glucose, pH 7,4) gewaschen und bei Raumtemperatur inkubiert um eine vollständige Deesterifizierung des Farbstoffes zu bewirken. Die Testsubstanzen

werden in der Pufferlösung gelöst. Im Falle von Co-Applikationsexperimenten werden die Substanzen vor der Applikation auf die Zellen vermischt.

Unter Verwendung eines fluorimetrischen Plattenlesegerätes (FLIPR³⁸⁴, Molecular Devices, München, Deutschland) wird die Fluoreszenzveränderung infolge der Calciumfreisetzung der transfizierten Zellen während der Substanzapplikation aufgezeichnet. Die Zellanzahl sowie die Vitalität werden durch anschließende Applikation von Isoproterenol (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) überprüft. Um unspezifische Zellantworten auszuschließen werden Zellen, die zuvor mit einem leeren Vektor (Mock-Transfektion) transfiziert wurden, als Kontrolle mitgeführt.

Die Daten werden in drei unabhängigen Serien gesammelt, wobei jeweils entweder Vierfach- oder Dreifachbestimmungen (*Dose-response*) durchgeführt werden. Die Fluoreszenzsignale der hT1R1/rT1R3-exprimierenden Zellen werden um das Signal der Mock-transfizierten Zellen reduziert (Software FLIPR³⁸⁴, Molecular Devices, München, Deutschland) und auf die Basislinienfluoreszenz normalisiert ($\Delta F/F$, SigmaPlot 9.01, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Für die Berechnung der *Dose-response* Kurven werden die $\Delta F/F$ -Werte halblogarithmisch gegen die Konzentration der Testsubstanz geplottet. Der EC_{50} -Wert, der die Konzentration des Agonisten darstellt bei der eine halbmaximale Antwort erzeugt wird, wird nach nicht-linearer Regression mittels der folgenden sigmoidalen Funktion berechnet ($f(x) = \min + (\max - \min) / (1 + [x / EC_{50}]^{\text{Hillslope}})$).

Die Fluoreszenzsignale bei Co-Applikation der Testverbindungen mit L-Glutaminsäure werden auf statistische Signifikanz im Vergleich zur reinen Applikation der Aminosäure mittels Varianzanalyse (one-way), gefolgt von einem Tukey's post-hoc means comparison Test mit 5 % alpha-Risiko Level (GraphPad Prism 4.03, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) geprüft.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer geschmacksverstärkenden Eigenschaften finden Hefeextrakte bei der Herstellung von *Convenience*-Produkten weltweit breite Anwendung. Die eingeschränkte Kenntnis der Inhaltsstoffe, die die sensorische Aktivität von Hefeextrakten ursächlich prägen, limitiert die prozesstechnische Optimierung der Hefeprodukte im Hinblick auf eine gezielte Erhöhung der umamigeschmacksverstärkenden Wirkung.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst durch Kombination moderner instrumentell-analytischer Verfahren und humansensorischer Arbeitstechniken die Unterschiede im Umamigeschmack zweier handelsüblicher Hefeextrakte auf molekularer Ebene zu definieren. Nach quantitativer Bestimmung der literaturbekannten Geschmacksstoffe konnten durch biomimetische Rekombinationsexperimente alle relevanten Sensometabolite erfolgreich verifiziert werden. Dabei zeigte sich insbesondere die herausragende Bedeutung der Purin-5'-nukleotide, die durch ihren geschmacksverstärkenden Effekt auf Mononatrium-L-Glutamat (MSG) in der Lage waren bereits in niedrigen Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf den Gesamtgeschmack der Extrakte zu nehmen.

Um Erkenntnisse über bislang unbekannte, geschmacksmodulierende Verbindungen zu erlangen, wurde im zweiten Teil der Arbeit ein besonders nukleotidreicher Hefeextrakt einer aktivitätsorientierten Fraktionierung unterzogen. Durch Anwendung chromatographischer Trennverfahren in Kombination mit der Geschmacksverdünnungsanalyse, einem Screeningverfahren zur Lokalisierung sensorisch aktiver Verbindungen, konnten erstmals Cytidylyl-(5'→3')-uridin-5'-monophosphat und Uridylyl-(5'→3')-cytidin-5'-monophosphat als bislang unbekannte geschmacksmodulierende Dinukleotide im Hefeextrakt identifiziert werden. Darüber hinaus gelang es ein modifiziertes Guanosin-5'-monophosphatderivat zu isolieren, das mittels LC-MS/MS, LC-TOF-MS, 1D/2D-NMR als N^{β} -(1-Carboxyethyl)-guanosin-5'-monophosphat identifiziert werden konnte. Modellstudien zeigten die Bildung dieser Verbindung aus Guanosin-5'-monophosphat (5'-GMP) und 1,3-Dihydroxyaceton bzw. DL-Glycerinaldehyd. Die absolute Stereochemie der (*R*)- und (*S*)-Diastereomeren wurde mittels CD-Spektroskopie eindeutig zugeordnet. Erste sensorische Untersuchungen ergaben, dass beide Diastereomere einen intrinsischen Umamigeschmack mit Schwellenwerten von 0,19 mmol für das (*S*)- und 0,85 mmol/L für das (*R*)-Isomer aufwiesen. Zudem unterschieden sich beide Isomere im verstärkenden Effekt auf den Umamigeschmack von MSG, wobei erneut die (*S*)-Konfiguration eine höhere Aktivität zeigte.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden systematische Studien zur strukturellen Modifikation von 5'-GMP durch Kohlenhydrate verschiedener Kettenlänge durchgeführt. Neben der Isolierung diverser (*R*)-/(*S*)- N^{β} -(1-Carboxyalkyl)-guanosin-5'-monophosphate

gelang es darüber hinaus in Reaktionsansätzen von 5'-GMP, 1,3-Dihydroxyaceton und einem Überschuss an *n*-Propylamin bzw. MSG die entsprechenden (*R*)-/(*S*)-*N*^ℓ-(1-Alkylamino)carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate zu generieren und in deren Struktur aufzuklären. In folgenden sensorischen Untersuchungen wurden auf Basis eines paarweisen Vergleichstests sogenannte β-Werte als Maß für die geschmacksverstärkenden Eigenschaften dieser Verbindungen im Vergleich zu Inosin-5'-monophosphat (5'-IMP) bestimmt. In Abhängigkeit der Struktur lagen diese β-Werte im Bereich von 0,1 bis 7,0, wobei sowohl ein Einfluss der Stereochemie, als auch der Kettenlänge des *N*^ℓ-Substituenten beobachtet werden konnte. Bei allen untersuchten Verbindungen zeigte das (*S*)-konfigurierte Isomer einen ausgeprägteren Effekt, während die (*R*)-Isomere sich als nahezu inaktiv erwiesen, was auf eine hohe Stereoselektivität der Rezeptorbindungsstellen hindeutete. Als besonders aktive Strukturen erwiesen sich dabei (*S*)-*N*^ℓ-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP und (*S*)-*N*^ℓ-((1-(*N*-Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP mit β-Werten von 7,0 und 6,0. Dabei zeichnete sich das unpolare Alkylamid zusätzlich durch einen lang anhaltenden Umamieffekt aus.

Zur quantitativen Bestimmung ausgewählter Nukleotidderivate in verschiedenen Hefeextraktproben wurde [¹³C₃]-isotopenmarkiertes *N*^ℓ-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP als interner Standard synthetisiert und eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) entwickelt. Mittels HPLC-MS/MS gelang es eine Abhängigkeit der ermittelten Werte an glykierten Derivaten von den vorhandenen Mengen des freien Nukleotids 5'-GMP im Ausgangsprodukt aufzuzeigen. Darüber hinaus wurden die Gehalte an glykierten Nukleotiden in Reaktionsaromen auf Basis von Hefeextrakten bestimmt. Dabei zeigte sich, dass eine Hitzebehandlung in Gegenwart zugegebener Kohlenhydratquellen zu einer ausgeprägten Bildung der umamiverstärkenden Nukleotidtransformationsprodukte führte.

Für Struktur-Wirkungs-Untersuchungen innerhalb der Reihe der (*R*)-/(*S*)-*N*^ℓ-(1-Alkylamino)-carbonylalkyl)-guanosin-5'-monophosphate wurde im Folgenden *N*^ℓ-(1-Carboxyethyl)-5'-GMP in wässriger Lösung mit Aminen in Gegenwart von *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid als Kopplungsreagenz zu den entsprechenden Säureamiden umgesetzt und diese nach Reinigung sowohl für humansensorische Studien als auch hT1R1/rT1R3 Umamirezeptorstudien eingesetzt. Für die (*S*)-konfigurierten Derivate gelang es dabei deren geschmacksverstärkende Effekte zu verifizieren, während die drastisch reduzierte Aktivität der (*R*)-konfigurierten Verbindungen ebenfalls bestätigt werden konnten. Darüber hinaus ergaben erste Messung des Zeit-Intensitäts-Verlaufes verschiedener binärer Gemische aus Nukleotiden und MSG deutliche Unterschiede in der Wahrnehmung des Umamigeschmacks, wobei die unpolare Derivate eine erhöhte Persistenz im Vergleich zum nativen Nukleotid aufwiesen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen fundamentalen Erkenntnisse zur Struktur und sensorischen Aktivität glykierter 5'-GMP-Derivate in Hefeextrakten legen die Basis für die Entwicklung neuartiger Hefeextrakte bzw. Reaktionsaromen mit optimierter Umamiwirksamkeit.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Nagodawithana, T. Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol.* **1992**, *46*, 138, 140-142, 144.
- [2] de Palma Revillion, J. P.; Brandelli, A.; Ayub, M. A. Z. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2003**, *46*, 121-128.
- [3] Komorowska, A.; Sieliwanowicz, B.; Mrówka, E.; Stecka, K.; Halasinska, A. Studies on yeast extracts enriched in 5'nucleotides flavour enhancers obtained from spent brewery yeast. *EJPAU* **2003**, *6*, #03.
- [4] Sombutyanuchit, P.; Supphantharika, M.; Verduyn, C. Preparation of 5'-GMP-rich yeast extracts from spent brewer's yeast. *World J. Microb. Biot.* **2001**, *17*, 163-168.
- [5] Nagodawithana, T. W. Savory flavors. In: *Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients*; Gabelman, A. Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1994**, pp 135-168.
- [6] Laufer, L.; Gutcho, S. Hydrolysis of RNA to 5'-nucleotide by seed sprouts, particularly malt sprouts. *Biotechnol. Bioeng.* **1968**, *10*, 257-275.
- [7] Chae, H. J.; Joo, H.; In, M.-J. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresour. Technol.* **2001**, *76*, 253-258.
- [8] Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer Verlag Berlin*, 5. Auflage **2001**.
- [9] Davidek, J.; Hajslova, J.; Kubelka, V.; Velisek, J. Flavor significant compounds in yeast autolyzate gistex X-II powder. Part I. Acidic fraction. *Nahrung* **1979**, *23*, 673-680.
- [10] Hajslova, J.; Velisek, J.; Davidek, J.; Kubelka, V. Flavor significant compounds in yeast autolyzate gistex X-II powder. Part 2. Neutral and basic fractions. *Nahrung* **1980**, *24*, 875-881.
- [11] Ames, J. M.; MacLeod, G. Volatile components of a yeast extract composition. *J. Food Sci.* **1985**, *50*, 125-131.
- [12] Werkhoff, P.; Bretschneider, W.; Emberger, R.; Güntert, M.; Hopp, R.; Köpsel, M. Recent development in the sulfur flavour chemistry of yeast extracts. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1991**, 30-57.
- [13] Münch, P.; Hofmann, T.; Schieberle, P. Comparison of key odorants generated by thermal treatment of commercial and self-prepared yeast extracts: Influence of the amino acid composition on odorant formation. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1338-1344.
- [14] Münch, P.; Schieberle, P. Quantitative studies on the formation of key odorants in thermally treated yeast extracts using stable isotope dilution assays. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4695-4701.
- [15] Ikeda, K. New seasonings. *Chem. Senses* **2002**, *27*, 847-849.

- [16] Dunkel, A.; Hofmann, T. Sensory-directed identification of β -alanyl dipeptides as contributors to the thick-sour and white-meaty orosensation induced by chicken broth. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9867-9877.
- [17] Rotzoll, N.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in morel mushrooms (*morchella deliciosa* fr.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2705-2711.
- [18] Yamaguchi, S.; Yoshikawa, T.; Ikeda, S.; Ninomiya, T. Measurement of the relative taste intensity of some L- α -amino acids and 5'-nucleotides. *J. Food Sci.* **1971**, *36*, 846-849.
- [19] Yamaguchi, S. Synergistic taste effect of monosodium glutamate and disodium 5'-inosinate. *J. Food Sci.* **1967**, *32*, 473-487.
- [20] Yamaguchi, S. Basic properties of umami and effects on humans. *Physiol. Behav.* **1991**, *49*, 833.
- [21] Ney, K. H. Flavor enhancing effect of L-glutamate and similar compounds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1971**, *146*, 141-143.
- [22] Velisek, J.; Davidek, J.; Kubelka, V.; Tran, T. B. T.; Hajslova, J. Succinic acid in yeast autolysates and its sensory properties. *Nahrung* **1978**, *22*, 735.
- [23] Imai, K.; Marumoto, R.; Kobayashi, K.; Yoshioka, Y.; Toda, J.; Honjo, M. Synthesis of compounds related to inosine 5'-phosphate and their flavor enhancing activity. IV. 2-substituted inosine 5'-phosphates. *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 576-586.
- [24] Mizuta, E.; Toda, J.; Suzuki, N.; Sugibayashi, H.; Imai, K.; Nishikawa, M. Structure-activity relation in the taste effect of ribonucleotide derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1972**, *20*, 1114-1124.
- [25] Yamaguchi, S. The umami taste. In: *ACS Symposium Series 115*; Boudreau, J., Ed.; American Chemical Society: Washington DC, **1979**, pp 33-51.
- [26] Yamaguchi, S.; Yoshikawa, T.; Ikeda, S.; Ninomiya, T. Synergistic taste effects of some new ribonucleotide derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **1968**, *32*, 797-802.
- [27] Yamazaki, A.; Kumashiro, I.; Takenishi, T. Synthesis of some N¹-methyl-2-substituted inosines and their 5'-phosphates. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16*, 1561-1566
- [28] Kuninaka, A.; Kumagai, M.; Fujiyama, K.; Ogura, M.; Sakata, S.; Yonei, S. Flavor activity of sulfur-containing compounds related to flavor nucleotides. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1437-1439.
- [29] De Rijke, E.; Ruisch, B.; Bakker, J.; Visser, J.; Leenen, J.; Haiber, S.; De Klerk, A.; Winkel, C.; Koenig, T. LC-MS study to reduce ion suppression and to identify N-lactoylguanosine 5'-monophosphate in bonito: A new umami molecule? *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6417-6423.
- [30] Winkel, C.; de, K. A.; Visser, J.; de, R. E.; Bakker, J.; Koenig, T.; Renes, H. New developments in umami (enhancing) molecules. *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 1195-1203.

- [31] Cairolì, P.; Pieraccini, S.; Sironi, M.; Morelli, C. F.; Speranza, G.; Manitto, P. Studies on umami taste. Synthesis of new guanosine 5'-phosphate derivatives and their synergistic effect with monosodium glutamate. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1043-1050.
- [32] Morelli, C. F.; Manitto, P.; Speranza, G. Study on umami taste: The MSG taste-enhancing activity of *N*²-alkyl and *N*²-alkanoyl-5'-guanylic acids having a sulfoxide group inside the *N*²-substituent. *Flavour Fragrance J.* **2011**, *26*, 279-281.
- [33] Maillard, L. C. Action des acides amines sur les sucres. Formation des melanoidines par voi methodique. *C. R. Acad. Sci. Ser. 2* **1912**, *154*, 66-68.
- [34] Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N.; Faust, F. M. Protein cross-linking by the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19338-19345.
- [35] Mauron, J. The Maillard reaction in food: A critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.* **1981**, *5*, 5-35.
- [36] Nissl, J.; Ochs, S.; Severin, T. Reaction of guanosine with glucose, ribose, and glucose 6-phosphate. *Carbohydr. Res.* **1996**, *289*, 55.
- [37] Requena, J. R.; Ahmed, M. U.; Fountain, C. W.; Degenhardt, T. P.; Reddy, S.; Perez, C.; Lyons, T. J.; Jenkins, A. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the Maillard reaction in vivo. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17473-17479.
- [38] Schneider, M.; Klotzsche, M.; Werzinger, C.; Hegele, J.; Waibel, R.; Pischetsrieder, M. Reaction of folic acid with reducing sugars and sugar degradation products. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1647-1651.
- [39] Seidel, W.; Pischetsrieder, M. Reaction of guanosine with glucose under oxidative conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2017.
- [40] Kuhn, R.; Weygand, F. The Amadori rearrangement. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1937**, *70B*, 769-772.
- [41] Simon, H.; Kraus, A. Mechanism studies on glycosylamines, sugar hydrazones, amadori rearrangement products and osazones. *Fortschr. Chem. Forsch.* **1970**, *14*, 430-471.
- [42] Westphal, G.; Kroh, L. Zum Mechanismus der "frühe Phase" der Maillard-Reaktion 2. Mitt. Folgereaktion von N-Glycosiden. *Nahrung* **1985**, *29*, 765-775.
- [43] Heyns, K.; Breuer, H.; Paulsen, H. Darstellung und Verhalten der 2-N-Aminosäure-2-desoxy-glucose ("Glucose-Aminosäure") aus Glycin, Alanin, Leucin und D-Fructose. *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 1374-1386.
- [44] Anet, E. F. L. J. Degradation of carbohydrates I. Isolation of 3-deoxyhexosones. *Aust. J. Chem.* **1960**, *13*, 396-403.
- [45] Kato, H. Chemical studies on the amino-carbonyl reaction. I. Isolation of 3-deoxypentosulose and 3-deoxyhexosuloses formed by browning degradation of glycosylamines. *Agric. Biol. Chem.* **1962**, *26*, 187-192.
- [46] Beck, J.; Ledl, F.; Severin, T. Formation of 1-deoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose from Amadori compounds. *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, 240-243.

- [47] Hofmann, T. Quantitative studies on the role of browning precursors in the Maillard reaction of pentoses and hexoses with L-alanine. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 113-121.
- [48] Nedvidek, W.; Ledl, F.; Fischer, P. Detection of 5-hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and of α -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 222-228.
- [49] Severin, T.; Hiebl, J.; Popp-Ginsbach, H. Untersuchungen zur Maillard-Reaktion - XX. Nachweis von Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton und anderen hydrophilen Zuckerabbauprodukten in Caramelisierungsgemischen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1984**, *178*, 284-287.
- [50] Weenen, H.; Tjan, S. B. Analysis, structure, and reactivity of 3-deoxyglucosone. *ACS Symp. Ser.* **1992**, *490*, 217-231.
- [51] Hofmann, T. Charakterisierung intensiver Geruchsstoffe in Kohlenhydrat/Cysteinmodellreaktionen und Klärung von Bildungswegen - Ein Beitrag zur Maillard-Reaktion. *Dissertation, Technische Universität München* **1995**.
- [52] Hayashi, T.; Mase, S.; Namiki, M. Formation of three-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amines or amino acids. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 1959-1964.
- [53] Namiki, M.; Hayashi, T. A new mechanism of the maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. *ACS Symp. Ser.* **1983**, *215*, 21-46.
- [54] Hofmann, T.; Bors, W.; Stettmaier, K. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 379-390.
- [55] Chen, W. C. Untersuchungen über den Bittergeschmack von Röstkaffee. Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei einigen einfachen organischen Verbindungen. *Dissertation, Technische Universität München* **1979**.
- [56] Pabst, H. M. E.; Ledl, F.; Belitz, H. D. Bitter compounds obtained by heating sucrose, maltose and proline. 2. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1985**, *181*, 386-390.
- [57] Pabst, H. M. E.; Ledl, F.; Belitz, H. D. Bitterstoffe beim Erhitzen von Prolin und Saccharose. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1984**, *178*, 356-360.
- [58] Gautschi, M.; Schmid, J. P.; Peppard, T. L.; Ryan, T. P.; Tuorto, R. M.; Yang, X. Chemical characterization of diketopiperazines in beer. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3183-3189.
- [59] Tressl, R.; Helak, B.; Spengler, K.; Schroeder, A.; Rewicki, D. Cyclopent[b]azepin-Derivate, neue Prolin-spezifische Maillard-Produkte. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 2017-2027.
- [60] 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 ^{13}C -labeling experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6027-6036.
- [61] Frank, O.; Jezussek, M.; Hofmann, T. Sensory activity, chemical structure, and synthesis of maillard generated bitter-tasting 1-oxo-2,3-dihydro-1H-indolizinium-6-olates. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2693-2699.

- [62] Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1*H*,4*H*-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231-238.
- [63] Sonntag, T.; Kunert, C.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Sensory-guided identification of *N*-(1-methyl-4-oxoimidazolidin-2-ylidene)- α -amino acids as contributors to the thick-sour and mouth-drying orosensation of stewed beef juice. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6341-6350.
- [64] Ottinger, H.; Hofmann, T. Identification of the taste enhancer alapyridaine in beef broth and evaluation of its sensory impact by taste reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6791-6796.
- [65] 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.
- [66] Soldo, T.; Blank, I.; Hofmann, T. (+)-(S)-alapyridaine-a general taste enhancer? *Chem. Senses* **2003**, *28*, 371-379.
- [67] 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.
- [68] Beksan, E.; Schieberle, P.; Robert, F.; Blank, I.; Fay, L. B.; Schlichtherle-Cerny, H.; Hofmann, T. Synthesis and sensory characterization of novel umami-tasting glutamate glycoconjugates. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5428-5436.
- [69] Vinnikova, A. K.; Alam, R. I.; Malik, S. A.; Ereso, G. L.; Feldman, G. M.; McCarty, J. M.; Knepper, M. A.; Heck, G. L.; DeSimone, J. A.; Lyall, V. Na⁺-H⁺ exchange activity in taste receptor cells. *J. Neurophysiol.* **2004**, *91*, 1297-1313.
- [70] Gilbertson, T. A.; Roper, S. D.; Kinnamon, S. C. Proton currents through amiloride-sensitive sodium channels in isolated hamster taste cells: Enhancement by vasopressin and camp. *Neuron* **1993**, *10*, 931-942.
- [71] Richter, T. A.; Dvoryanchikov, G. A.; Roper, S. D.; Chaudhari, N. Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 4088-4091.
- [72] Ugawa, S.; Minami, Y.; Guo, W.; Saishin, Y.; Takatsuji, K.; Yamamoto, T.; Tohyama, M.; Shimada, S. Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature* **1998**, *395*, 555-556.
- [73] Ishimaru, Y.; Inada, H.; Kubota, M.; Zhuang, H.; Tominaga, M.; Matsunami, H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 12569-12574.
- [74] Roper, S. D. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol* **2007**, *454*, 759-776.
- [75] Kretz, O.; Barbry, P.; Bock, R.; Lindemann, B. Differential expression of RNA and protein of the three pore-forming subunits of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in taste buds of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 51-64.

- [76] Lin, W.; Finger, T. E.; Rossier, B. C.; Kinnamon, S. C. Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: Localization and regulation by aldosterone. *J. Comp. Neurol.* **1999**, *405*, 406-420.
- [77] Lyall, V.; Heck, G. L.; Vinnikova, A. K.; Ghosh, S.; Phan, T.-H. T.; Alam, R. I.; Russell, O. F.; Malik, S. A.; Bigbee, J. W.; DeSimone, J. A. The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J. Physiol.* **2004**, *558*, 147-159.
- [78] DeSimone, J. A.; Lyall, V.; Heck, G. L.; Phan, T. H.; Alam, R. I.; Feldman, G. M.; Buch, R. M. A novel pharmacological probe links the amiloride-insensitive NaCl, KCl, and NH₄Cl chorda tympani taste responses. *J. Neurophysiol* **2001**, *86*, 2638-2641.
- [79] Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 693-702.
- [80] Behrens, M.; Foerster, S.; Staehler, F.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12630-12640.
- [81] Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Hoon, M. A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J. P. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 703-711.
- [82] Matsunami, H.; Montmayeur, J.-P.; Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature (London)* **2000**, *404*, 601-604.
- [83] Meyerhof, W. Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2005**, *154*, 37-72.
- [84] Behrens, M.; Brockhoff, A.; Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Meyerhof, W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 479-485.
- [85] Brockhoff, A.; Behrens, M.; Massarotti, A.; Appendino, G.; Meyerhof, W. Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6236-6243.
- [86] Bufe, B.; Breslin, P. A. S.; Kuhn, C.; Reed, D. R.; Tharp, C. D.; Slack, J. P.; Kim, U.-K.; Drayna, D.; Meyerhof, W. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 322-327.
- [87] Bufe, B.; Hofmann, T.; Krautwurst, D.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to β -glucopyranosides. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 397-401.
- [88] Dotson, C. D.; Zhang, L.; Xu, H.; Shin, Y.-K.; Vignes, S.; Ott, S. H.; Elson, A. E. T.; Choi, H. J.; Shaw, H.; Egan, J. M.; Mitchell, B. D.; Li, X.; Steinle, N. I.; Munger, S. D. Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One* **2008**, *3*, e 3974, 3971-3910.
- [89] Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T., Three TAS2R bitter taste receptors mediate the psychophysical responses to bitter compounds of hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Chem. Percept.* **2009**, *2*, 118-132.

- [90] Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Hofmann, T.; Frank, O.; Behrens, M.; Lewtschenko, T.; Slack, J. P.; Ward, C. D.; Meyerhof, W. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame k. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10260-10265.
- [91] Maehashi, K.; Matano, M.; Wang, H.; Vo, L. A.; Yamamoto, Y.; Huang, L. Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 851-855.
- [92] Pronin, A. N.; Tang, H.; Connor, J.; Keung, W. Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 583-593.
- [93] Sainz, E.; Cavenagh, M. M.; Gutierrez, J.; Battey, J. F.; Northup, J. K.; Sullivan, S. L. Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochem. J.* **2007**, *403*, 537-543.
- [94] Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; Adler, E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 4692-4696.
- [95] Nelson, G.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **2001**, *106*, 381-390.
- [96] Temussi, P. A. Sweet, bitter and umami receptors: A complex relationship. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 296-302.
- [97] Servant, G.; Tachdjian, C.; Tang, X.-Q.; Werner, S.; Zhang, F.; Li, X.; Kamdar, P.; Petrovic, G.; Ditschun, T.; Java, A.; Brust, P.; Brune, N.; DuBois, G. E.; Zoller, M.; Karanewsky, D. S. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4746-4751, S4746/4741-S4746/4744.
- [98] Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R. M.; Liu, H.; Xu, H.; Servant, G.; Zoller, M.; Tachdjian, C.; Li, X. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4752-4757, S4752/4751-S4752/4754.
- [99] Nelson, G.; Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Feng, L.; Zhao, G.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. An amino-acid taste receptor. *Nature* **2002**, *416*, 199-202.
- [100] Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R. M.; Xu, H.; Pronin, A.; Liu, H.; Tachdjian, C.; Li, X. Molecular mechanism for the umami taste synergism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 20930-20934.
- [101] Warmke, R.; Belitz, H. D.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of swiss cheese (emmentaler). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 230-235.
- [102] Rothe, M.; Thomas, B. Aroma of bread. Evaluation of chemical taste analysis with the aid of threshold value. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1963**, *119*, 302-310.
- [103] 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*, 5377-5384.
- [104] Dunkel, A.; Koester, J.; Hofmann, T. Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6712-6719.

- [105] 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.
- [106] Soldo, T.; Hofmann, T. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography/comparative taste dilution analysis for identification of a bitter inhibitor by a combinatorial approach based on Maillard reaction chemistry. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9165-9171.
- [107] Schlichtherle-Cerny, H.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **1998**, *207*, 369-376.
- [108] Warendorf, T.; Belitz, H. D.; Gasser, U.; Grosch, W. The flavor of bouillon. Part 2. Sensory analysis of non volatiles and imitation of a bouillon. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 215-223.
- [109] Hufnagel, J. C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9190-9199.
- [110] Toelstede, S.; Hofmann, T. Quantitative studies and taste re-engineering experiments toward the decoding of the nonvolatile sensometabolome of gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5299-5307.
- [111] Toelstede, S.; Dunkel, A.; Hofmann, T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1440-1448.
- [112] Ueda, Y.; Sakaguchi, M.; Hirayama, K.; Miyajima, R.; Kimizuka, A. Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 163-169.
- [113] Ueda, Y.; Yonemitsu, M.; Tsubuku, T.; Sakaguchi, M.; Miyajima, R. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1997**, *61*, 1977-1980.
- [114] Kaneko, S.; Kumazawa, K.; Masuda, H.; Henze, A.; Hofmann, T. Molecular and sensory studies on the umami taste of japanese green tea. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2688-2694.
- [115] Ochs, S.; Severin, T. Reaction of 2'-deoxyguanosine with glyceraldehyde. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 851-853.
- [116] Fan, Y.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. Transient silylation of the guanosine O^6 and amino groups facilitates N-acylation. *Org. Letters* **2004**, *6*, 2555-2557.
- [117] Toyooka, K.; Takeuchi, Y.; Kubota, S. A novel and facile synthesis of 5-substituted 1,3-dioxolane-2,4-diones using trichloromethyl chloroformate. *Heterocycles* **1989**, *29*, 975-978.
- [118] Cao, H.; Jiang, Y.; Wang, Y. Stereospecific synthesis and characterization of oligodeoxyribonucleotides containing an N^2 -(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12123-12130.
- [119] Larisch, B.; Pischetsrieder, M.; Severin, T. Formation of guanosine adducts from L-ascorbic acid under oxidative conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2681.

- [120] Ochs, S.; Severin, T. Reaction of 2'-deoxyguanosine with glucose. *Carbohydr. Res.* **1995**, *266*, 87.
- [121] Knerr, T.; Ochs, S.; Severin, T. Reaction of guanosine, 2'-deoxyguanosine and guanosine-5'-monophosphate with glucose. *Carbohydr. Res.* **1994**, *256*, 177.
- [122] Peich, C. C.; Seidel, W.; Hanak, N.; Waibel, R.; Schneider, M.; Pischetsrieder, M. Potential DNA-protein cross-link products formed by sugar degradation products: Identification of N^{β} -[2-(N^{β} -2'-deoxyguanosyl)propionyl]lysine. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *221*, 9-13.
- [123] Mavric, E.; Henle, T. Isolation and identification of 3,4-dideoxypentosulose as specific degradation product of oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 803-810.
- [124] Knerr, T.; Severin, T. Reaction of glucose with guanosine. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7389.
- [125] Knerr, T. Reduktone als Intermediate der Maillard-Reaktion von Glucose und Reaktion von Guanodin mit Glucose. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München* **1994**.
- [126] Ramm, M.; Wolfender, J.-L.; Queiroz, E. F.; Hostettmann, K.; Hamburger, M. Rapid analysis of nucleotide-activated sugars by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detection, electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 139-148.
- [127] Yoshida, H.; Mizukoshi, T.; Hirayama, K.; Miyano, H. Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 551-560.
- [128] Brüggemann, B.; Schlüter, H.; Verspohl, E. J.; Zidek, W. Rapid separation of dinucleotides with ion-pair high performance liquid chromatography. *Fresen. J. Anal. Chem.* **1994**, *350*, 719-721.
- [129] Cichna, M.; Daxecker, H.; Raab, M. Determination of 18 nucleobases, nucleosides and nucleotides in human peripheral blood mononuclear cells by isocratic solvent-generated ion-pair chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 245-253.
- [130] Fish, W. W. A method for the quantitation of 5'-mononucleotides in foods and food ingredients. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1098-1101.
- [131] Uesugi, T.; Sano, K.; Uesawa, Y.; Ikegami, Y.; Mohri, K. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of adenine nucleotides and nucleoside using triethylamine as a counterion. *J. Chromatogr. B* **1997**, *703*, 63-74.
- [132] Shaoul, O.; Sporns, P. Hydrolytic stability at intermediate pHs of the common purine nucleotides in food, inosine-5'-monophosphate, guanosine-5'-monophosphate and adenosine-5'-monophosphate. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 810-812.
- [133] Lindberg, M.; Mosbach, K. Preparation of analogs of ATP, ADP, and AMP suitable for binding to matrixes and the enzymic interconversion of ATP and ADP in solid phase. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *53*, 481-486.

- [134] Stark, T.; Hofmann, T. Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of *N*-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5419-5428.

Anhang

Ermittelte umamiverstärkende Aktivität (β -Werte) der isolierten, modifizierten Guanosin-5'-monophosphatderivate im Vergleich zu Inosin 5'-monophosphat (**3**).

Testnukleotid ^a	β -Wert ^f
Inosin 5'-monophosphat ^b (5'-IMP), 3	1,0
Guanosin-5'-monophosphat ^b (5'-GMP), 2	2,4
<i>N</i> ² -(<i>S</i>)-Laktoyl-5'-GMP, 12	0,4
<i>N</i> ² -Acetyl-5'-GMP, 13	1,9
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ^c , (<i>R</i>)- 21	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ^c , (<i>S</i>)- 21	7,0
(<i>R/S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxyethyl)-5'-GMP ^{c,d} , (<i>R/S</i>)- 21	2,9
<i>N</i> ² -(<i>S</i>)-O-Acetyl-laktoyl-5'-GMP, 24	0,2
<i>N</i> ² -Carboxymethyl-5'-GMP ^c , 26	1,2
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'-GMP ^c , (<i>R</i>)- 27	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-3-hydroxypropyl)-5'-GMP ^c , (<i>S</i>)- 27	2,0
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-5'-GMP ^c , (<i>R</i>)- 28	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-3,4-dihydroxybutyl)-5'-GMP ^c , (<i>S</i>)- 28	0,3
(<i>R/S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-3,4,5-trihydroxypentyl)-5'-GMP ^{c,e} , (<i>R/S</i>)- 29	0,2
<i>N</i> ² -(β -D-Glucosyl)-5'-GMP ^b , 30	0,1
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-5'-GMP ^c , (<i>R</i>)- 31	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -(1-Carboxy-4-hydroxybutyl)-5'-GMP ^c , (<i>S</i>)- 31	0,1
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 32	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Propylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 32	6,0
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 33	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -(1',3'-Dicarboxypropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 33	1,6
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Methylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 34	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Methylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 34	4,4
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Ethylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 35	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Ethylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 35	4,9
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Isopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 36	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Isopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 36	6,0
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Cyclopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 37	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Cyclopropylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 37	3,4
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Butylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>R</i>)- 38	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Butylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (<i>S</i>)- 38	7,6

Testnukleotid ^a	β -Wert ^f
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Isobutylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (S)- 39	7,6
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Pentylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (R)- 40	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Pentylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (S)- 40	4,6
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (R)- 41	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Hexylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (S)- 41	4,0
(<i>R</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Furfurylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (R)- 42	0,1
(<i>S</i>)- <i>N</i> ² -((1-(<i>N</i> -Furfurylamino)-carbonyl)-ethyl)-5'-GMP, (S)- 42	3,5
<i>N</i> ² -Furoyl-5'-GMP, 43	2,7

^a Die chemischen Strukturen der Verbindungen sind in **Abbildung 59**, **Abbildung 74** und **Abbildung 76** dargestellt. ^b Verwendet als Dinatriumsalz. ^c Verwendet als Trinatriumsalz. ^d Verwendet als racemisches Gemisch (1:1). ^e Verwendet als 1:2 Gemisch der Diastereomeren (bestimmt mittels ¹H-NMR). ^f bestimmt nach *Yamaguchi et al., 1971* ^[18].

Lebenslauf

Name	Daniel Festring
Geburtsdatum	31. Dezember 1980
Geburtsort	Frechen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Eltern	Erich Festring Margret Festring, geb. Heising

SCHULAUSBILDUNG

1987-1991	Ludgeri-Grundschule, Billerbeck
1991-2000	Gymnasium Nepomucenum, Coesfeld
25.05.2000	Abitur

ZIVILDienst

08/2000-06/2001	St. Ludgerus Stiftung, Billerbeck
-----------------	-----------------------------------

STUDIUM

10/2001-11/2006	Studium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen- Wilhelms Universität Münster
15.11.2006	Erstes Staatsexamen

PROMOTIONSSTUDIUM

01/2007-07/2010	Promotionsstudium am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München Betreuer: Prof. Dr. Th. F. Hofmann
-----------------	--

BERUFSTÄTIGKEIT

01/2007-07/2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik
seit 09.2010	Research Scientist am Nestlé Product Technology Center Orbe, Schweiz