

Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München

# **Wichtige Aromastoffe in schwarzem und grünem Tee (Camellia sinensis)**

**Christian Schuh**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

## **Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle  
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 26.10.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25.11.2004 angenommen.

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von September 2000 bis Juni 2003 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. Schieberle am Institut für Lebensmittelchemie an der Technischen Universität in München durchgeführt.

Für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die vielen wertvollen Anregungen, Diskussionen und Ratschläge, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen bedanke ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. P. Schieberle.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München und der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Einen besonderen Dank richte ich an Frau Karoline Schmid für die gewissenhafte und hochwertige Arbeit am Projekt Grüner Tee.

Herrn Dr. L. Poisson, Herrn Dr. J.-M. Liepe, Herrn M. Weigl, Frau K. Soellner, Frau J. Bogen und Frau K. Schmid danke ich sehr herzlich für ein stets freundliches, unterstützendes und kameradschaftliches Arbeitsklima im Labor 62302.

Für die Teilnahme an den sensorischen Untersuchungen danke ich meinen Kollegen Herrn U. Arzberger, Frau Y. Ayverdi, Herrn D. Boerger, Frau A. Burdack-Freitag, Frau Dr. A. Buettner, Herrn und Frau Christelbauer, Herrn Dr. M. Czerny, Frau A. Fischer, Frau T. Gladisch, Herrn M. Granvogel, Frau V. Greger, Herrn Dr. M. Jezussek, Herrn Dr. J.-M. Liepe, Herrn Dr. M. Lindenmaier, Herrn A. Meyer, Frau S. Pflegar, Herrn Dr. L. Poisson, Frau N. Rotzoll, Frau C. Scheidig, Frau K. Schmid, Herrn R. Schmitt, Frau S. Schuster, Frau K. Söllner, Herrn Dr. M. Steinhaus, Herrn Dr. I. Teutsch, Herrn M. Weigl, Frau A. Weiss und Frau E. Wiegand.

Weiterhin danke ich Herrn J. Schönauer, Frau I. Otte und Frau S. Schuster für die Aufnahmen der Massenspektren sowie Herrn Dr. O. Frank und Herrn T. Stark für die Messung der NMR-Spektren.

Herrn Dr. J.-M. Liepe, Herrn M. Weigl und Frau I. Schuh danke ich für die gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jens-Michael Liepe, Herrn Martin Weigl, Frau Kerstin Söllner und Herrn Dr. Andreas Czepa, die meine Zeit in München zu einem unvergesslichen Erlebnis machten.

Nicht zuletzt bedanke ich mich noch recht herzlich bei meinen Eltern und Geschwistern, die mir meine Ausbildung ermöglichten und auf deren Unterstützung ich jederzeit bauen konnte und schließlich ein großes Dankeschön an meine Frau Ivonne und meine Tochter Nicola, die stets Verständnis für meine zeitaufwendige Arbeit zeigten.

**FÜR IVONNE**

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Herstellung von grünem und schwarzem Tee.....	3
1.2 Chemische Zusammensetzung des frischen Teeblattes.....	8
1.3 Flüchtige Verbindungen im grünen und schwarzen Tee.....	10
1.4 Methoden zur Identifizierung aromarelevanter Verbindungen.....	18
1.4.1 Isolierung der flüchtigen Verbindungen.....	19
1.4.2 Identifizierung der relevanten Aromastoffe.....	19
1.4.3 Quantifizierung der relevanten Aromastoffe und Berechnung des Aromawertes....	22
1.4.4 Aromasimulation .....	24
1.5 Aufgabenstellung.....	25
<b>2 ERGEBNISSE</b> .....	<b>26</b>
2.1 Potente Aromastoffe im „Darjeeling Gold-Auslese“ .....	26
2.1.1 Aromastoffe im Teegetränk (DGA-G).....	26
2.1.2 Aromastoffe im Teepulver (DGA-P) .....	59
2.1.3 Vergleich der Ergebnisse vom Teegetränk und Teepulver .....	65
2.1.4 Vorstufenexperimente .....	67
2.1.5 Diskussion.....	70
2.2 Potente Aromastoffe im „Grüner Darjeeling“ .....	78
2.2.1 Aromastoffe im Teegetränk (GD-G) .....	78
2.2.2 Aromastoffe im Teepulver (GD-P).....	85
2.2.3 Vergleich der Ergebnisse von Teegetränk und Teepulver .....	89
2.2.4 Diskussion.....	91
2.3 Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen an Darjeeling Gold-Auslese und Grüner Darjeeling .....	95

<b>2.4 Potente Aromastoffe in den Schwarzteegetränken aus den Sorten Darjeeling Star (DS-G), Golden Palace (GP-G), Admiral`s Cup (AC-G) und Ceylon Best (CB-G)</b> .....	<b>98</b>
2.4.1 Aromaprofile.....	98
2.4.2 Aromaextraktverdünnungsanalysen.....	100
2.4.3 Quantifizierung der relevanten Aromastoffe.....	103
2.4.4 Ermittlung der Aromawerte .....	106
2.4.5 Aromasimulationen .....	109
<b>2.5 Potente Aromastoffe in Haferflocken</b> .....	<b>112</b>
<b>3 EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>114</b>
<b>3.1 Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>114</b>
<b>3.2 Chemikalien</b> .....	<b>116</b>
<b>3.3 Synthesen</b> .....	<b>121</b>
3.3.1 Referenzaromastoffe.....	121
3.3.2 Isotopenmarkierte Aromastoffe .....	125
<b>3.4 Isolierung von Aromastoffen</b> .....	<b>129</b>
<b>3.5 Sensorische Methoden</b> .....	<b>138</b>
3.5.1 Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC/O).....	138
3.5.2 Sensorische Identifizierung von Aromastoffen .....	138
3.5.3 Bestimmung von Geruchsschwellen .....	139
3.5.4 Aromaprofilanalysen .....	141
3.5.5 Weglassversuche.....	142
<b>3.6 Massenspektrometrische Methoden</b> .....	<b>143</b>
3.6.1 Identifizierungen.....	143
3.6.2 Quantifizierungen.....	143
3.6.3 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses chiraler Aromastoffe .....	145

<b>3.7 Analytisch-instrumentelle Methoden .....</b>	<b>146</b>
3.7.1 Kapillargaschromatographie (HRGC).....	146
3.7.2 Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie (HRGC/MS) .....	148
3.7.3 Präparative Dünnschichtchromatographie (DC).....	149
3.7.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	150
3.7.5 Argentationssäulenchromatographie.....	151
3.7.6 Kernresonanzspektrometrie (NMR).....	151
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>152</b>
<b>LITERATUR .....</b>	<b>155</b>

## Abkürzungen

AC-G	Teegetränk aus der Sorte Admiral`s Cup
AEVA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
AW	Aromawert
CB-G	Teegetränk aus der Sorte Ceylon Best
CI	Chemische Ionisation
COSY	H,H-Homonuclear Correlation Spectroscopy
CTC	Crush-Tearl-Curl
DC	Dünnschichtchromatographie
DGA	Darjeeling Gold-Auslese
DGA-P	Teepulver aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese
DGA-G	Teegetränk aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese
DM	Dess-Martin-Periodinan;1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on
DS-G	Teegetränk aus der Sorte Darjeeling Star
EI	Elektronenstossionisation
FD-Faktor	Flavor Dilution Faktor, Verdünnungsfaktor
FFAP	Free Fatty Acid Phase
FID	Flammenionisationsdetektor
GD-P	Teepulver aus der Sorte Grüner Darjeeling
GD-G	Teegetränk aus der Sorte Grüner Darjeeling
GP-G	Teegetränk aus der Sorte Golden Palace
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRGC	Kapillargaschromatographie
HRGC/MS	Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie
HRGC/O	Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie
HVT	Hochvakuumtransfer
ID	Innendurchmesser
IVA	Isotopenverdünnungsanalyse
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis von molarer Masse zu Ladung
NMR	Kernresonanzspektrometrie
RI	Linearer Retentionsindex

Rt	Retentionszeit
s.o.	siehe oben
TDHRGC	Zweidimensionale Kapillargaschromatographie

#### Trivialnamen

(E)- $\beta$ -Damascenon	1-(2,6,6-Trimethyl-1,3-cyclohexadienyl)-buten-1-on
Geraniol	(E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol
$\beta$ -Ionon	4-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-on
Linalool	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol
Methional	3-(Methylthio)-propanal
TDA-1	Tris-[2-(methoxyethoxy)-ethyl]-amine
Vanillin	4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd

# 1 Einleitung

Laut Definition ist Tee der aus den Teeblättern der Gattung *Thea* bereitete wässrige Abguss (im Fachjargon spricht man von Abguss nicht von Aufguss, da das Getränk durch das Sieben der Teeblätter abgossen wird).

Die ersten Aufzeichnungen über den Nutzen und die Herstellung von Tee stammen von Kou P'ó aus dem Jahre 350. Damals wurde Tee hauptsächlich für medizinische Zwecke und als Getränk für auserlesene Gäste genutzt. In den folgenden Jahrhunderten hat sich in China die Stellung des Tees als Handelsgut und als Getränk stark gefestigt. Mit der zunehmenden Beliebtheit im Heimatland gewannen die Teeblätter auch als Exportgut an Bedeutung. Regler Teehandel mit der Türkei, Korea und Japan führte im Jahre 805 zur ersten Kultivierung der Teepflanze in Japan. Anfang des 17. Jahrhunderts begann der Teehandel mit Europa, vor allem mit Großbritannien.

Heute ist Tee, nach Wasser, das meist konsumierte Getränk der Welt.

Im Jahre 1753 wurde die Teepflanze botanisch als *Thea sinensis* klassifiziert und inzwischen, nach vielen verschiedenen Einordnungen, ist allgemein anerkannt, dass sie zur Familie Theaceae und zur Spezies *Camellia* gehört. Es gibt zwei Hauptvarietäten: *Camellia sinensis* variety *sinensis* und *Camellia sinensis* variety *assamica*. Die heute verwendeten Züchtungen sind eine Kombination der beiden Varietäten mit Einflüssen weiterer Varietäten, die speziell für jedes Anbaugebiet und die dort vorherrschenden klimatischen und örtlichen Bedingungen optimiert sind.

Die Teepflanze bevorzugt tropisches oder subtropisches Klima und wird weltweit zwischen dem 40° nördlicher und 33° südlicher Breite angebaut. Genauso variabel wie der Breitengrad ist auch die Anbauhöhe – der Teestrauch gedeiht bis in Höhen von 2500 Metern.

Der weltgrößte Teeproduzent und –konsument ist Indien, welches nur noch von Ceylon im Tee-Export übertroffen wird. Die drei Hauptanbaugebiete in Indien sind das Darjeeling Anbaugebiet im Norden an den Hängen des Himalajas, die Assam Anbaugebiete in der Ebene und im Süden Nilgiri.

Auf Sri Lanka (Ceylon Tee) gibt es sechs verschiedene Teeanbaugebiete (Nuwara Eliya, Dimbula, Uva, Galle, Radnapura, Kandy), wobei die Spitzentees aus den Distrikten Uva im Osten, Dimbula im Westen und Nuwara Eliya, unterhalb des Adam`s Peak kommen.

Die größten Teeanbaugebiete Chinas sind: Anhui, Fudjien, Guanxi, Zhejiang, Yunnan, Jiangsu, Jiangxi und Szichuan. Eine Besonderheit der chinesischen Teesorten ist, dass sie nicht nur unter ihren Gartennamen verkauft werden, sondern auch teilweise sehr phantasievolle Namen besitzen, welche auf Aussehen oder den Teeherkunftsort Bezug nehmen. Desweiteren ist der chinesische Tee keine reine Teesorte aus einem Anbaugebiet sondern eine Teemischung. Diese Mischungen sind sogenannte Standards, sie stellen die gleichbleibende Qualität durch genaue Mischverhältnisse sicher.

In Japan wird nur Grüntee erzeugt und dies fast ausschließlich für den Eigenbedarf, denn nur 5% werden exportiert. Die besten Anbaubedingungen bietet der Süden der Hauptinsel Hondo, sowie die Inseln Schikoku und Kiuschu.

Taiwan, bekannt für seine Formosa-Oolongs, liefert im Gegensatz dazu nur Schwarz- und Grüntee minderer Qualität. Die Teegärten liegen in der Region um Taipai, in Taoyuand, Hsinchu und auf den Höhenzügen im Norden.

Kenia gehört zu den jungen Teeländern, dort wird fast ausschließlich Schwarztee produziert. Erst im Jahre 1905 wurde hier die Teepflanze aus Indien eingeführt. Inzwischen ist die Produktion nicht unerheblich und Kenia der größte Teeproduzent Afrikas.

Ein relativ kleines Teeanbaugebiet bietet Nepal. Es liegt im Osten des Landes im mittleren Bergland in direkter Nachbarschaft zum Darjeelinganbaugebiet.

## 1.1 Herstellung von grünem und schwarzem Tee

Der Herstellungsprozess von grünem und schwarzem Tee beginnt mit der Ernte der frischen Teeblätter. Prinzipiell gibt es zwei Arten der Teeblätterernte: die Handernte und die maschinelle Ernte, wobei jeweils die gleichen Qualitätsstandards und deren bestmögliche Umsetzung gilt. Geerntet wird nach dem Prinzip „Two and a bud“ (Abbildung 1), bei dem die Blattknospe und die beiden dazugehörigen Blätter abgeerntet werden. Die Handernte liefert qualitativ besseren Tee, da bei der maschinellen Ernte Beschädigungen am Teeblatt auftreten, die vorzeitige, unerwünschte chemische Reaktionen auslösen. Aufgrund der hohen Personalkosten in einigen Ländern, wie z.B. Japan und Russland, ist eine Handernte allerdings aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten nicht möglich, so dass hier zwangsläufig maschinell geerntet wird. Die Ernte erfolgt in Intervallen von fünf bis fünfzehn Tagen, wobei beim Transport zur Verarbeitung in die Teefabrik darauf Wert gelegt werden muß, dass keine Beschädigungen an den Teeblättern auftreten.

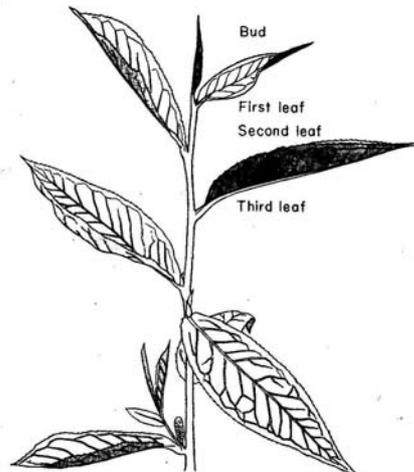


Abbildung 1: Oberer Teil einer Teepflanze (schematisch, nach *Sanderson (1972)*)

Der Unterschied in der Herstellung von grünem und schwarzem Tee liegt in der Aktivität, der im frischen Teeblatt vorhandenen Enzyme. Während bei der Herstellung von grünem Tee jegliche enzymatische Aktivität unerwünscht ist, wird bei der Herstellung von schwarzem Tee für optimale Bedingungen für enzymatische Aktivitäten gesorgt.

So werden bei der Herstellung von grünem Tee die Teeblätter nach der Ankunft in der Fabrik als erstes dem Fixieren unterworfen, um die in den Teeblättern vorhandenen Enzyme schlagartig zu deaktivieren (Abbildung 2). Es gibt zwei prinzipielle Methoden des Fixierens: Bei der in Japan angewendeten Methode (Sen-Cha) werden die Teeblätter in große Trommeln gefüllt und für 45-60 Sekunden mit Wasserdampf behandelt. Anschließend wird durch Einblasen von heißer Luft (90-110 °C) über eine Dauer von 40 bis 50 Minuten der Wassergehalt von 76 auf 50 % gesenkt. Bei der in China beheimateten Pan-firing-Methode erfolgt die Deaktivierung der Enzyme in gusseisernen Pfannen bei 250-300 °C. Ein Anbrennen der Blätter wird durch Bewegung der Pfanne verhindert. Im Laufe des Prozesses wird die Temperatur langsam gesenkt und nach fünfzehn Minuten bei Erreichen eines Wassergehaltes von ca. 50 % in den Teeblättern ist der Vorgang beendet.

Die Reduzierung des Wassergehaltes ist nötig, um die Blätter im anschließendem Prozess ohne Bruch Rollen zu können.

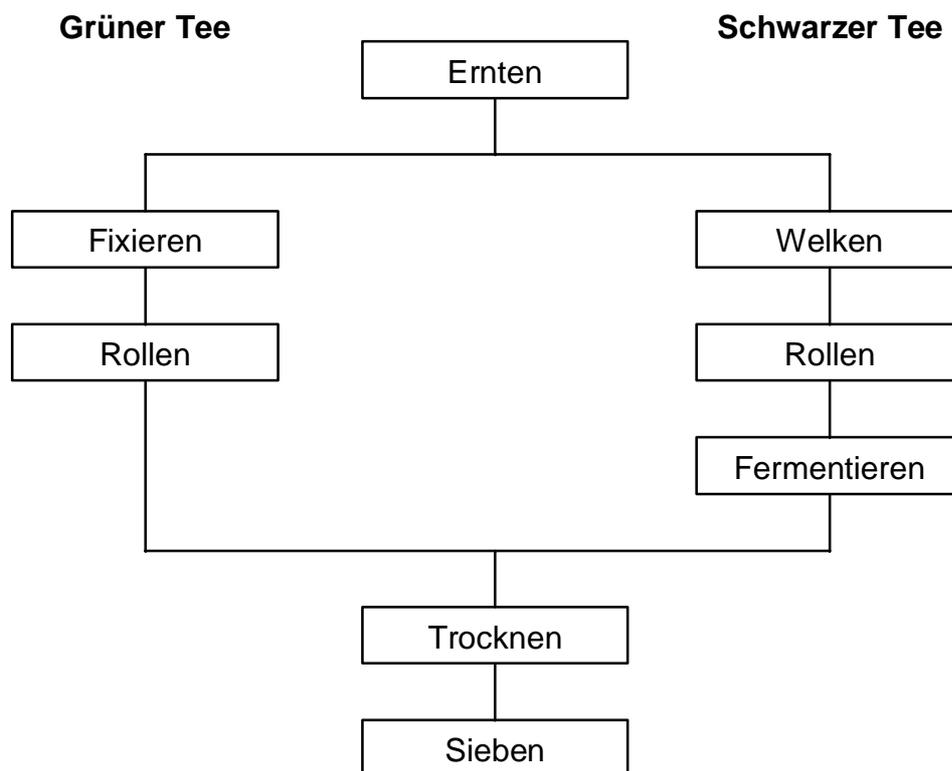


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung von grünem und schwarzem Tee

Im Gegensatz zum grünem Tee werden bei der Herstellung von schwarzen Tee die optimalen Bedingungen für Enzymreaktionen geschaffen (Abbildung 2). Das Welken findet in Welkhäusern statt, wobei die Teeblätter auf Welktröge in einer 15 bis 20 cm flachen Schicht aufgetragen werden. Durch Einblasen von Kalt- und/oder Warmluft bei 25-30 °C wird der ursprüngliche Wassergehalt der Blätter von 75-89 % auf 65-55 % reduziert, so dass diese sich ohne Bruch und Splintern rollen lassen. Um ein gleichmäßiges Welken zu erreichen erfolgt das Einblasen der Luft abwechselnd von oben und unten. Ziel des Welkens ist das langsame Entziehen des Wasser, ohne dass unerwünschte chemische Reaktionen auftreten. Das Welken ist in der Regel nach 12 bis 16 Stunden beendet, aber auch hier gibt es extreme Verfahren, die mit kürzeren oder längeren Welkzeiten arbeiten.

Dem Welken schließt sich das Rollen der Teeblätter an (Abbildung 2). Dieses hat zwei wichtige Bedeutungen bei der Schwarzteeherstellung: Neben der Zerkleinerung des Teeblattes werden auch die Zellwände des Teeblattes zerstört. Dadurch können verschiedene Enzyme in Kontakt mit ihren Substraten treten und der Sauerstoff der Luft kann in das Blatt gelangen. Die Verteilung der Enzyme und der Kontakt mit Sauerstoff sind wichtige Vorbereitungsschritte für die folgende Fermentation. Für die Durchführung des Rollens gibt es verschiedene Methoden: Prinzipiell kann die diskontinuierliche orthodoxe (ursprüngliche) Methode von den kontinuierlichen, neueren Methoden unterschieden werden. Bei der orthodoxen Methode werden die Blätter in einen zylindrischen Trichter gefüllt, der auf einem kreisförmigen Tisch steht, dessen Oberfläche Höhen und Vertiefungen aufweist. Durch gegenläufige Bewegung des Trichters und des Tisches werden die Blätter gerollt und gebrochen. Mittels eines Stempels kann von oben auf die Blätter Druck ausgeübt werden und dadurch die Blattgröße gesteuert werden. Ein Rollvorgang dauert ca. 20 bis 30 Minuten. Danach werden die Blätter nach Größe sortiert und die zu großen Blätter werden erneut gerollt. Das diskontinuierliche Verfahren ist gegenüber dem kontinuierlichen Verfahren teurer und aufwendiger, allerdings produziert es qualitativ besseren Tee. Bei den kontinuierlichen Verfahren gibt es zwei wichtige Typen: Das Crush-Tear-Curl (CTC) und das Lawrie Tea Processor (LTP) Verfahren. Der LTP besteht aus einer mit Messern besetzten Rolle, die von einem Zylinder ummantelt ist. Über einen Zugang werden die Teeblätter eingeführt und durch Drehen der Rolle zerkleinert, nach Beenden können diese über eine Öffnung entfernt werden. Nachteilig bei dieser Methode ist die

aufwendige Wartung der Maschine (Schleifen der Messer), so dass sie von der CTC-Methode heute weitestgehend verdrängt wurde. Die CTC-Methode hat mit der Einführung von Teebeuteln zunehmend an Bedeutung gewonnen, weil hier sehr fein vermahlene Teepulver benötigt wird. Die CTC-Maschine besteht aus mehreren gegenläufigen Walzen, deren Oberflächen auf Zermahlen und Zerquetschen ausgelegt sind. Die Walzen bewegen sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, wodurch ein Zerreißen der Teeblätter erreicht wird. Der Abstand der Walzen zueinander lässt sich ebenfalls regulieren. Während des Rollens wird durch Einblasen von Luft gekühlt, um eine Hitzdeaktivierung der Enzyme zu vermeiden.

Auch die fixierten Grünteeblätter werden gerollt (Abbildung 2). Hierbei wird analog zur Schwarzteeherstellung, durch mechanische Beanspruchung der Blätter die Zellstruktur zerstört, wodurch sich die Inhaltsstoffe in den Teeblättern gleichmäßig verteilen.

Das Fermentieren ist charakteristisch für die Schwarzteeherstellung (Abbildung 2). Ursprünglich wurden die Blätter fermentiert, indem sie auf dem Boden in einer dünnen Schicht ausgebreitet wurden. Heute verwendet man ein kontinuierliches, platzsparendes System: Eine trogähnliche Maschine, in der die Blätter in einer dicken Schicht liegen. In regelmäßigen Abständen wird Sauerstoff durch die Schichten geblasen, während sich die Teeblätter auf einem Förderband durch die Maschine bewegen. In einer Zeitspanne von 40 Minuten bis zu drei Stunden finden die biochemischen Reaktionen statt, die dem schwarzen Tee seinen charakteristischen Geschmack und Geruch verleihen. Die Fermentationsdauer ist dabei abhängig von der Temperatur (34-40 °C) und dem erwünschten Endprodukt. Besonders wichtig ist die genaue Temperatursteuerung, da hiermit die Geschwindigkeit der Reaktionen gesteuert wird.

Nach der Fermentation bei der Schwarzteeherstellung bzw. nach dem Rollen bei der Grünteeherstellung werden die Teeblätter auf einen Wassergehalt von ca. 3 % in sogenannten Fluid Bed Driers getrocknet (Abbildung 2). Diese kontinuierlich arbeitenden Maschinen bestehen aus einer perforierten Platte auf der die Blätter liegen, unterhalb der Platte wird mit Druck heiße Luft zur Trocknung eingeblasen. Die Temperatur ist je nach gewünschter Teesorte unterschiedlich, bewegt sich aber um 130 °C. Der Trocknungsvorgang dauert je nach angewandter Temperatur zwischen 20 und 30 Minuten.

Abschließend werden die fertigen Teeblätter in übereinandergelagerten Rüttel- und Taumelsieben nach verschiedenen Blattgraden (Blattgrößen) sortiert.

Der Tee wird je nach Größe in Blatt-Tee, Broken-Tee, Fannings-Tee und Dust-Tee eingeordnet. Die für die einzelnen Sortierungen verwendeten Begriffe (O=Orange, P=Pekoe, T=Tippy, G=Golden, S=Souchong, F=Flowery, B=Broken, F=Fannings, D=Dust) sind früher verwendete Qualitätsbezeichnungen, welche heute nur noch zur Unterscheidung der Blattgröße benutzt werden.

## 1.2 Chemische Zusammensetzung des frischen Teeblattes

Mit ca. 36% der Trockenmasse eines Teeblattes stellen die phenolischen Verbindungen den größten Anteil dar (Tabelle 1). Diese sind in Flavanole, Proanthocyanidine, phenolische Säuren, Flavonole und Flavone unterteilt. Mit 9 bis 13% der Trockenmasse ist darunter das (-)-Epigallocatechingallat der größte Einzelbestandteil der Trockenmasse eines frischen Teeblattes.

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung des Teeblattes (*Constantinidis et al.; 1995*)

Stoffklasse	% Trockengewicht
Polyphenole	36
Proteine	15
Polysaccharide	13
Cellulose	7
Lignin	6
Mineralstoffe	5
Freie Aminosäuren	4
Monosaccharide	4
Koffein	3
Lipide	3
Organische Säuren	0,5
Chlorophyll u. andere Pigmente	0,5
Theobromin	0,2
Flüchtige Verbindungen	0,1

Während der Herstellung von schwarzem Tee (hauptsächlich bei der Fermentation) werden 90 bis 95% der phenolischen Verbindungen enzymatisch durch Polyphenoloxidasen zu Theaflavinen und Thearubigenen oxidiert, welche dem schwarzen Tee seine charakteristische Farbe verleihen. In grünem Tee geben die bereits im frischen Teeblatt vorhandenen, Flavonole und Flavone dem Grünteetränk seine Farbe.

Die freien Aminosäuren Asparaginsäure, Threonin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Histidin, Arginin, Glutamin, Asparagin, Tryptophan und Theanin wurden im frischen Teeblatt identifiziert. Unter diesen ist mengenmäßig, mit fast 1 % des Trockengewichtes und 50 % der Gesamtaminosäuren, Theanin die mengenmäßig dominierende Aminosäure (Abbildung 3).

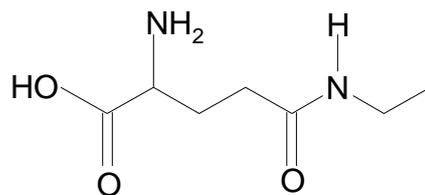


Abbildung 3: Strukturformel von Theanin

Die im Teeblatt vorhandenen Pigmente (ca. 0,5% der Trockenmasse) lassen sich in Chlorophyll und Carotinoide einteilen. Der Chlorophyllabbau bei der Herstellung von schwarzem Tee zu den braunen Phäophorbiden beginnt beim Welken, welche beim abschließenden Trocknen in die schwarzen Phäophytine umgewandelt werden. Dies ist ein wichtiger Prozess für die spätere Farbe der Teeblätter. Mehr als 16 verschiedene Carotinoide wurden bisher im Teeblatt identifiziert, von denen  $\beta$ -Carotin mit 90% den größten Anteil stellt.

Der Lipidgehalt im frischen Teeblatt liegt bei etwa 3% der Trockenmasse. Ungefähr 60% des Gesamtlipidgehaltes sind Glykolipide, die zu einem hohen Anteil die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure und Linolensäure enthalten. Während des Rollens und der Fermentation des Teeblattes werden die ungesättigten Fettsäuren durch das Enzym Lipoxygenase unter Bildung von flüchtigen Verbindungen gespalten.

Ein großer Prozentsatz der Trockenmasse des Teeblattes besteht aus Proteinen (15%). Ein Teil dieser Proteine wird bei der Herstellung von schwarzem Tee während des Welkens in die freien Aminosäuren gespalten. Der größte Teil der Proteinfraction entfällt aber auf Enzyme. Polyphenoloxidasen sind an der Bildung von Theaflavinen und Thearubigenen beteiligt, Lipoxygenase katalysiert den Abbau von Linolensäure und  $\beta$ -Glykosidase (Yano *et al.*, 1990) und  $\beta$ -Primeverosidase (Guo *et al.*, 1996; Ijima *et al.*, 1998) spalten Terpenalkoholglykoside unter Bildung von flüchtigen Verbindungen.

### 1.3 Flüchtige Verbindungen im grünen und schwarzen Tee

Auf dem Gebiet des Teearomas wird bereits seit über 160 Jahren geforscht. Die ersten wissenschaftlichen Arbeiten über die flüchtigen Verbindungen in frischen Teeblättern, sowie grünem und schwarzem Tee sind im Review von *Constantinidis et al. (1995)* zusammengefasst. Eine der ersten Untersuchungen führte Mulder 1838 durch und erkannte, dass in unbehandelten Teeblättern beträchtliche Mengen an Aromaölen enthalten sind.

Im Zeitraum zwischen 1934 und 1940 veröffentlichten die Forschergruppen um Yamamoto und Takei zahlreiche Arbeiten zur Identifizierung von flüchtigen Verbindungen. Während Takei hauptsächlich grünen Tee und frische Teeblätter untersuchte, arbeitete Yamamoto am schwarzen Tee aus Taiwan. Die beiden Forschergruppen entdeckten insgesamt über 30 neue Verbindungen sowohl in frischen Teeblättern, im grünen Tee als auch im schwarzen Tee. Insgesamt identifizierten sie 70% der flüchtigen Verbindungen des Teearomaöles, darunter unter anderem (Z)-3-Hexenol, Benzylalkohol, Geraniol und Linalool.

Mit der Einführung der Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) erfuhr auch die Erforschung des Teearomas einen Aufschwung. Nun war es möglich Aromastoffe einfacher zu identifizieren und die Nachweisgrenze konnte deutlich im Vergleich zu den bisherigen Verfahren gesenkt werden. Dies führte zu einer Vielzahl von neuen Identifizierungen von flüchtigen Verbindungen im frischen Teeblatt sowie im grünen und schwarzen Tee.

#### Flüchtige Verbindungen im schwarzen Tee

*Bondarovich et al. (1967)* nutzen als erste die GC/MS, um flüchtige Verbindungen im schwarzen Tee zu identifizieren. Die flüchtigen Verbindungen wurden mittels Wasserdampfdestillation isoliert und anschließend wurde das Destillat mit Lösungsmittel extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde durch präparative Gaschromatographie in 15 Fraktionen zerlegt und die einzelnen Verbindungen wurden durch Vergleich der Retentionsindizes, der Massenspektren, der Infrarot und gegebenenfalls der UV-Spektren gegen die Reinsubstanzen identifiziert. *Bondarovich et al.* identifizierten mit dieser Methode 100 flüchtige Verbindungen im Schwarztee, von denen knapp die Hälfte bis zu diesem Zeitpunkt im schwarzen Tee nicht bekannt waren. Unter anderem gelang

den Forschern erstmalig die Identifizierung von (E,E)-2,4-Decadienal,  $\beta$ -Ionon und 2-Methylbutanal im schwarzen Tee.

1974 untersuchten *Renold et al.* ein Schwarztee pulver in Hinblick auf neue flüchtige Verbindungen, wobei sie sich auf Aldehyde, Ketone und Ester spezialisierten. Sie isolierten die flüchtigen Verbindungen nach Heißwasserextraktion mittels kombinierter Wasserdampf/Hexan Destillation. Die Identifizierung erfolgte durch GC/MS und Vergleich der Retentionsindizes mit den Reinsubstanzen. *Renold et al.* entdeckten insgesamt 68 flüchtige Verbindungen im schwarzen Tee, die bisher nicht beschrieben waren. Dabei unter anderen (E)-2-Nonenal, (E,E)-2,4-Nonadienal, (E,Z)-2,6-Nonadienal und (E)- $\beta$ -Damascenon.

*Vitzthum et al.* (1975) benutzten zur Extraktion des Schwarztee pulvers überkritisches Kohlendioxid. Die flüchtigen Verbindungen isolierten sie durch Wasserdampfdestillation des erhaltenen Extraktes und anschließender Lösungsmittlextraktion. Den fertigen Extrakt teilten sie in eine basische und eine neutrale Fraktion auf. Die Identifizierung der flüchtigen Verbindungen erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit den Referenzsubstanzen. Insgesamt entdeckten *Vitzthum et al.* 56 flüchtige Verbindungen im schwarzen Tee - hauptsächlich aus den Verbindungsklassen der Pyridine, Pyrazine, Thiazoline, Quinoline, aromatischen Amine und Amide -, die bis zum damaligen Zeitpunkt nicht im Tee identifiziert worden waren.

In zwei weiteren Veröffentlichungen beschrieben *Mick et al.* (1984) insgesamt 175 neue flüchtige Verbindungen im Schwarzteegetränk. In beiden Untersuchungen wurden die flüchtigen Verbindungen analog zum Aufbrühen durch heißes Wasser aus dem Tee pulver extrahiert. Nach Abtrennen der unlöslichen Bestandteile durch Filtration wurde eine Wasserdampfdestillation unter Vakuum durchgeführt, bevor die flüchtigen Verbindungen durch Lösungsmittel aus dem Destillat isoliert wurden. Die erste Untersuchung von *Mick et al.* beschäftigte sich mit den organischen Säuren im schwarzen Tee. Dazu wurden aus dem erhaltenen Lösungsmittlextrakt die aciden Verbindungen durch eine pH-Fraktionierung isoliert und die organischen Säuren für die GC/MS Analyse methyliert. Insgesamt wurden 69 organische Säuren im schwarzen Tee gefunden, davon waren 42 bis dato im schwarzen Tee nicht bekannt. In der zweiten Untersuchung von *Mick und Schreier (1984)* wurden die neutralen und basischen

Verbindungen im Schwarzteegetränk untersucht. Der erhaltene Lösungsmittelextrakt wurde mittels einer Kieselgelsäulenchromatographie in vier Fraktionen eingeteilt. Die Identifizierung der flüchtigen Verbindungen erfolgte durch GC/MS. 133 neue Schwarzteekomponenten aus den Verbindungsklassen der Hydrocarbone, Ester, Lactone, Phenole, Aldehyde und Ketone wurden in dieser Veröffentlichung beschrieben.

Bis dato sind ca. 600 flüchtige Verbindungen im schwarzen Tee bekannt. Die flüchtigen Verbindungen sind nach der Stoffklasse geordnet in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Flüchtige Verbindungen im schwarzen und grünen Tee nach Verbindungsklassen geordnet (TNO, 1996)

Substanzklasse	Anzahl	
	schwarzer Tee	grüner Tee
Kohlenwasserstoffe	52	35
Alkohole	68	39
Aldehyde	75	35
Ketone	81	38
Carbonsäuren	74	20
Ester	89	22
Lactone	18	6
Phenole	13	14
Basen	64	34
schwefelhaltige Verbindungen	19	3
Furane	21	14
(Ep)oxide, Pyrane, Cumarine	9	7
Acetale, Nitrile, Amide, Oxazoline, Anhydride, Phthaline	8	6
<b>Gesamt</b>	<b>591</b>	<b>273</b>

*Fischer et al.* quantifizierten 1987 einige flüchtige Verbindungen im einem Schwarztee aus Ceylon. Nach einer Wasserdampfextraktion des Teepulvers wurden die flüchtigen Verbindungen aus dem Destillat durch Lösungsmittelextraktion isoliert. Der Extrakt wurde eingeengt und nach Zugabe eines internen Standards mittels GC/MS vermessen. Die gemessenen Peakflächen der flüchtigen Verbindungen wurden ins Verhältnis zur Fläche des internen Standards gesetzt und daraus der Gehalt errechnet. Die erhaltenen quantitativen Daten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Konzentrationen flüchtiger Verbindungen im schwarzen Tee nach *Fischer et al. (1987)*

<b>Verbindung</b>	<b>mg/kg</b>	<b>Verbindung</b>	<b>mg/kg</b>
1-Penten-3-ol	4,1	3-Methylbuttersäure	4,4
(E)-2-Hexenal	1,6	$\alpha$ -Terpineol	0,9
1-Pentanol	1,8	cis-Linalooloxid (pyr.)	0,9
(Z)-2-Penten-1-ol	5,5	Methylsalicylat	8,9
1-Hexanol	1,9	trans-Linalooloxid (pyr.)	2,3
(Z)-3-Hexen-1-ol	11,9	Hexansäure	8,2
(E)-2-Hexen-1-ol	4,1	Geraniol	5,2
cis-Linalooloxid (fur.)	3,3	Benzylalkohol	3,7
trans-Linalooloxid (fur.)	10,6	2-Phenylethanol	7,8
Benzaldehyd	3,1	2-Acetylpyrrol	3,4
Linalool	15,8	Phenol	0,4
2-Methylpropionsäure	1,4		

1967 untersuchten erstmals *Saijo et al.*, wie sich die Konzentrationen der flüchtigen Verbindungen während der Schwarzteeherstellung ändern. Sie untersuchten frische Teeblätter und Schwarzteegetränk nach Extraktion gaschromatographisch und gaben die Konzentrationen der einzelnen flüchtigen Verbindungen als Prozentsatz der Gesamtpeakfläche an. Einige flüchtige Verbindungen, z.B. (Z)-3-Hexen-1-ol und Benzaldehyd, lagen in den frischen Teeblätter in relativ höheren Mengen vor als im Schwarztee. Andererseits gab es aber auch flüchtige Verbindungen, unter anderem Phenylacetaldehyd und (E)-2-Hexenal, die im Schwarztee in vergleichsweise höheren Mengen vorkamen.

Ravichandran und Parthiban (1998) griffen die Thematik wieder auf und untersuchten die Konzentrationen von ausgewählten flüchtigen Verbindungen im frischen, im gewelkten, im fermentierten und im getrocknetem Teeblatt. Dazu extrahierten sie die flüchtigen Verbindungen mittels der Simultanen Destillation und Extraktion (SDE) Methode, wobei das Teepulver mit heissem Wasser (70°C) unter Vakuum extrahiert und destilliert wurde. Die Konzentrationsangaben erfolgten als Verhältnis der Peakflächen zum internen Standard. Bereits im frischen grünen Teeblatt waren flüchtigen Verbindungen vorhanden, deren Konzentrationen sich während des Welkens und der Fermentation änderten. Einige Konzentrationen nahmen stark zu, z.B. Linalool und Geraniol (Tabelle 4), andere blieben gleich, z.B. 2-Phenylethanol und wiederum andere Konzentrationen von flüchtigen Verbindungen sanken, wie z.B. Benzylalkohol und Methylsalicylat.

Die Summe der von den Autoren ermittelten flüchtigen Verbindungen zeigte eine starke Konzentrationszunahme während des Welkens und der Fermentation und eine Konzentrationsabnahme nach dem Trocknen. Erstaunlich war, dass die Summe der gemessenen flüchtigen Verbindungen beim frischen Teeblatt und vom Schwarzteepulver nicht stark unterschiedlich waren. Somit änderte sich die Gesamtkonzentration der flüchtigen Verbindungen während der Schwarzteeherstellung nicht signifikant, aber deren Zusammensetzung.

Tabelle 4: Veränderungen der Konzentrationen (Flächenverhältnis zum internen Standard Ethylcaproat) von flüchtigen Verbindungen während der Schwarzteeherstellung nach *Ravichandran und Parthiban (1998)*

Verbindung	Flächenverhältnis zu Ethylcaproat (0,1mg)			
	frisches Teeblatt	gewelktes Teeblatt	fermentiertes Teeblatt	getrocknetes Teeblatt
1-Penten-3-ol	0,27	0,39	0,38	0,09
n-Hexanal	1,09	1,21	1,33	0,29
n-Hexanol	1,97	6,03	3,11	0,08
(Z)-3-Hexenal	0,90	1,47	2,36	0,41
(E)-2-Hexenal	1,73	3,49	7,26	3,02
(Z)-3-Hexen-1-ol	1,27	4,32	2,87	0,11
(E)-2-Hexen-1-ol	0,21	0,47	1,31	0,15
Pentanol	0,19	0,25	0,08	0,08
Linalool	0,14	0,86	1,21	0,90
Linalooloxide	0,02	0,04	0,19	0,15
Methylsalicylat	1,37	1,57	0,58	0,51
Phenylacetaldehyd	0,66	0,84	1,33	1,29
Geraniol	0,41	0,77	1,21	1,07
Benzylalkohol	0,39	0,18	0,15	0,13
2-Phenylethanol	0,51	0,53	0,57	0,44
Benzaldehyd	0,21	0,09	0,07	0,09
$\alpha$ -Ionon	0,15	0,36	0,27	0,39
$\beta$ -Ionon	0,09	0,27	0,22	0,31
Summe	11,58	23,14	24,5	9,51

## **Flüchtige Verbindungen im frischen Teeblatt und im grünen Tee**

Die ersten Identifizierungen von flüchtigen Verbindungen in frischen Teeblättern und grünem Tee wurden von Takei im Zeitraum von 1934 bis 1938 durchgeführt.

Die ersten gaschromatographischen Identifizierungen im frischen Teeblatt wurden von *Yamanishi et al.* (1963) durchgeführt. Die frischen Teeblätter wurden mit Diethylether extrahiert und die flüchtigen Verbindungen mittels Wasserdampfdestillation unter Vakuum bei 50°C isoliert. Die erhaltenen Wasserextrakte wurden mit Diethylether ausgeschüttelt und anschliessend eingengt. Insgesamt wurden 27 flüchtige Verbindungen gaschromatographisch aufgrund ihrer Retentionszeit identifiziert, von denen fünf bis zu diesem Zeitpunkt nicht im Tee bekannt waren. Die fünf neu identifizierten flüchtigen Verbindungen waren Isoamylacetat, Salicylaldehyd, Benzylacetat, Indol und Skatol.

Zwei Jahre später untersuchten *Yamanishi et al.* (1965) erneut frische Teeblätter. Die Aufarbeitungsmethode wich nicht von der bereits 1963 beschriebenen ab. Zur Konzentrierung der Verbindungen wurde das Gaschromatogramm in zwölf Fraktionen unterteilt und jede mehrmals präparativ gesammelt. Die Identifizierung der einzelnen flüchtigen Verbindungen in den Fraktionen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit mit Referenzsubstanzen, durch Massenspektrometrie, durch Infrarotspektroskopie und durch Papierchromatographie nach Derivatisierung. Insgesamt identifizierten *Yamanishi et al.* 42 flüchtige Verbindungen, von denen vier bisher nicht im Tee beschrieben waren.

*Nose et al.* (1971) benutzten die selbe Extraktionstechnik wie *Yamanishi et al.* (1963 und 1965) zur Isolierung der flüchtigen Verbindungen aus frischen Teeblättern. Nach der Extraktion wurde der Extrakt mittels Säulenchromatographie in 13 Fraktionen zerlegt und die einzelnen flüchtigen Verbindungen gaschromatographisch, massenspektrometrisch und aufgrund von Infrarotspektren identifiziert. Es wurden insgesamt 57 flüchtige Verbindungen identifiziert, von denen 27 bisher nicht im frischen Teeblatt beschrieben waren.

Die flüchtigen Verbindungen von grünem Tee wurden erstmal 1981 von *Yamaguchi und Shibamoto* analysiert. Nach Wasserdampfdestillation wurde das Destillat mit Lösungsmittel extrahiert und der erhaltene Extrakt konzentriert, bevor dieser mittels GC/MS untersucht wurde. Insgesamt wurden 97 flüchtige Verbindungen identifiziert, von denen 13 bisher nicht im frischen Teeblatt bekannt waren.

Bis heute sind knapp 300 flüchtige Verbindungen im grünen Tee bekannt welche nach Stoffklasse geordnet in Tabelle 2 aufgelistet sind.

Einige Quantifizierungen von flüchtige Verbindungen in einem chinesischen Grüntee führten *Fischer et al.* (1987) durch. Nach einer Wasserdampfextraktion des Teepulvers wurden die flüchtigen Verbindungen aus dem Destillat durch Lösungsmittlextraktion isoliert. Der Extrakt wurde eingeeengt und nach Zugabe eines internen Standards mittels GC/MS vermessen. Die gemessenen Peakflächen der flüchtigen Verbindungen wurden ins Verhältnis zur Fläche des internen Standards gesetzt und daraus der Gehalt errechnet. Die erhaltenen quantitativen Daten sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Konzentrationen flüchtiger Verbindungen im grünen Tee nach *Fischer et al.* (1987)

<b>Verbindung</b>	<b>mg/kg</b>	<b>Verbindung</b>	<b>mg/kg</b>
1-Penten-3-ol	2,7	2,6,6-Trimethyl-2-hydroxycyclohexanon	1,3
1-Pentanol	0,7	Methylsalicylat	0,1
(Z)-2-Penten-1-ol	1,8	Geranylaceton	0,5
6-Methyl-5-Hepten-2-on	0,6	Geraniol	0,5
(Z)-3-Hexen-1-ol	0,8	Benzylalkohol	0,4
2-Octanol	0,7	2-Phenylethanol	0,1
Benzaldehyd	0,2	β-Ionon	0,3
Linalool	0,2	Citronellol	0,5
1-Octanol	1,1	Dihydroactinidiolid	0,4

## 1.4 Methoden zur Identifizierung aromarelevanter Verbindungen

Aromastoffe sind flüchtige Verbindungen, die mit den in der Nase befindlichen Rezeptoren des Geruchssinns wahrgenommen werden können (*Belitz et al., 2001*). Aufgenommen werden die Aromastoffe entweder orthonasal über die Nase, wobei Stoffe detektiert werden, die sich im Gasraum über dem Lebensmittel befinden oder die Wahrnehmung erfolgt retronasal über den Rachen beim Kauen. Zu beachten ist, dass sich die Aromastoffzusammensetzung beim Kauen im Mund ändern kann, wodurch sich der Geruch eines Lebensmittels beim orthonasalen Riechen ändern kann.

Voraussetzung für einen Aromastoff ist eine ausreichende Flüchtigkeit, wobei nicht jede flüchtige Substanz gleichzeitig auch aromaaktiv ist. Erst wenn eine bestimmte stoffspezifische Konzentration der flüchtigen Verbindung (Geruchsschwelle) in der Nase erreicht ist, wird ein Nervenimpuls ausgelöst, welchen das Gehirn als Geruch interpretiert. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es nicht verwunderlich, dass nur ein kleiner Anteil der im Lebensmittel vorkommenden flüchtigen Verbindungen als Aromastoffe den Geruch eines Lebensmittels prägt.

Die Aufgabe der modernen Forschung ist, diese Aromastoffe zu identifizieren und deren Relevanz für das Lebensmittel zu ermitteln. Darum ist es zwingend erforderlich eine Analytikmethode zu nutzen, die modernste analytische Methoden mit dem zur Zeit empfindlichsten und selektivsten Aromastoffdetektor, der menschlichen Nase, kombiniert.

Zur Charakterisierung wichtiger Aromastoffe eines Lebensmittels werden, basierend auf dem Konzept von Grosch und Schieberle (*Grosch, 1993 a und b; Schieberle, 1995*) folgende Untersuchungen, unterteilt in vier Schritten, durchgeführt:

- Erstellung eines repräsentativen Aromaextraktes
- Identifizierung der durch Verdünnungsexperimente ermittelten aromaaktiven Verbindungen
- Quantifizierung und Berechnung der Aromawerte
- Aromasimulation durch Rekombination der quantifizierten Aromastoff mittels Referenzverbindungen

Im Folgenden werden diese Schritte näher erläutert.

### 1.4.1 Isolierung der flüchtigen Verbindungen

Der erste Schritt auf der Suche nach den wichtigen Aromastoffen eines Lebensmittels ist die Erstellung eines repräsentativen Aromaextraktes. Der Extrakt sollte optimalerweise die Aromastoffe im gleichen Verhältnis wie das Lebensmittel aufweisen, die Aromastoffe in konzentrierter Form enthalten und frei von Verunreinigungen sowie nichtflüchtigen Bestandteilen sein. Dazu ist es erforderlich, dass die Aufarbeitung schonend, das heißt bei moderaten Temperaturen erfolgt, um Verluste von Aromastoffen z.B. durch thermischen Abbau zu verhindern. Eine weitere Gefahr bei höheren Temperaturen ist die Bildung von Artefakten.

Das Untersuchungsmaterial wird daher i.d.R. mit einem leicht siedenden Lösungsmittel (Diethylether oder Dichlormethan) erschöpfend bei Raumtemperatur extrahiert, bevor die flüchtigen Bestandteile mit Hilfe einer Hochvakuumdestillation isoliert (*Schieberle, 1995*) und abschließend schonend konzentriert werden.

Eine alternative Methode der Isolierung von Aromastoffen stellt die simultane Destillation/Extraktion (SDE) nach *Likens und Nickerson (1964)* dar. Allerdings ist hier durch die thermische Belastung mit Verlusten von Aromastoffen, Artefaktbildung und Freisetzung weiterer Aromastoffen aus Precursoren zu rechnen.

### 1.4.2 Identifizierung der relevanten Aromastoffe

Zur Erfassung der relevanten Aromastoffe wird der Extrakt mittels Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC/O) (*Day et al., 1957; Fuller et al., 1964*) untersucht. Bei dieser Technik wird durch Splitten des Trägergases nach der Säule die Probe simultan über den Flammenionisationsdetektor (FID) und der Nase (Olfaktometrie) detektiert. Während ein Säulenende zum FID führt, an dem die Retentionszeit bestimmt wird, endet das andere an einem beheizten Ausgang, an dem durch Riechen die Geruchsqualität bestimmt wird. Die Probenaufgabe erfolgt cold-on-column um eine Zerstörung thermolabiler Aromastoffe zu vermeiden. Ein großer Vorteil der Olfaktometrie ist, neben der Erfassung der Geruchsqualität, die höhere Empfindlichkeit der Nase gegenüber hochpotenten Aromastoffen im Vergleich zum FID. Natürlich ist die Erfassung von Aromastoffen aus Lebensmitteln mit Hilfe der HRGC/O abhängig von der aufgearbeiteten Probenmenge und der Aufarbeitungsmethode. Außerdem liefert sie keine Aussage über den prozentualen Beitrag eines Aromastoffes zum Gesamtaroma des Lebensmittels.

Zur Erfassung der relativen Bedeutung der Aromastoffe mit Hilfe einer schnellen, leicht durchzuführenden Methode wurde basierend auf der schrittweisen Verdünnung des Aromadestillates (*Schmid und Grosch, 1986; Ulrich und Grosch, 1987*) die Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) (*Schieberle und Grosch, 1987a*) entwickelt. Hierbei wird das Aromadestillat sukzessive 1+1 (v/v) mit Lösungsmittel verdünnt und jede Verdünnungsstufe mittels HRGC/O untersucht bis kein Aromastoff mehr olfaktometrisch detektiert wird. Die letzte Verdünnungsstufe, in der ein Aromastoff noch olfaktometrisch bestimmt werden kann, ist sein Flavor-Dilution (FD) Faktor.

Mit Hilfe der erhaltenen FD-Faktoren kann die relative Bedeutung der Aromastoffe für das Untersuchungsmaterial abgeschätzt werden. Es müssen allerdings bei der Bewertung der FD-Faktoren folgende Fakten berücksichtigt werden:

Erstens wird bei der gaschromatographischen Analyse die Probe vollständig verdampft und somit werden schwerflüchtige Verbindungen gegenüber leichtflüchtigen überbewertet. Des Weiteren wird beim Betrachten des FD-Faktors die Beeinflussung der Aromastoffe im Lebensmittel durch die Polarität der Matrix nicht berücksichtigt. So werden polare Aromastoffe in einer polaren Matrix (z.B. Wasser) und unpolare in einer unpolaren Matrix (z.B. Fett) überbewertet. Letztlich können Verluste bei der Aufarbeitung das Ergebnis beeinflussen.

Bei der AEVA werden zudem Aromastoffe, die mit dem Lösungsmittel coeluiieren und leichtflüchtige Aromastoffen, die bei der Destillation verloren gehen, nicht erfasst. Diese Aromastoffe können aber durch Analyse von statischen Headspaceproben detektiert werden. Hierbei wird eine definierte Menge an Kopfraumvolumen des Untersuchungsmaterials eingesetzt und die Aromastoffe über Headspace-HRGC/O analysiert. Durch schrittweise Halbierung des eingesetzten Volumens kann analog zur Aromaextraktverdünnungsanalyse ein Verdünnungsfaktor bestimmt werden. Er ist definiert als Quotient aus dem Ausgangsvolumen und dem kleinsten Volumen, bei dem der Geruchseindruck am Sniffing-Port noch wahrgenommen wird.

Die durch Aromaextraktverdünnungsanalyse und Verdünnungsanalyse statischer Headspaceproben erhaltenen Geruchseindrücke müssen den jeweiligen Aromastoffen zugeordnet werden. Für eine zweifelsfreie Identifizierung müssen dabei folgende Kriterien mit der Referenzsubstanz übereinstimmen :

- die Geruchsqualität und die Geruchsschwelle (Luft)
- die Retentionsindizes auf mindestens zwei Säulen unterschiedlicher Polarität
- die Massenspektren, aufgenommen im EI- und CI-Modus

Folgende Untersuchungen mittels AEVA wurden bereits im Bereich grüner und schwarzer Tee durchgeführt:

Guth und Grosch (1993e) untersuchten das Pulver eines chinesischen Schwarztees. Sie detektierten bei der Aufarbeitung von insgesamt 200g Schwarzteepulver 28 Aromastoffe mit einem FD-Faktor von vier oder höher. Als Aromastoffe mit den höchsten FD-Faktoren ermittelten sie 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon, (E)- $\beta$ -Damascenon, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon und Linalool. In der Arbeit wurden neun Verbindungen identifiziert, die bisher nicht im schwarzen Tee bekannt waren, darunter die Aromastoffe 3-Methyl-2,4-nonandion, (Z)-4-Heptenal und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon.

Sieben Jahre später führten Kumazawa und Masuda (2000) ebenfalls eine AEVA aber an einem Schwarzteegetränk aus dem Darjeeling Anbaugebiet durch. Als Aromastoff mit dem höchsten FD-Faktor identifizierten sie Linalool, gefolgt von den Aromastoffen Geraniol, (E,Z)-2,6-Nonadienal, Phenylacetaldehyd, Methylsalicylat, (E)- $\beta$ -Damascenon und Hexansäure.

Guth und Grosch (1993e) führten auch eine AEVA an einem chinesischen Grünteepulver durch. Bei der Aufarbeitung von 200g Teepulver entdeckten sie 25 Aromastoffe mit einem FD-Faktor von 4 oder höher. Sie identifizierten (Z)-1,5-Octadien-3-on, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon, 3-Methyl-2,4-nonandion und (Z)-4-Heptenal als Aromastoffe mit den höchsten FD-Faktoren. Insgesamt identifizierten sie 18 Verbindungen, die bisher nicht im Grünteepulver bzw. Grünteetegetränk bekannt waren, darunter unter anderem 3-Methyl-2,4-nonandion, (Z)-4-Heptenal und (E)- $\beta$ -Damascenon.

AEVAs am Grünteegetränk wurden in den Jahren 1999 und 2002 auch von Kumazawa und Masuda durchgeführt. Insgesamt untersuchten sie drei verschiedene Grünteegetränke (Sen-cha, Kamairi-cha, Longjing tea). Als Aromastoffe mit hohen FD-Faktoren identifizierten sie (Z)-1,5-Octadien-3-on, 2-Acetyl-1-pyrrolin, Methional, 3-Methyl-2,4-nonandion, (E,Z)-2,6-Nonadienal, 4-Mercapto-4-methyl-2-pentanon und 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazin. Die bedeutendsten Unterschiede in den FD-Faktoren der verschiedenen Grünteesorten wurden bei den Aromastoffen 2-Acetyl-1-pyrrolin, Phenylacetaldehyd, 2-Methoxyphenol und 4-Nonanolid beobachtet.

### **1.4.3 Quantifizierung der relevanten Aromastoffe und Berechnung des Aromawertes**

Die Aromaextraktverdünnungsanalyse in Kombination mit der Aromaverdünnungsanalyse führt nur zu einer Abschätzung der Bedeutung der einzelnen Aromastoffe. Für eine definierte Gewichtung ist eine Quantifizierung der durch die Verdünnungsanalysen ermittelten Aromastoffe nötig.

Eine Quantifizierung erfolgt in der Regel mittels eines internen Standards mit möglichst ähnlicher Struktur, um Verluste bei der Aufarbeitung auszuschließen. Trotzdem treten Unterschiede zwischen Standard und Analyt auf, die das Quantifizierungsergebnis verfälschen. Um diese Unterschiede auszugleichen, wurde die Isotopenverdünnungsanalyse, die 1966 von *Sweeley et al.* zur Bestimmung von Glucose entwickelt wurde, von *Schieberle und Grosch (1987b)* erstmals in der Aromaforschung eingesetzt.

Bei dieser Methode werden als interner Standard stabile Isotope der Analyten verwendet. Eine Markierung erfolgt entweder mit  $^{13}\text{C}$  oder  $^2\text{H}$  Isotopen. Die Isotopomere unterscheiden sich von den untersuchten Aromastoffen chemisch und physikalisch nur minimal, so dass Verluste bei der Aufarbeitung durch Extraktion, Destillation und Labilität der Aromastoffe, ideal kompensiert werden.

Die Quantifizierung erfolgt mittels HRGC/MS mit chemischer Ionisation, da in diesem Modus sowohl eine niedrige Bestimmungsgrenze, wie auch eine hohe Selektivität erreicht wird, so dass mit der Isotopenverdünnungsanalyse eine Quantifizierung von labilen Verbindungen im Spurenbereich möglich ist.

Um den Einfluss der quantifizierten Aromastoffe auf das Gesamtaroma zu ermitteln, ist es aber nicht ausreichend nur die Konzentrationen zu betrachten, denn jede flüchtige Verbindung hat einen unterschiedlichen Verteilungsquotient zwischen Matrix und Gasraum und somit einen unterschiedlichen Geruchsschwellenwert. Um diesen zu ermitteln, werden Untersuchungen in einer zum Untersuchungsmaterial möglichst identischen Matrix durchgeführt. Durch schrittweise Verringerung der Konzentration werden die Schwellenwerte mittels eines Triangeltestes von einem geschulten Sensorikpanel ermittelt. Die Konzentration, in welcher der Aromastoff gegen zwei Blindproben erkannt wird, ist der niedrigste Schwellenwert dieses Aromastoffes in der untersuchten Matrix.

Der von *Rothe und Thomas (1963)* eingeführte Aromawert, der sich aus dem Quotient der Konzentration des Aromastoffes im Lebensmittel und des Schwellenwertes des Aromastoffes in einer zum Lebensmittel idealerweise identischer Matrix errechnet, ermöglicht somit eine objektive Bewertung des Aromastoffes im Hinblick auf die Matrix des Lebensmittels. Ein Aromastoff trägt laut Definition erst zum Gesamtaroma bei, wenn sein Aromawert größer eins ist. Ausnahmen können hier durch synergistische Effekte von zwei oder mehr Aromastoffen mit gleichem Aromaeindruck und Aromawerten knapp unter eins auftreten.

Der Aromawert gibt an, um welchen Faktor ein Aromastoff über seiner Geruchsschwelle im Lebensmittel auftritt. Dadurch kann der Beitrag der Aromastoffe zum Aroma des Lebensmittels abgeschätzt werden.

Die in späteren Arbeiten verwendete Begriffe „Odor Unit“ (*Guadagni et al., 1966*), „Odor Value“ (*Mulders, 1973*) und „Odor Activity Value“ (*Acree et al., 1984*) sind identisch zu der oben angeführten Bezeichnung „Aromawert“.

Dieses Konzept wurde allerdings bisher nicht auf Tee bzw. Teegetränke angewendet.

#### 1.4.4 Aromasimulation

Beim Aromawertkonzept werden die Aromastoffe einzeln betrachtet. Im Lebensmittel können aber Aromastoffe durch synergistische (*Meilgaard, 1982; Widder und Grosch, 1994*) und suppressive (*Blank und Grosch, 1991; Blank et al., 1992*) Effekte andere Aromastoffe beeinflussen. Diesen Einfluss analysiert man durch Erstellen eines Rekombinates und durch gezieltes Weglassen einzelner Verbindungen (Weglassversuche). Beim Aromarekombinat werden die quantifizierten Aromastoffe in ihrer „natürlichen“ Konzentration in einer lebensmittelnahen Matrix gemischt und das Rekombinat von einem geschulten Sensorikpanel mit dem Lebensmittel verglichen.

Durch Ausführung der genannten Schritte des Aromamodells wurden in den letzten Jahren unter anderem sehr gute Aromasimulationen für handgepressten Grapefruitsaft (Büttner und Schieberle, 2001a), Orangensaft (Büttner und Schieberle, 2001b), sowie auch Kaffee (Czerny et al., 1999) erhalten.

## 1.5 Aufgabenstellung

Viele Untersuchungen der Literatur beschäftigten sich mit der Identifizierung von flüchtigen Verbindungen im grünen und schwarzen Tee. Aber nur in sehr wenigen Arbeiten wurde die Aromarelevanz der identifizierten flüchtigen Verbindungen näher untersucht. Eine systematische Analyse der Aromastoffe bis hin zur Aromasimulation, wie sie im Punkt 1.4 beschrieben ist, wurde bisher weder für die Aromastoffe von grünem noch von schwarzem Tee, sowohl bei Teepulver als auch beim Teegetränk, durchgeführt.

Im Rahmen der Arbeit sollten daher zunächst die aromaaktiven Verbindungen von Schwarzteepulver und einem daraus hergestellten Schwarzteegetränk mittels der Aromaextraktverdünnungsanalyse ermittelt werden und anschließend die Verbindungen mit den höchsten FD-Faktoren quantifiziert werden. Für das Schwarzteegetränk sollte mit Hilfe der Schwellenwerte, die Aromawerte berechnet werden und abschließend sollte die Simulation des Gesamtaromas durch Aromarekombination erfolgen.

Als nächstes sollten die aromaaktiven Verbindungen von Grünteepulver und Grünteetegetränk ermittelt werden. Auch hier sollte zuerst eine Aromaextraktverdünnungsanalyse durchgeführt werden und folgend die wichtigsten Verbindungen mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse quantifiziert werden. Für das Grünteetegetränk sollten dann die Aromawerte berechnet werden und das Gesamtaroma durch Aromarekombination simuliert werden.

Abschließend sollten Schwarzteegetränke aus verschiedenen Teesorten analog untersucht werden. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Aromastoffzusammensetzung und die Aromastoffkonzentrationen von Schwarzteegetränken aus unterschiedlichen Anbaugebieten geben.

Ziel der Untersuchungen war es dabei insbesondere die Unterschiede im Aroma von schwarzem und grünem Tee aufzuzeigen. Die Ergebnisse sollten die Grundlage zur Bewertung der Qualität von Tee sowie auch zur Optimierung der Herstellungsverfahren schaffen.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Potente Aromastoffe im „Darjeeling Gold-Auslese“

Zu Beginn der Untersuchungen wurden Schwarztees aus verschiedenen Anbaugebieten sensorisch verglichen um einen Schwarztee mit besonders ansprechendem Geruch zu finden. Basierend auf einem Beliebtheitstest wurde der Schwarztee Darjeeling Gold-Auslese (DGA) ausgewählt, da dieser einen sehr ausgeprägten blumigen (rosenartig, honigartig) und fruchtigen Geruch aufwies, der von den Testern als sehr positiv bewertet wurde.

#### 2.1.1 Aromastoffe im Teegetränk (DGA-G)

##### 2.1.1.1 Aromaprofilanalyse

Als erstes wurde eine Aromaprofilanalyse des Teegetränkes Darjeeling Gold-Auslese (GDA-G) erstellt. Dazu wurde der frisch aufgebrühte Tee auf 50°C temperiert und einem geschulten Sensorikpanel zur Bewertung vorgelegt. Die Teilnehmer mussten die vorgegebenen Geruchseindrücke nach ihrer Intensität (0=nicht; 1=schwach; 2=deutlich; 3=stark wahrnehmbar) bewerten.

Dominierend waren die Geruchseindrücke heuartig (1,8), rosenartig/nach Honig (1,8) und citrusartig/fruchtig (1,7), gefolgt von den Geruchsqualitäten nach Haferflocken/süß (1,2) und grasig/grün (1,1), die etwas weniger intensiv bewertet wurden (Abbildung 4).

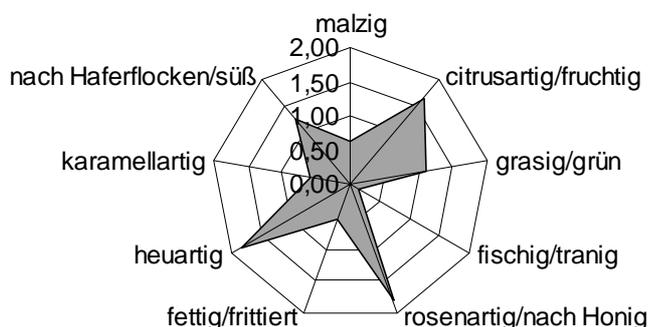


Abbildung 4: Orthonasale Aromaprofil Analyse des Teegetränkes aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

Nur schwach bewertet wurden die Geruchsqualitäten malzig (0,6), karamellartig (0,6) und fettig/frittiert (0,5). Der Geruchseindruck fischig/tranig (0,1) wurde als fast nicht wahrnehmbar bewertet.

### 2.1.1.2 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Als nächstes wurde eine AEVA durchgeführt, um die wertgebenden Aromastoffe des DGA-G zu identifizieren.

Für die Aufarbeitung wurden 20g Teepulver mit 1670ml Wasser 2,5 Minuten aufgebrüht, im Eisbad abgekühlt und anschließend die Aromastoffe mehrfach mit Lösungsmittel extrahiert (s. 3.4). Nach Abtrennen der nichtflüchtigen von den flüchtigen Verbindungen durch Hochvakuumtransfer (HVT) und Einengen wurde eine AEVA (s. 3.5.1) durchgeführt.

Es wurden 24 Aromastoffe mit einem FD-Faktor  $\geq 4$  gefunden, die aber alle in einem relativ engen Bereich lagen und einen Wert von 128 nicht übertrafen (Abbildung 5). Den höchsten FD-Faktor wiesen die Aromastoffe 35 (nach Haferflocken, süß), 36 (nach Honig), 41 (karamellartig) und 47 (nach Vanille) auf.

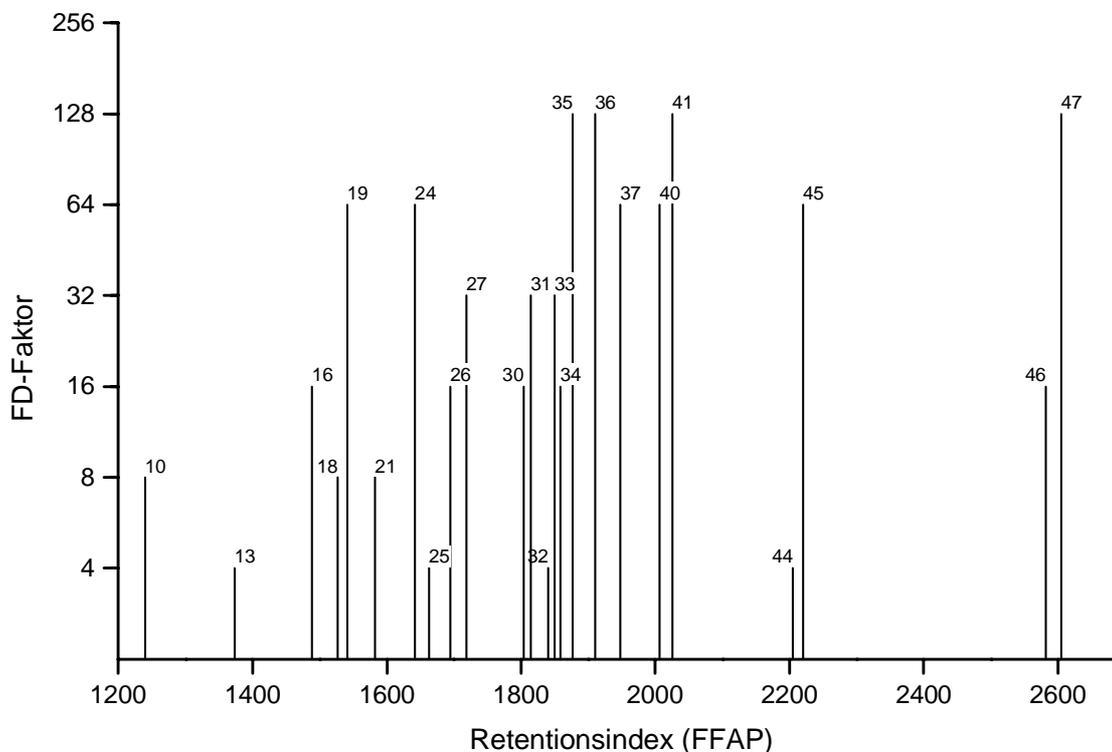


Abbildung 5: FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 4) eines Extraktes vom Teegetränk aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

### 2.1.1.3 Identifizierungsexperimente

Für die Identifizierung, der bei der AEVA detektierten Aromastoffe wurden 200 g Teepulver des DGA aufgearbeitet und der Lösungsmittel-extrakt in eine saure und eine neutral-basische Fraktion aufgeteilt. Während die saure Fraktion nur einen schwachen Geruch besaß, der nicht mehr an das Ausgangsprodukt erinnerte, hatte die neutral-basische Fraktion immer noch den charakteristischen Geruch des Teepulvers. Die neutral-basische Fraktion wurde daraufhin mittels Säulenchromatographie in sechs weitere Fraktionen getrennt (s. 3.4).

Die Identifizierung der Aromastoffe erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen anhand der RI-Werte auf drei Säulen unterschiedlicher Polarität, der Aromaqualität und Aromaintensität (s. 3.5.2) und aufgrund der Massenspektren, die im EI- und CI-Modus aufgenommen wurden (s. 3.6.1).

Ausgehend vom Aromaprofil (Abbildung 4) und den Aromaqualitäten der identifizierten Aromastoffe (Tabelle 6), gab es vier dominierende Geruchsgruppen im DGA-G.

Die blumigen, nach Honig riechenden Aromastoffe wie Phenylethanol (36, FD 128), Phenylacetaldehyd (24, FD 64),  $\beta$ -Ionon (37, FD 64) und das rosenartige Geraniol (33, FD 32) bildeten die erste Gruppe.

Das 3-Methyl-2,4-nonandion (27, FD 32) und die ungesättigten Aldehyde, z.B. das (E,E)-2,4-Nonadienal (26, FD 16) bildeten die Gruppe mit den heuartigen, grün riechenden Aromastoffen. In dieser Gruppe war auffällig, dass kein dominierender Aromastoff mit einem FD-Faktor >32 vorhanden war.

Zwei fruchtig riechende Aromastoffe wurden identifiziert: Das (E)- $\beta$ -Damascenon (31, FD 32) und das Linalool (19, FD 64). Bei Linalool handelt es sich um eine chirale Verbindungen, die in zwei enantiomeren Formen auftritt. Dabei ist das Enantiomerenverhältnis für die Beurteilung des Aromabeitrages wichtig, da das R-Enantiomer eine 80-fach niedrigere Geruchsschwelle als das S-Linalool besitzt (*Jagella, 1999*). Die prozentuale Zusammensetzung der Enantiomere von Linalool wurde daher mittels zweidimensionaler Gaschromatographie/Massenspektrometrie (TDHRGC/MS) bestimmt (s. 3.6.3). Als zweite Säule diente eine chirale Säule, um die beiden Enantiomere zu trennen (Abbildung 6). Im DGA-G lag ein fast racemisches Gemisch von R- und S-Linalool vor (54/46).

Tabelle 6: Wichtige Aromastoffe (FD $\geq$ 4) im Extrakt aus dem Teegetränk der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	Retentionsindex <sup>d</sup>			FD <sup>e</sup>
			FFAP	OV-1701	SE-54	
10	(Z)-4-Heptenal	fischig, tranig	1240	988	900	8
13	(Z)-1,5-Octadien-3-on	nach Geranie	1373	1086	981	4
16	(E,E)-2,4-Heptadienal	fettig	1489	1135	1012	16
18	(E)-2-Nonenal	fettig, grün	1527	1275	1153	8
19	R/S-Linalool	citrusartig	1541	1198	1098	64
21	(E,Z)-2,6-Nonadienal	nach Gurke	1583	1275	1130	8
24	Phenylacetaldehyd	nach Honig	1642	1178	1038	64
25	3-Methylbutansäure	schweissig	1663	1046	870	4
26	(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig, grün	1695	1348	1213	16
27	3-Methyl-2,4-nonandion	heuartig	1719	1398	1242	32
30	(E,E)-2,4-Decadienal	fettig, frittiert	1804	1453	1318	16
31	(E)- $\beta$ -Damascenon	fruchtig	1815	1500	1387	32
32	Hexansäure	schweissig	1840	1192	1020	4
33	Geraniol	rosenartig	1850	1371	1256	32
34	2-Methoxyphenol	rauchig, süßlich	1859	1231	1089	16
35	unbekannt	nach Haferflocken	1877	1426	1269	128
36	2-Phenylethanol	nach Honig	1910	1270	1116	128
37	$\beta$ -Ionon	nach Veilchen	1948	1617	1490	64
40	4,5-Epoxy-(E)-2-decenal <sup>g</sup>	metallisch	2006	1563	1379	64
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	karamellartig	2025	1248	1071	128
44	3-Ethylphenol	phenolisch	2205	1395	1169	4
45	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	nach Liebstöckel	2220	1356	1112	64
46	Phenylessigsäure	nach Honig	2582	1531	1262	16
47	Vanillin	nach Vanille, süß	2605	1661	1400	128

- <sup>a</sup> Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Säule
- <sup>b</sup> Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen aufgrund folgender Kriterien :  
Vergleich der RI-Werte auf den angegebenen Säulen; Vergleich der Geruchsschwelle und Geruchsqualität am Sniffing-Port; Vergleich der Massenspektren im EI- Und CI-Modus
- <sup>c</sup> Geruchsqualität des Aromastoffes am Sniffing-Port
- <sup>d</sup> Linearer Retentionsindex
- <sup>e</sup> Flavour Dilution Faktor
- <sup>g</sup> Es konnte kein Massenspektrum der Substanz erhalten werden; die Identifizierung erfolgte anhand der restlichen Kriterien in <sup>b</sup>

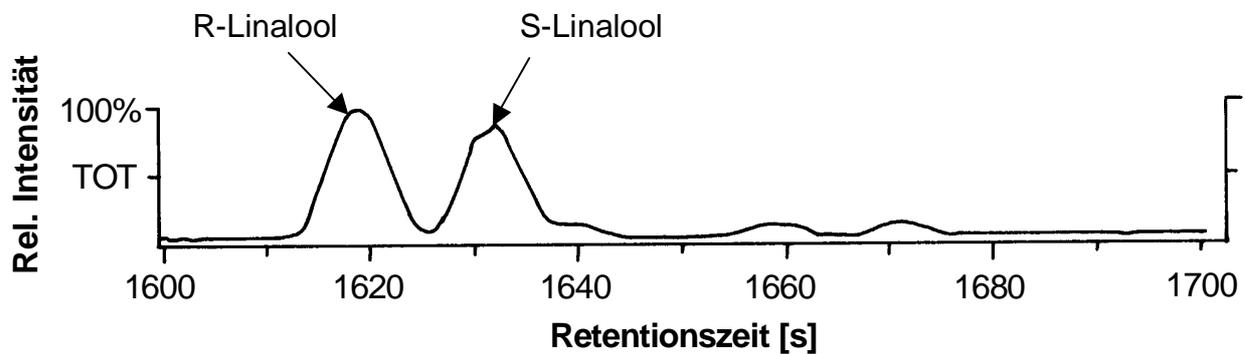


Abbildung 6: Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses in Linalool aus Teegetränk der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

Die letzte Gruppe bestand aus den süßlich riechenden Verbindungen und beinhaltete drei Aromastoffe, die den höchsten FD-Faktor erhielten. Neben dem Vanillin (47) und dem 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon gab es noch einen nach Haferflocken/süßlich riechenden Aromastoff (35), der bisher nicht im schwarzen Tee identifiziert wurde.

## Identifizierung der Verbindung 35

Der Aromastoff **35** war von besonderem Interesse, da das Massenspektrum keiner bisher bekannten Verbindung im Tee entsprach, aber der hohe FD-Faktor im DGA-G vermuten ließ, dass der Aromastoff relevant für das Gesamtaroma des Tees ist.

Nach der säulenchromatographischen Vortrennung (s. 3.4) wurde bei den Retentionszeiten auf zwei Kapillarsäulen (Abbildung 7) unterschiedlicher Polarität in der Fraktion D ein identisches Massenspektrum (Abbildung 8) gefunden. Über TDHRGC/MS (s. 3.7.2) mit einem zusätzlichen Sniffing-Port am zweiten Gaschromatograph (GC) wurde der charakteristische Geruch der gesuchten Verbindung eindeutig den erhaltenen Massenspektren zugeordnet.

Zusätzlich zum Peak 35 (RI(FFAP)=1877) wurden zwei weitere Peaks mit fast identischem Massenspektrum, aber leicht verschobener Retentionszeit (35a RI(FFAP)=1869 und 35b RI(FFAP)=1900) gefunden (Abbildung 9 und 10).

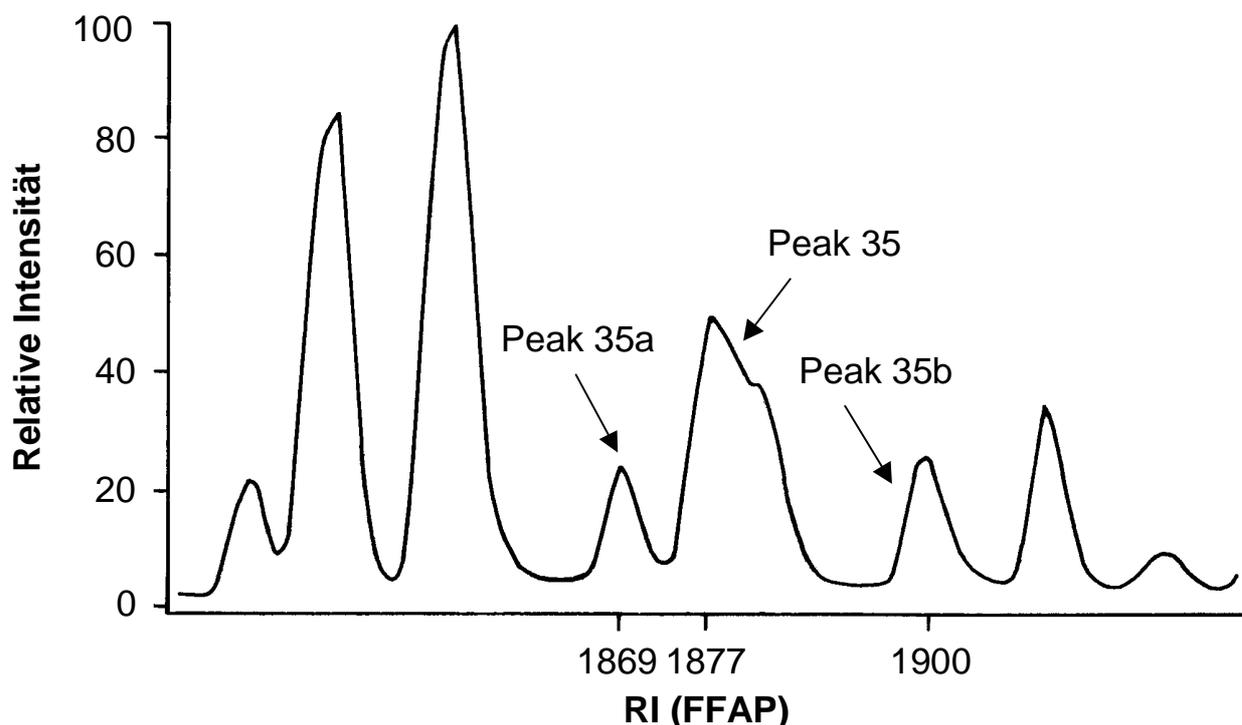


Abbildung 7: Ausschnitt des Gaschromatogramms eines Extraktes aus dem Teepulver der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-P)

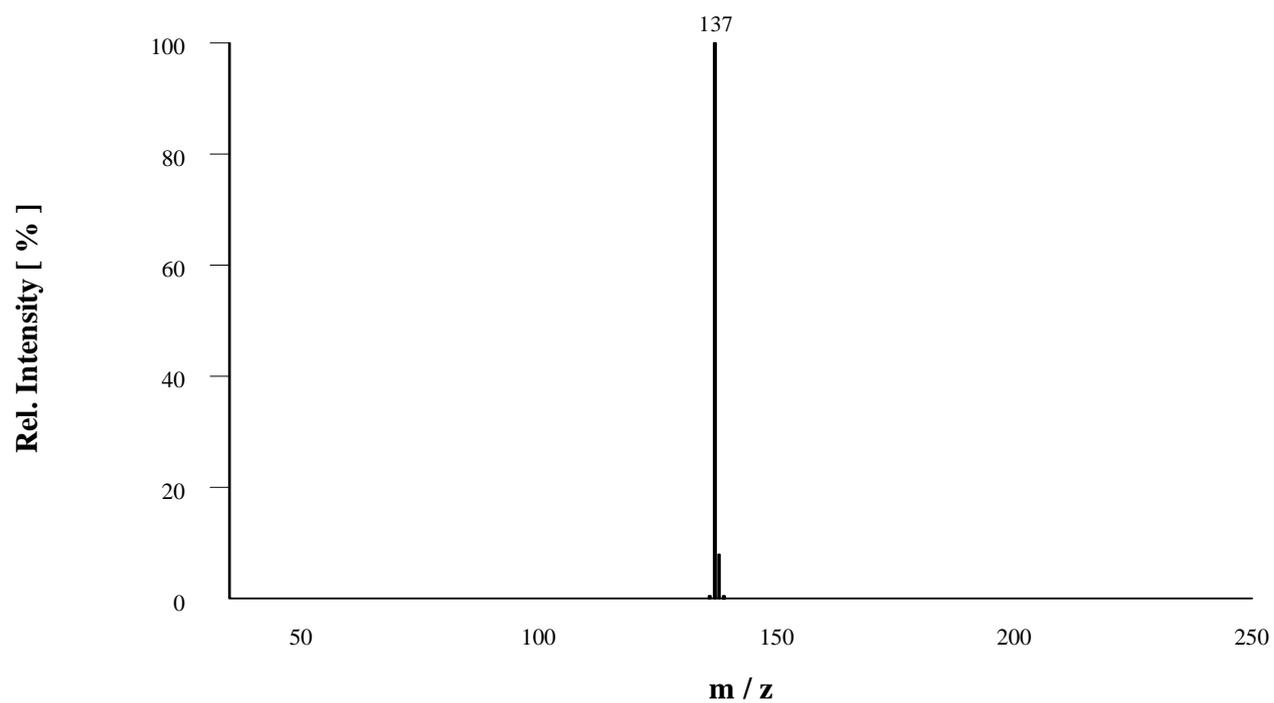
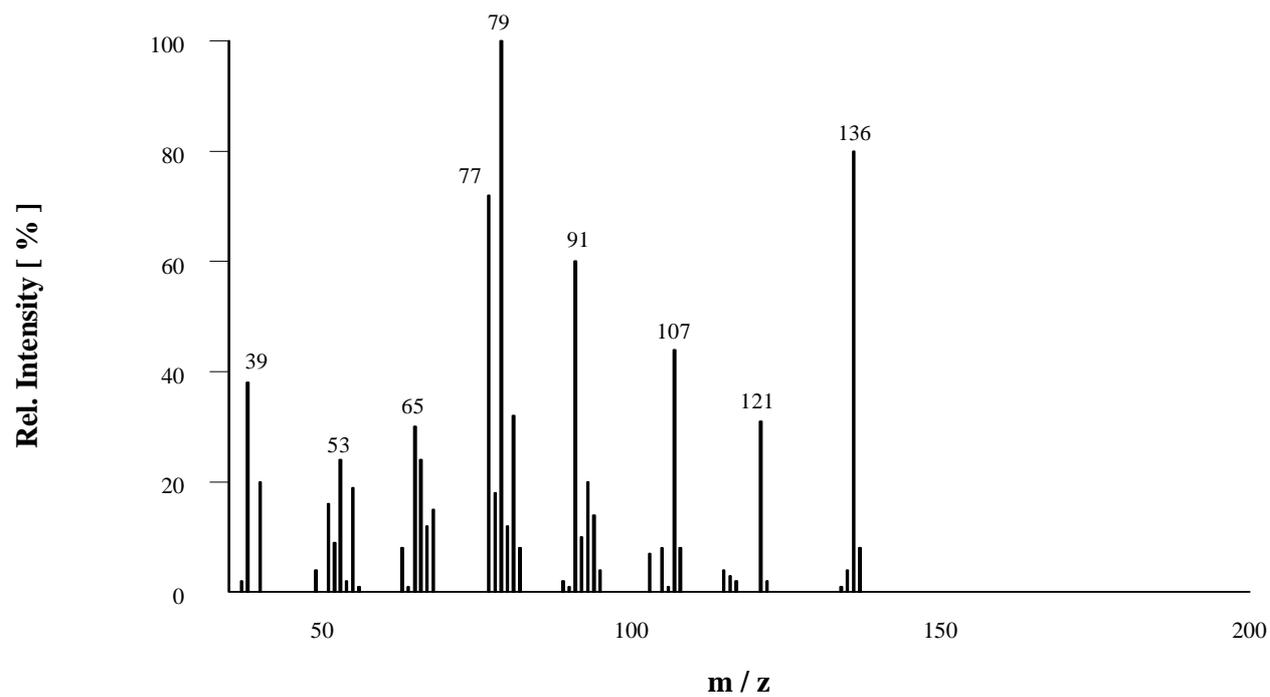


Abbildung 8: Massenspektren von Verbindung 35 (MS/EI oben und MS/CI unten)

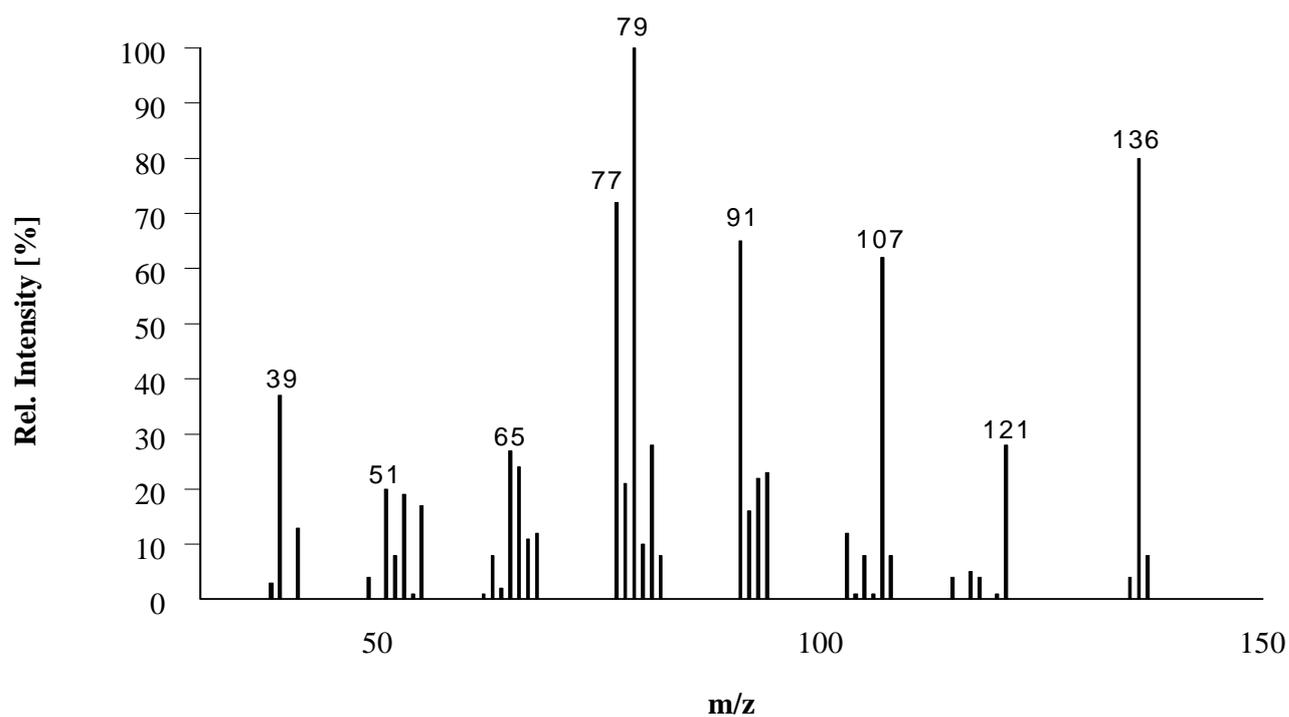


Abbildung 9: Massenspektrum von Verbindung 35a (MS/EI)

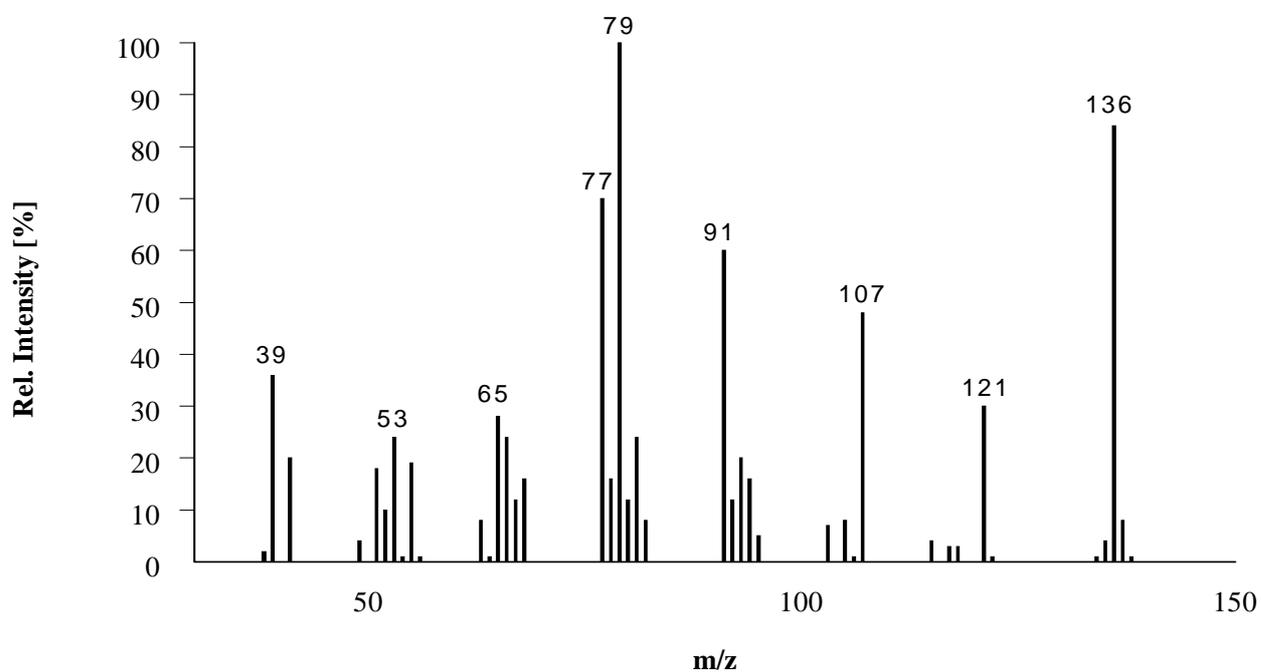


Abbildung 10: Massenspektrum von Verbindung 35b (MS/EI)

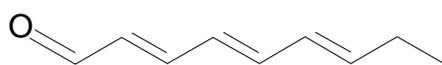
Mit Hilfe einer Massenspektrendatenbank konnten die gesuchten Massenspektren der Verbindung 2,4,6-Nonatrienal zugeordnet werden. Unterstützt wurde die Identifizierung durch die Auswertung eines hochauflösenden massenspektrometrischen Experimentes, wodurch die genaue chemische Zusammensetzung der massenspektrometrischen Bruchstücke ermittelt wurde (Tabelle 7). Neben der Bestätigung der Summenformel ( $C_9H_{12}O$ ) war vor allem das Bruchstück  $m/z$  107 sehr aussagekräftig, das durch eine Ethylabspaltung gebildet wurde. Dadurch wurde belegt, dass eine endständige Ethylgruppe im Molekül vorhanden ist.

Tabelle 7: Fragmente bei der hochauflösende Massenspektrometrie von Verbindung 35

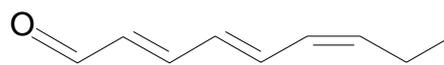
<b>m/z</b>	<b>Fragment<sup>a</sup></b>
136	$C_9H_{12}O$
121	$C_8H_9O$
107	$C_7H_7O$
93	$C_7H_9$
91	$C_7H_7$
79	$C_6H_7$
77	$C_6H_5$

<sup>a</sup> Berechnete Summenformel der Fragmente (EI)

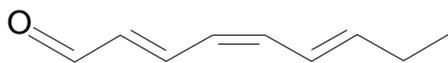
Unter Berücksichtigung der drei Doppelbindungen im 2,4,6-Nonatrienal gibt es acht verschiedene geometrische Isomere, deren Strukturen in Abbildung 11 aufgeführt sind.



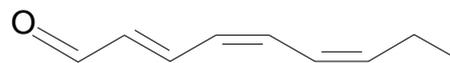
(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal



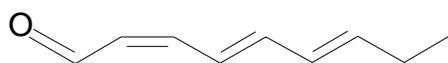
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal



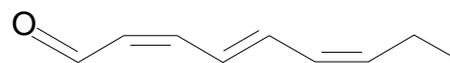
(E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal



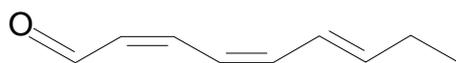
(E,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal



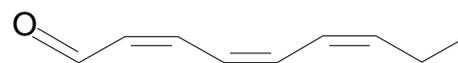
(Z,E,E)-2,4,6-Nonatrienal



(Z,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal



(Z,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal



(Z,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal

Abbildung 11: Mögliche geometrische Isomere des 2,4,6-Nonatrienals

Um die drei im Teepulver vorkommenden geometrischen Isomere des 2,4,6-Nonatrienals zu identifizieren, wurde mit einer zielgerichteten Wittig-Synthese der Isomere begonnen. Dies hatte den Vorteil, dass bei der Reaktion zwei Doppelbindungen des Endproduktes durch die Edukte festgelegt waren, wodurch die spätere geometrische Zuordnung und die Trennung der Isomere erleichtert war.

Das (E,E,E)- und das (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal wurden zunächst über eine Wittig-Synthese aus (E)-2-Pentenal (1) und Methyl-4-(triphenylphosphonium)crotonatbromid (2) synthetisiert (Abbildung 12). Der bei der Reaktion entstandene 2,4,6-Nonatriensäuremethylester (3 u. 4) wurde mit Lithiumaluminiumhydrid zum 2,4,6-Nonatrienol (5 u. 6) reduziert und der Alkohol im letzten Schritt mit Dess-Martin Reagenz zum 2,4,6-Nonatrienal (7 u. 8) oxidiert (s. 3.3.1).

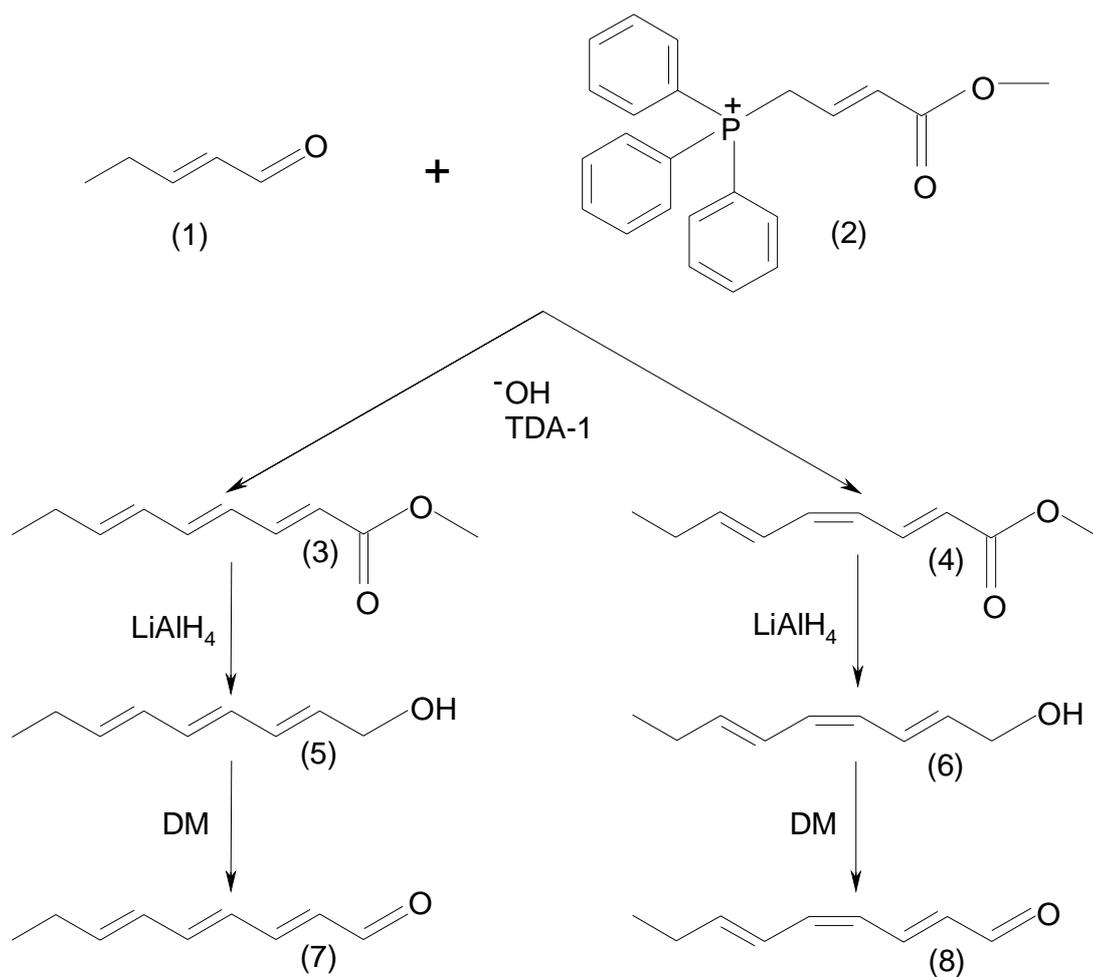


Abbildung 12: Phasentransferkatalysierte Synthese von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal

- 1 (E)-2-Pentenal
- 2 Methyl-4-(triphenylphosponium)crotonat bromid
- 3 (E,E,E)-2,4,6-Nonatriensäuremethylester
- 4 (E,Z,E)-2,4,6-Nonatriensäuremethylester
- 5 (E,E,E)-2,4,6-Nonatrien-1-ol
- 6 (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrien-1-ol
- 7 (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal
- 8 (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal
- $\text{OH}^-$  Hydroxidionen
- TDA-1 Tris-[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]-amine
- $\text{LiAlH}_4$  Lithiumaluminiumhydrid
- DM Dess-Martin Reagenz

Die in der Literatur häufig beschriebenen Wittig-Synthesen mit Kalium *t*-butylat oder Butyllithium unter Wasserausschluss und Stickstoffatmosphäre erbrachten keine Resultate. Anscheinend war das Ausgangsprodukt, vor allem das (E)-2-Pental, so reaktionsträge gegenüber dem Phosphoniumsalz, dass Sekundärreaktionen (z.B. Aldolreaktionen) bevorzugt wurden.

Um dieses Problem zu lösen, wurde eine Wittigreaktion unter Phasentransferkatalyse im stark basischen Milieu mit Tris-(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-amine nach *Daubresse und Francesch (1994)* durchgeführt. Das Arbeiten unter Phasentransferkatalysebedingungen machte es außerdem überflüssig unter Wasser- und Sauerstoffausschluss zu arbeiten.

Bei der Synthese entstanden zwei Isomere des 2,4,6-Nonatrienals (35a und 35b) im beinahe äquimolaren Verhältnis (Abbildung 13). Mit Retentionsindizes 1850 und 1877 wurden zusätzlich zwei weitere kleinere Peaks mit dem für 2,4,6-Nonatrienal charakteristischen Massenspektrum gefunden.

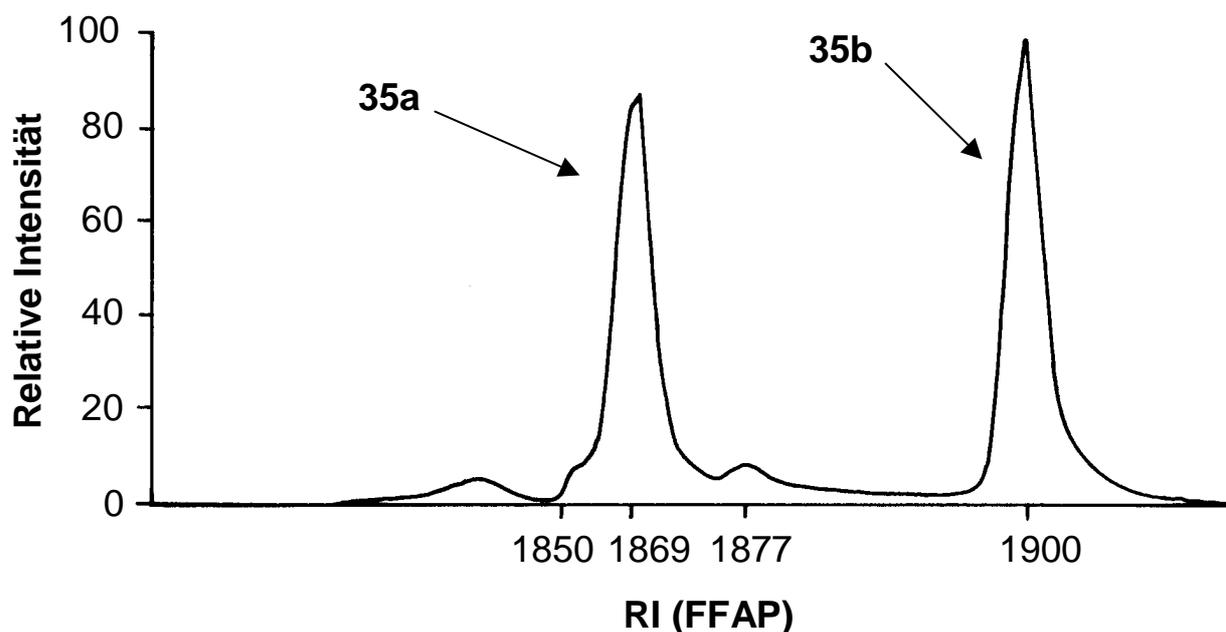


Abbildung 13: Ausschnitt des Gaschromatogramms des Syntheseansatzes zu (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal

Nach der Synthese wurde eine säulenchromatographische Reinigung durchgeführt, um die Edukte, sowie Nebenreaktionsprodukte abzutrennen. Wie erwartet, wurden zwar die meisten Verunreinigungen abgetrennt, aber eine Trennung des Isomerengemisches wurde dadurch nicht erreicht.

Die Trennung der Isomere aus der gereinigten Synthese von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal (s.o.) wurde daher mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator durchgeführt. Nach Probenaufgabe, Fixierung und Entwicklung der Platten wurden die Banden der Isomere durch UV-Licht sichtbar gemacht, abgekratzt und getrennt gesammelt. Abschließend wurden die Isomere vom Kieselgel eluiert. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, hat eine sehr gute Trennung der beiden Isomere auf der Dünnschichtplatte stattgefunden, was durch HRGC/FID bewiesen wurde (Abbildung 15).

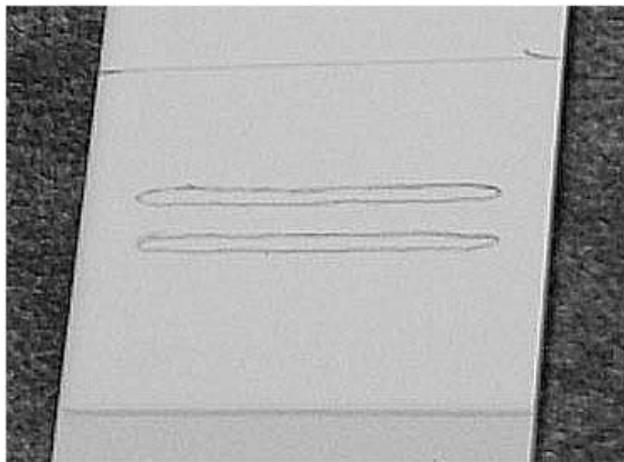


Abbildung 14: Photographische Aufnahme der Trennung des Syntheseansatzes von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal durch präparative Dünnschichtchromatographie (DC)

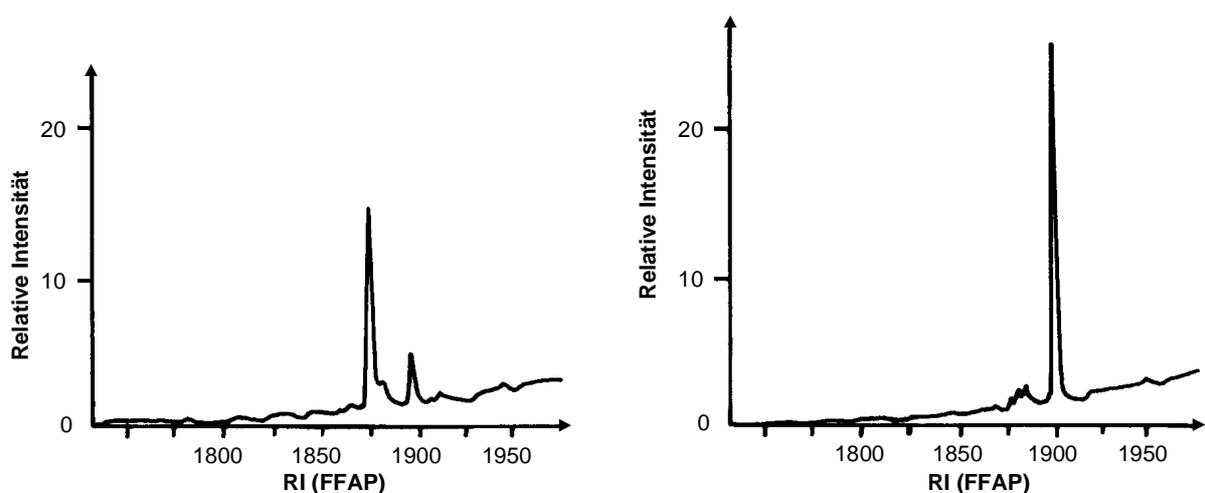


Abbildung 15: Gaschromatogramme der Zuordnung und Reinheitsüberprüfung der durch Dünnschichtchromatographie getrennten Isomere 35a und 35b

Die exakte Geometrie der Doppelbindungen der synthetisierten Isomeren des 2,4,6-Nonatrienals wurde durch Kernresonanzspektrometrie (NMR, s. 3.7.6) ermittelt. Die Zuordnung der Wasserstoffe zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen erfolgte aufgrund der Werte der chemischen Verschiebung, der Kopplungskonstanten und mittels doppelquantengefilterter H,H-Verschiebungskorrelation (COSY).

Im zweidimensionalen COSY-Spektrum (Abbildung 16) waren klar die Kopplungen der geminalen Wasserstoffatome erkennbar und somit eine Zuordnung der Wasserstoffatome möglich (Tabelle 8). Die Peaks bei den Verschiebungen 1,2 ppm (Diethylether  $\text{CH}_2$ ), 3,5 ppm (Diethylether  $\text{CH}_3$ ) und 7,3 ppm (Dichlormethan) sind nicht Teil des NMR-Spektrums des 2,4,6-Nonatrienaltrienal-Isomers, stören aber bei der Auswertung nicht.

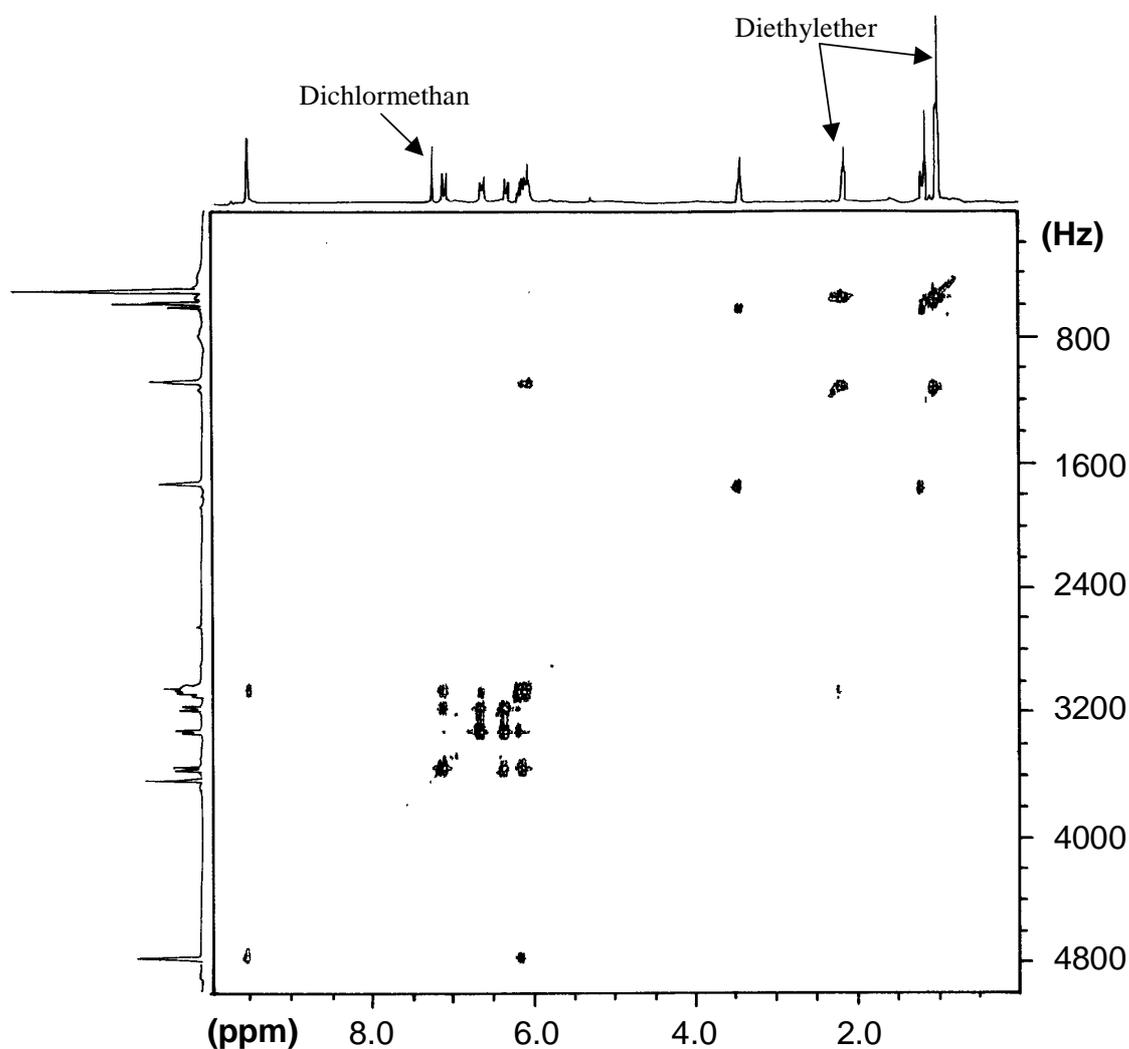
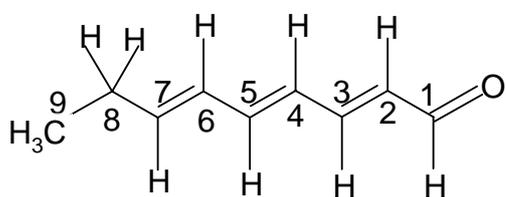


Abbildung 16: H,H-Homonuclear Correlation Spectroscopy Spektrum der Verbindung 35b

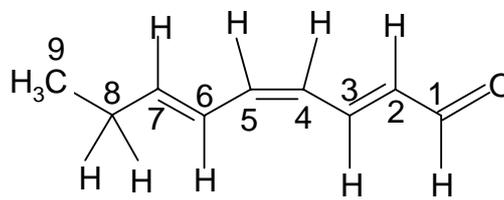
Da es sich bei der angewandten Synthese um eine zielgerichtete Wittigreaktion gehandelt hat, musste bei der geometrischen Zuordnung der Isomere nur noch die neu geknüpfte Doppelbindung betrachtet werden.

Die Kopplungskonstanten gaben aufgrund der drei konjugierten Doppelbindungen leider keinen Aufschluss über die vorliegende cis/trans-Geometrie. Unterschiedlich zwischen den beiden Isomeren war lediglich die chemische Verschiebung vom Wasserstoff am Kohlenstoff drei (Tabelle 8). Die Zuordnung der Geometrie erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten am Gaschromatographen. Durch die cis-Geometrie und den daraus resultierenden Knick im Molekül eluierte das (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal (RI 1869) früher als das (E,E,E) (RI 1900). Bestätigt wurde die Zuordnung nach Durchführung der 2,4,6-Nonatrienalsynthese nach Buttery (1975). Dabei handelte es sich um eine basenkatalysierte Aldoladdition von (E,E)-2,4-Heptadienal und Acetaldehyd (s. 3.3.1) bei der hauptsächlich das energetisch stabilste Nonatrienalisomer, das (E,E,E) gebildet wurde.

Tabelle 8:  $^1\text{H}$ -Kernresonanzspektrometrie (NMR)-Daten von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal



(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal



(E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal

H an C <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	N (H) <sup>c</sup>	Chemische Verschiebung (Kopplungskonstante) <sup>d</sup>	
			E,E,E (35b)	E,Z,E (35a)
1 (2)	d	1	9,58 (8,0)	9,65 (7,9)
2,6,7	m	3	6,06-6,26	6,05-6,25
3 (2 u. 4)	dd	1	<b>7,13</b> (15,2 u. 11,2)	<b>7,60</b> (15,1 u. 10,9)
4 (3 u. 5)	dd	1	6,38 (11,1 u. 14,8)	6,43 (10,9 u. 15,8)
5 (4 u. 6)	dd	1	6,68 (14,8 u. 10,5)	6,66 (16,0 u. 11,6)
8 (7 u. 9)	quint	2	2,22 (7,1 u. 7,4)	2,26 (7,2 u. 7,5)
9 (8)	t	3	1,08 (7,4)	1,15 (7,5)

- <sup>a</sup> Wasserstoff am angegebenen Kohlenstoffatom des 2,4,6-Nonatrienals; in Klammern der koppelnde Wasserstoff am angegebenen Kohlenstoffatom (s. chemische Verschiebung)
- <sup>b</sup> Signal-Aufspaltung (d=Duplett, m=Multipllett, dd=doppeltes Duplett, quint=Quintett, t=Triplet)
- <sup>c</sup> Anzahl der Wasserstoffatome am Kohlenstoffatom
- <sup>d</sup> Chemische Verschiebung in ppm; in Klammern sind die Kopplungskonstanten in MHz angegeben

Mit der Identifizierung von (E,E,E)- (35b) und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal (35a) wurden zwei der drei im Tee vorkommenden 2,4,6-Nonatrienalisomere identifiziert. Bei der Suche nach dem dritten, dem aromawirksamsten 2,4,6-Nonatrienalisomer (35) wurde versucht das (E,E,Z)- und (E,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal analog zur Synthese von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal (s.o.) über eine phasentransferkatalysierte Wittigreaktion zu synthetisieren. Für die Einführung der cis-Geometrie in Position 6 wurde anstelle des (E)-2-Pentenals das (Z)-2-Pental eingesetzt, welches zunächst in einem ersten Schritt aus dem (Z)-2-Penten-1-ol durch Oxidation mit Dess-Martin Reagens hergestellt wurde. Das (Z)-2-Pental reagierte mit dem Methyl-4-(triphenylphosphonium)crotonatbromid zum 2,4,6-Nonatriensäuremethylester, welcher mit Lithiumaluminiumhydrid zum 2,4,6-Nonatrien-1-ol reduziert wurde. Im letzten Schritt wurde 2,4,6-Nonatrien-1-ol mit Dess-Martin Reagenz zum 2,4,6-Nonatrienal oxidiert.

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der Synthese. Neben den bereits bekannten (E,E,E)- (35b) und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal (35a) entstanden auch in größeren Mengen die vermutlichen Isomere (E,E,Z)- und (E,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal mit dem charakteristischen Massenspektrum bei den RI-Werten 1850 (35c) und 1877 (35).

Die hier unerwünschten (E,E,E)- (35b) und (E,Z,E)-Isomere (35a) bilden sich laut *Daubresse und Francesch (1994)* während der stark basisch katalysierten Reaktion durch Umlagerung der cis-Konfiguration in die stabilere trans-Konfiguration.

Das Isomerengemisch der Synthese von (E,E,Z)- und (E,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal ließ sich nicht vollständig über die Dünnschichtchromatographie auftrennen. Immer zwei Isomere bildeten eine Gruppe und erschienen als eine Bande auf der Kieselgelplatte. So bildete das aromawirksamste Isomers des 2,4,6-Nonatrienals (35) immer ein Paar mit dem (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal (35b).

Auch der Versuch das Isomerengemisch auf der Stufe der Synthesezwischenstufen 2,4,6-Nonatriensäuremethylester und 2,4,6-Nonatrien-1-ol zu trennen, führte zu keinem Erfolg.

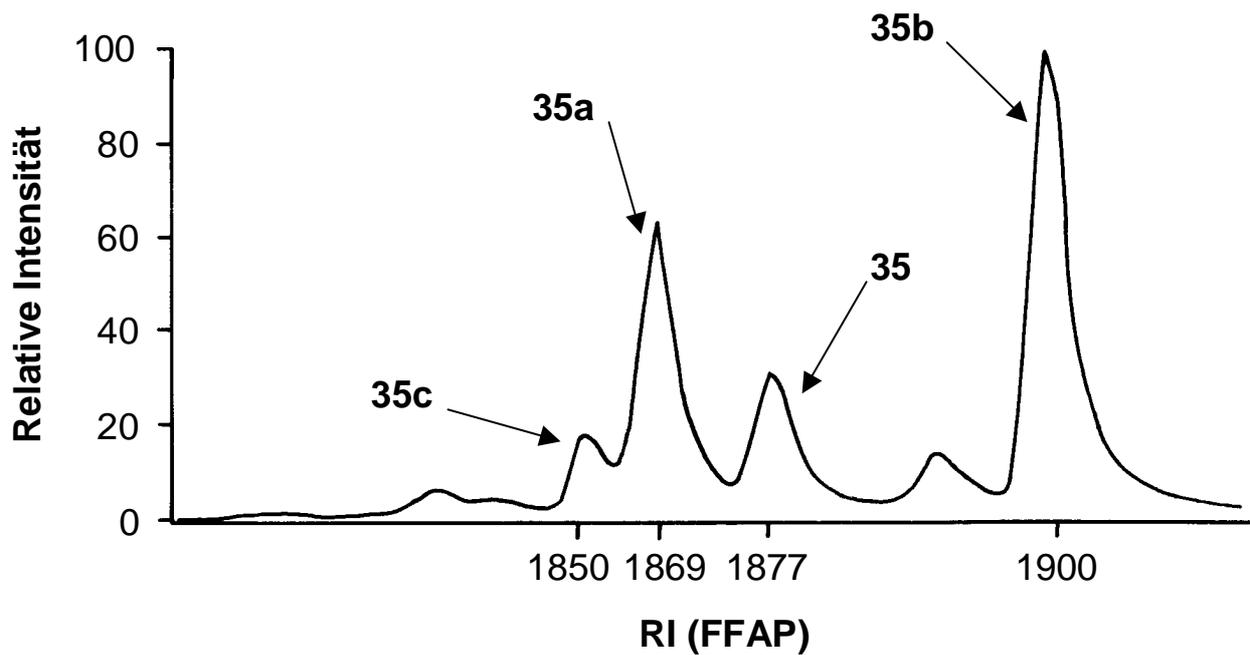


Abbildung 17: Ausschnitt des Gaschromatogramms des Syntheseansatzes zu (E,E,Z)- und (E,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal

Verschiedene Trennmethode wurden ausprobiert um eine Trennung zu erreichen:

In einem Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)-System mit konstanter Zusammensetzung der mobilen Phase wurde die Trennung über eine Kieselgelsäule durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei der Absorption des 2,4,6-Nonatrienals bei 305 nm (s. 3.7.4).

Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der Gesamtsynthese. Das Chromatogramm wurde in sechs Fraktionen eingeteilt und jede Fraktion mehrmals gesammelt, konzentriert und zur Zuordnung der Peaks mittels RI-Werten in den HRGC/FID eingespritzt. Dabei entsprach Fraktion 6 dem (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal (35b), Fraktion 4 dem (E,Z,E)-Isomer (35a) und das gesuchte dritte Isomer (35), das im schwarzen Tee gefunden wurde entsprach der Fraktion 5.

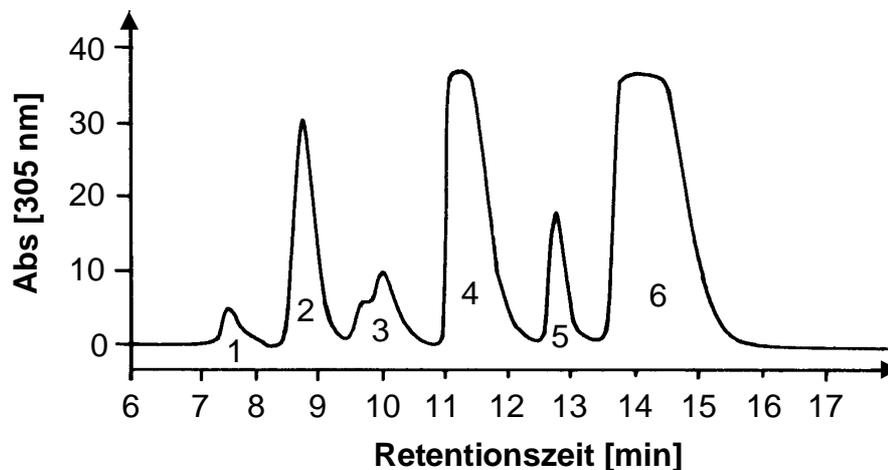


Abbildung 18: Hochdruckflüssigkeitschromatogramm der Trennung der Gesamtsynthese ausgehend vom (Z)-2-Penten-1-ol

Leider war die Effektivität der HPLC-Trennung sehr gering. Um eine ausreichende Basistrennung der Peaks zu gewährleisten, wie sie in Abbildung 18 zu sehen ist, konnten nur relativ geringe Mengen des Syntheseansatzes eingesetzt werden.

Eine spezielle Methode um cis/trans-Isomere einer Verbindung zu trennen ist die Argentationschromatographie. Es wurde daher eine Argentations-säulenchromatographie durchgeführt und die aufgefangenen Fraktionen zur Reinheitsüberprüfung zuerst konzentriert und dann durch HRGC untersucht (s. 3.7.6).

Auch mit Hilfe der Argentationschromatographie war es nicht möglich, die Isomere des 2,4,6-Nonatrienals vollständig zu trennen.

Da es nicht möglich war die Verbindung 35 vom (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal zu trennen wurde eine  $^1\text{H-NMR}$ -Messung des Gemisches aufgenommen um zu sehen, welche Rückschlüsse auf die gesuchte Struktur sich damit ziehen ließen.

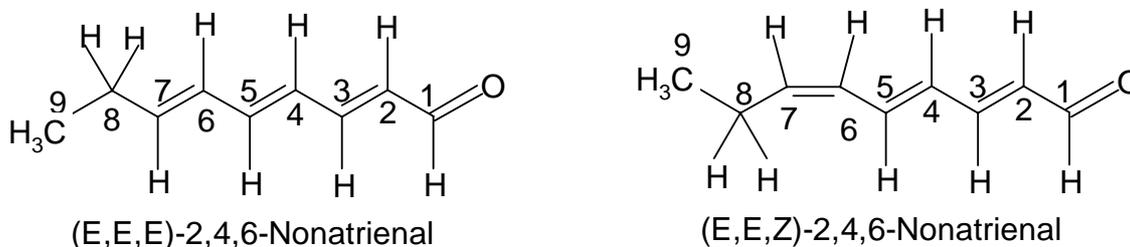
Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des gesuchten Isomers wurde in einer Mischung mit (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal aufgenommen. Unter Bezugnahme der  $^1\text{H-NMR}$ -Daten des reinen (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienals konnten die  $^1\text{H-NMR}$ -Daten für das unbekannte Isomer ermittelt werden.

Aufgrund der zielgerichteten Synthese konnten neben den bereits bekannten Isomeren (E,E,E) und (E,Z,E) nur noch die Isomere (E,E,Z) und (E,Z,Z) entstanden sein, was die geometrische Zuordnung vereinfachte. Unterschiedlich im NMR-Spektrum der beiden Isomere ist die chemische Verschiebung des Wasserstoffes am Kohlenstoff fünf (Tabelle 9). Die geometrische Zuordnung erfolgte aufgrund der Retentionsindizes, da im Molekül vorhandene cis-Strukturen die Elutionszeit verkürzen. Damit konnte dem gesuchten Nonatrienalisomer (35) die Geometrie (E,E,Z) zugeordnet werden (RI(35)=1877, RI(35c)=1850).

Allerdings wurde aufgrund der angesprochenen Trennprobleme (s.o.) kein reines NMR-Spektrum erhalten, sondern ein Gemisch des (E,E,E)- und (E,E,Z)-Isomers, wodurch eine wissenschaftlich eindeutige Identifizierung leider nicht möglich war.

Durch Synthese von (E,E,E)- (35b), (E,Z,E) (35a) und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (35) wurden alle Isomere identifiziert, die auch im Teegetränk vorhanden waren. Somit bestand keine Notwendigkeit weitere Isomere zu synthetisieren.

Tabelle 9:  $^1\text{H}$ -Kernresonanzspektrometrie (NMR)-Daten von (E,E,E)- und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal



H an C <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>	N (H) <sup>c</sup>	Chemische Verschiebung (Kopplungskonstante) <sup>d</sup>	
			E,E,E (35b)	E,E,Z (35)
1 (2)	d	1	9,58 (8,0)	9,55 (7,7)
2,6,7	m	3	6,06-6,26	6,03-6,23
3 (2 u. 4)	dd	1	7,13 (15,2 u. 11,2)	7,17 (15,2 u. 11,1)
4 (3 u. 5)	dd	1	6,38 (11,1 u. 14,8)	6,43 (11,2 u. 14,8)
5 (4 u. 6)	dd	1	<b>6,68</b> (14,8 u. 10,5)	<b>6,95</b> (14,8 u. 11,5)
8 (7 u. 9)	quint	2	2,22 (7,1 u. 7,4)	2,30 (15,2 u. 7,6)
9 (8)	t	3	1,08 (7,4)	1,05 (7,4)

- <sup>a</sup> Wasserstoff am angegebenen Kohlenstoffatom des 2,4,6-Nonatrienals; in Klammern der koppelnde Wasserstoff am angegebenen Kohlenstoffatom (s. chemische Verschiebung)
- <sup>b</sup> Signal-Aufspaltung (d=Duplett, m=Multipllett, dd=doppeltes Duplett, quint=Quintett, t=Triplet)
- <sup>c</sup> Anzahl der Wasserstoffatome am Kohlenstoffatom
- <sup>d</sup> Chemische Verschiebung in ppm; in Klammern sind die Kopplungskonstanten in MHz angegeben

Die drei synthetisierten Isomere unterschieden sich nicht in der Geruchsqualität am Sniffing-Port des GCs. So war es möglich die Aromaqualität der drei Isomere ohne vorherige Trennung zu bestimmen. Die Aromaqualität wurde von einem geschulten Sensorikpanel bestehend aus 20 Personen bewertet, wobei Mehrfachnennungen möglich waren. Die häufigsten Nennungen waren die Aromaqualitäten nach Haferflocken, süß, grün und fettig (Tabelle 10). In einer anschließenden Diskussion wurde den untersuchten Isomeren von 2,4,6-Nonatrienal der Aromaeindruck „nach Haferflocken, süß“ vom Sensorikpanel zugeordnet. Bei steigender Konzentration des Aromastoffes nahm der fettige Aromaeindruck zu. Dies geschah aber erst in Konzentrationsbereichen, die im Tee nicht erreicht wurden.

Tabelle 10: Beschreibung der Aromaqualität von 2,4,6-Nonatrienal-Isomeren (free choice)

<b>Aromaqualität</b>	<b>Anzahl<sup>a</sup></b>
nach Haferflocken, nach Waffeln, süß	11
grün	8
fettig	7
nach schwarzem Tee	4
blumig	2
citrus	1
fruchtig	1
nach Walnuß	1

<sup>a</sup> Anzahl der Personen, die diese Geruchsqualität beschrieben haben

Die Geruchsqualität der einzelnen Isomere war zwar nicht unterschiedlich, aber sie besaßen stark unterschiedliche Geruchsschwellen in Luft.

Das (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal (35b) hatte mit 4,43 ng/l (Tabelle 11) die höchste Geruchsschwelle der drei im Tee vorkommenden Isomere, mittig lag das (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal (35a) mit einem Wert von 0,092 ng/l, aber mit Abstand die niedrigste Geruchsschwelle in Luft hatte das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (35), welches mit einem Wert von 0,00024 ng/l im Vergleich zu anderen Aromastoffen äußerst potent ist.

Tabelle 11: Retentionsindizes, Geruchsschwellenwerte und Geruchsqualität von (E,E,E)-, (E,Z,E)- und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal

Isomer <sup>a</sup>	RI-Wert <sup>b</sup>			Geruchsschwelle in Luft in ng/l	Geruchsqualität
	FFAP	DB-5	OV-1701		
<b>E,Z,E</b>	1869	1271	1433	0,092	nach Haferflocken/süß
<b>E,E,Z</b>	1877	1276	1440	0,00024	nach Haferflocken/süß
<b>E,E,E</b>	1900	1286	1452	4,43	nach Haferflocken/süß

<sup>a</sup> Isomer von 2,4,6-Nonatrienal

<sup>b</sup> Linearer Retentionsindex

Mit Hilfe der AEVA wurden die mittel- bis schwerflüchtigen Aromastoffe identifiziert. Aromastoffe, die durch ihren niedrigen Siedepunkt bei der Aufarbeitung leicht verloren gehen oder die mit dem Lösungsmittel eluiert werden, wurden dabei allerdings nicht erfasst. Um diese Aromastoffe trotzdem zu bewerten, wurden 20ml des frisch aufgebrühten Teegetränkes DGA in einen Jodzahlkolben überführt, 20 Minuten bei 50°C äquilibriert, 20ml Gasvolumen mit einer gasdichten Spritze aus dem Kopfvolumen entnommen (s. 3.5.1) und mittels Headspace-Gaschromatographie/Olfaktometrie (s. 3.7.1) analysiert.

Dabei wurden 2-Methylpropanal (**1**, malzig), 2-Methylbutanal (**3**, malzig), 3-Methylbutanal (**2**, malzig), Hexanal (**6**, grasig, grün), Ethyl-2-methylbutanoat (**5**, fruchtig), (Z)-4-Heptenal (**10**, fischig, tranig), (Z)-1,5-Octadien-3-on (**13**, nach Geranie), 1-Octen-3-on (**12**, pilzig) und Linalool (**19**, citrusartig) identifiziert (Tabelle 12).

Tabelle 12: Aromastoffe im Teegetränk aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)  
– Statische Headspace Analyse/Olfaktometrie

<b>Nr.<sup>a</sup></b>	<b>Aromastoff</b>	<b>Aromaqualität<sup>b</sup></b>	<b>RI-Wert (RTX)<sup>c</sup></b>
1	2-Methylpropanal	malzig	<600
3	2-Methylbutanal	malzig	640
2	3-Methylbutanal	malzig	660
6	Hexanal	grasig, grün	807
5	Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	855
10	(Z)-4-Heptenal	fischig, tranig	894
13	(Z)-1,5-Octadien-3-on	nach Geranie	978
12	1-Octen-3-on	pilzartig	983
19	R/S-Linalool	citrusartig	1100

<sup>a</sup> Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Säule

<sup>b</sup> Geruchsqualität des Aromastoffes am Sniffing-Port

<sup>c</sup> Linearer Retentionsindex

### 2.1.1.4 Quantifizierung der relevanten Aromastoffe

Wie in der Einleitung beschrieben (s. 1.4.3) kann die AEVA nur einen Hinweis darauf geben, welche Aromastoffe den Geruch eines Lebensmittels bestimmen. Für eine objektive und matrixunabhängige Beurteilung ist es nötig, die bei der AEVA als wichtige Aromastoffe identifizierten flüchtigen Verbindungen zu quantifizieren. Die Quantifizierung der wichtigen Aromastoffe erfolgte mittels Isotopenverdünnungsassays (IVA) über HRGC/MS und TDHRGC/MS (s. 3.6.2). Als interne Standards wurden für alle quantifizierten Aromastoffe mit Ausnahme von Geraniol,  $\beta$ -Ionon und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal die jeweiligen isotopenmarkierten Standards verwendet, welche in Abbildung 19 dargestellt sind. Die Aromastoffe Geraniol und  $\beta$ -Ionon wurden mit den strukturverwandten isotopenmarkiertem  $^2\text{H}_2$ -Linalool und  $^2\text{H}_6$ -(E)- $\beta$ -Damascenon quantifiziert. Für die Quantifizierung von (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal wurde das  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal verwendet.

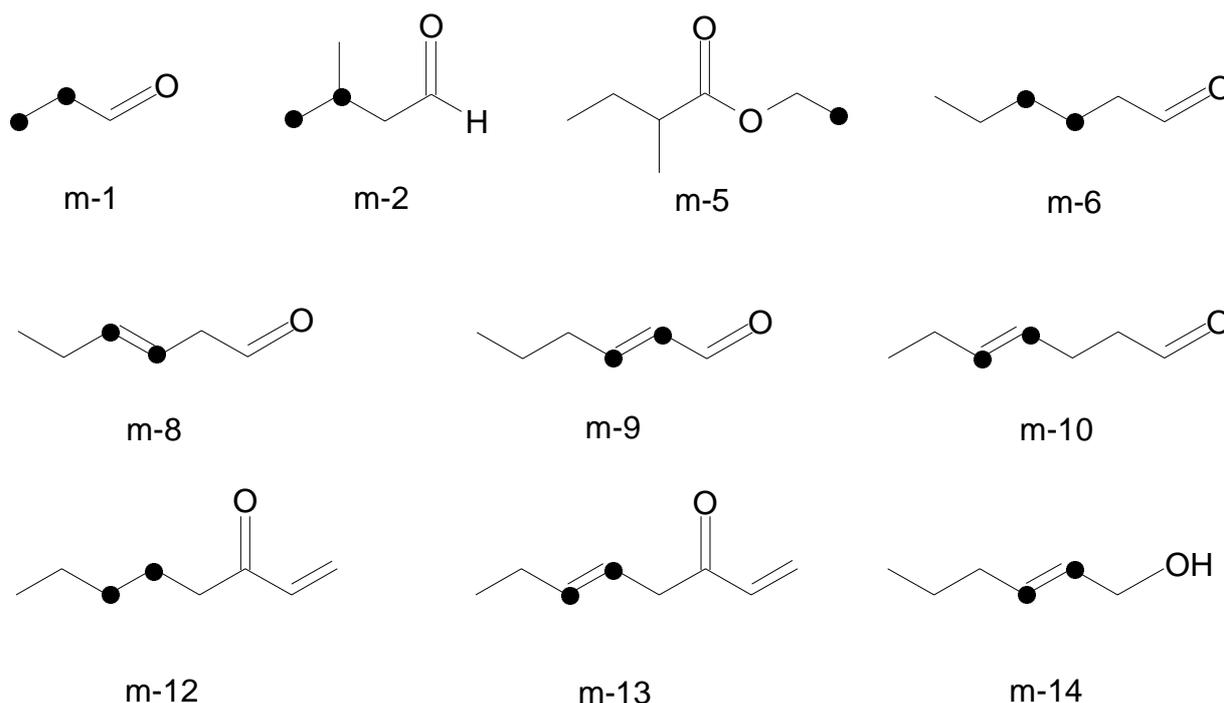


Abbildung 19: Strukturen der in den Stabilisotopenassays verwendeten Standards

● Position der  $^2\text{H}$ -Markierung; ■ Position der  $^{13}\text{C}$ -Markierung, die Nummern beziehen sich auf die fortlaufende Nummerierung in den Tabellen;

$^2\text{H}_7$ -2-Methylpropanal (m-1),  $^2\text{H}_2$ -3-Methylbutanal (m-2),  $^2\text{H}_3$ -Ethyl-2-methylbutanoat (m-5),  $^2\text{H}_4$ -Hexanal (m-6),  $^2\text{H}_2$ -(Z)-3-Hexenal (m-8),  $^2\text{H}_2$ -(E)-2-Hexenal (m-9),  $^2\text{H}_2$ -(Z)-4-Heptenal (m-10),  $^2\text{H}_2$ -1-Octen-3-on (m-12),  $^2\text{H}_2$ -(Z)-1,5-Octadien-3-on (m-13),  $^2\text{H}_2$ -(Z)-3-Hexenol (m-14)

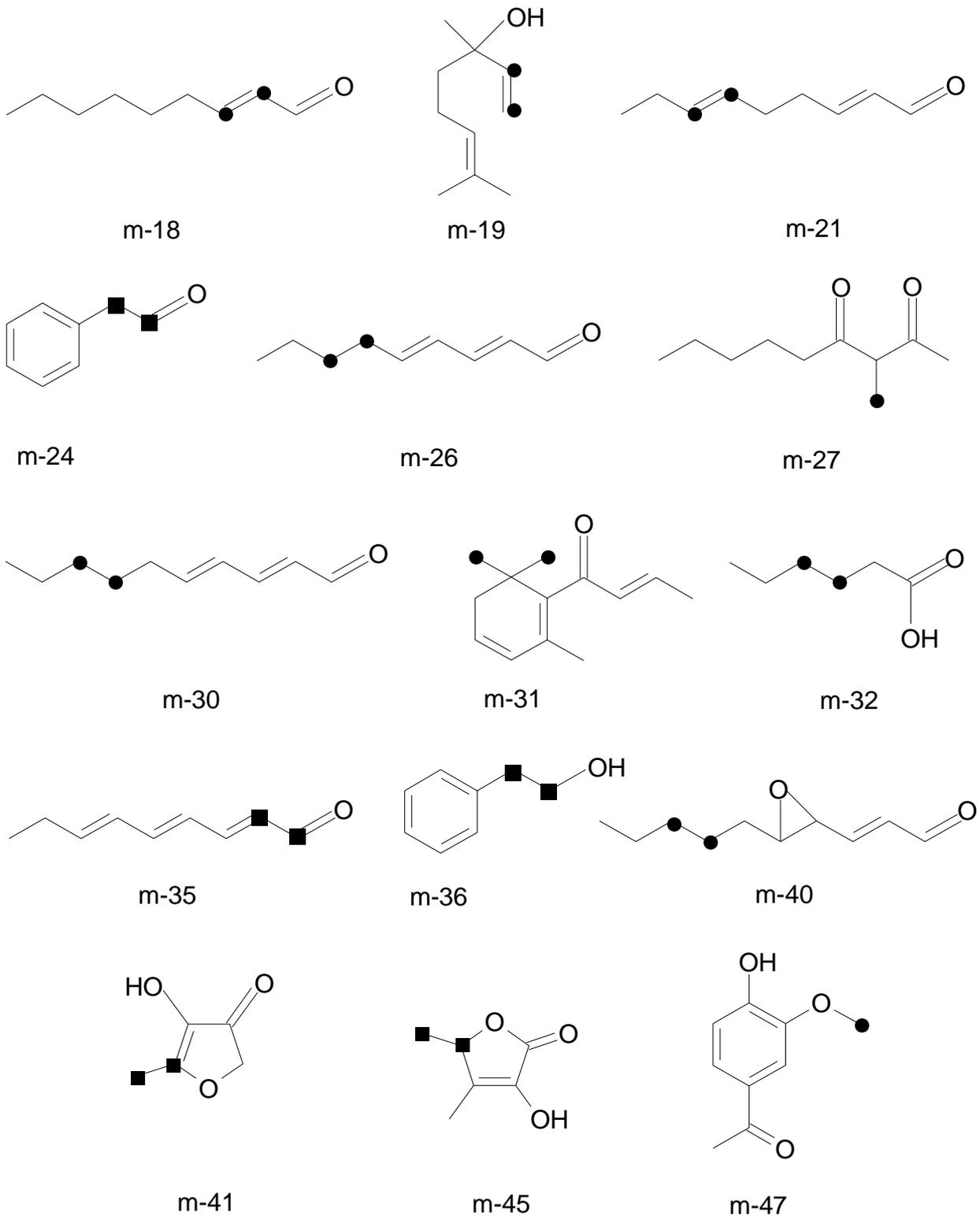


Abbildung 19 (Fortsetzung)

[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Linalool (m-19), [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E,Z*)-2,6-Nonadienal (m-21), [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-Phenylacetaldehyd (m-24), [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E,E*)-2,4-Nonadienal (m-26), [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-3-Methyl-2,4-nonandion (m-27), [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-(*E,E*)-2,4-Decadienal (m-30), [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-(*E*)-β-Damascenon (m-31), [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexansäure (m-32), [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-(*E,E,E*)-2,4,6-Nonatrienal (m-35), [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-2-Phenylethanol (m-36), [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tr-4,5-Epoxy-(*E*)-2-decenal (m-40), [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (m-41), [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (m-45), [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Vanillin (m-47), [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E*)-2-Nonenal (m-18)

## Entwicklung eines isotopenmarkierten Standards für die Isotopenverdünnungsanalyse von (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal

Die Entwicklung eines zur Isotopenverdünnungsanalyse geeigneten isotopenmarkierten Standards wird zunächst am Beispiel des (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienals erklärt.

Für diesen Aromastoff war bisher keine Synthese zur Einführung einer Isotopenmarkierung bekannt, so dass im Rahmen dieser Arbeit das  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal erstmalig synthetisiert wurde. Über eine basenkatalysierte Aldolkondensation von (E,E)-2,4-Heptadienal und  $^{13}\text{C}_2$ -Acetaldehyd entstand das  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal (Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22, s. 3.3.2).

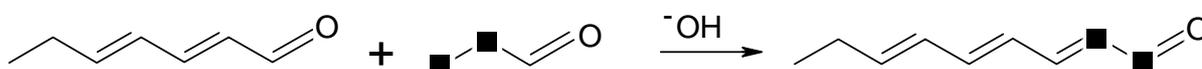


Abbildung 20: Syntheseweg zu  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal

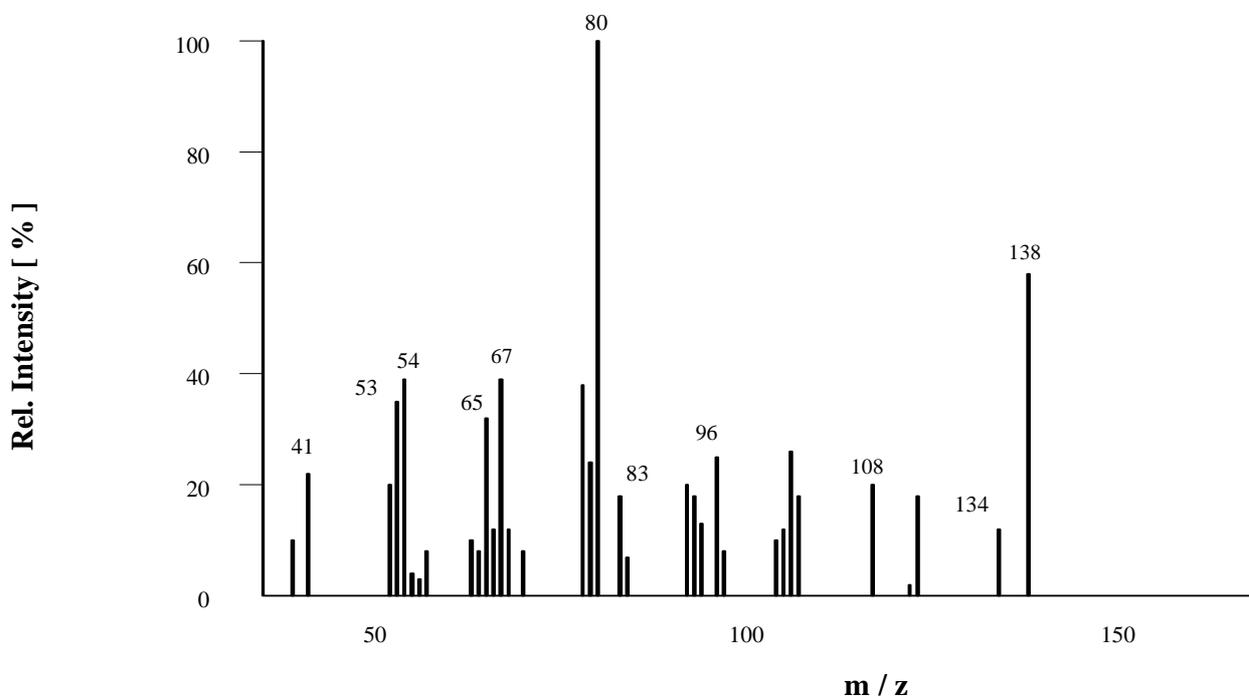


Abbildung 21: Massenspektrum (MS-EI) von  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal

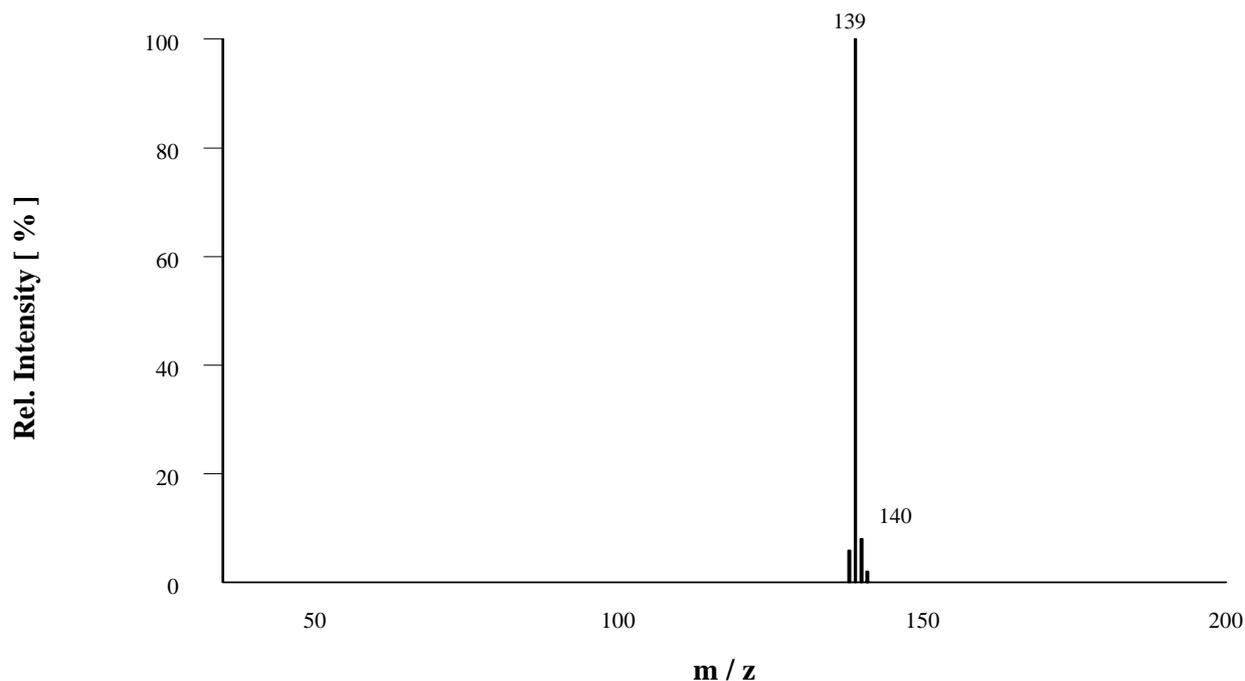


Abbildung 22: Massenspektrum (MS-CI) von  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal

Sowohl das unmarkierte (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (Abbildung 8) als auch das isotopenmarkierte (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal (Abbildung 21) fragmentierten bei der chemischen Ionisation (MS/CI) nicht, sondern lagen als protonierte Molekülonen vor. Ebenfalls erkennbar war, dass die Markierung vollständig erfolgte und dass kein unmarkiertes (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal im isotopenmarkierten Standard vorlag. Damit waren die Grundvoraussetzungen für einen isotopenmarkierten Standard erfüllt.

In manchen Fällen ist es aber unumgänglich, dass ein kleiner Prozentsatz unmarkierter Verbindung im markierten Standard auftritt. Zusätzlich ist das Vorkommen natürlicher Isotopen vor allem bei  $^{13}\text{C}$  markierten Verbindungen zu beachten. Deshalb muss durch Aufnahme einer Responsefaktorkurve, welche die Abhängigkeit des Verhältnisses von markierter zu unmarkierter Verbindung in der Probe berücksichtigt, das Ergebnis korrigiert werden. Zur Bestimmung des Responsefaktors wurde die unmarkierte und die markierte Verbindung in den Verhältnissen 1+2, 2+1 und 1+1 am entsprechenden HRGC/MS im CI-Modus gemessen (Abbildung 23).

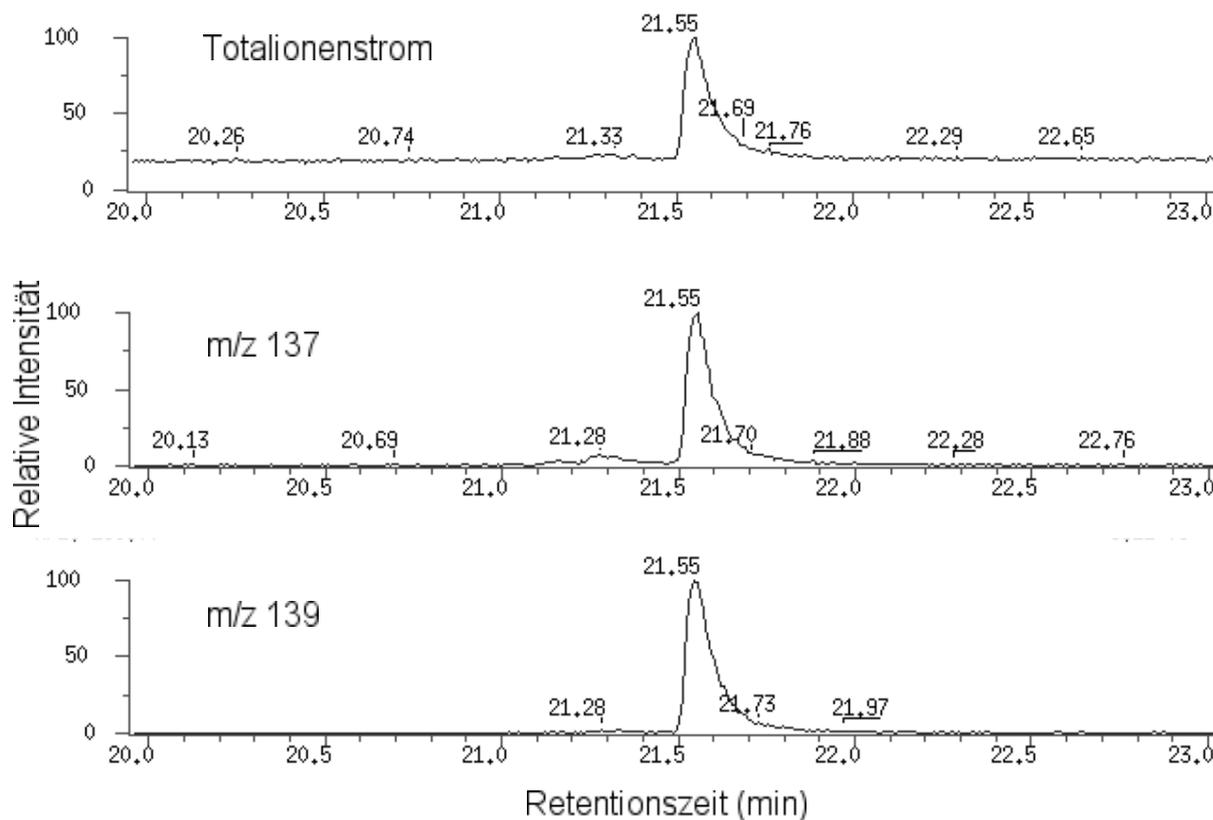


Abbildung 23: Massenspektren (MS-Cl) von (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal ( $m/z=137$ ) und  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal ( $m/z=139$ ) aus einer Mischung des markierten und unmarkierten Aldehyds

Aus den Verhältnisse der relativen Intensitäten von  $m/z$  139 zu  $m/z$  137 (Tabelle 13) und den jeweiligen Gewichtsverhältnisse von Standard zu Analyt wurde der Responsefaktor  $R$  von 1,01 durch Mittelwertbildung errechnet, da er in dem gemessenen Bereich nahezu konstant war.

Tabelle 13: Ermittlung des Responsefaktors  $R$  für 2,4,6-Nonatrienal

$\frac{I(m/z139)}{I(m/z137)}$	$\frac{c(\text{Standard})}{c(\text{Analyt})}$	$R$
1,11	1,08	1,03
2,23	2,31	0,97
0,56	0,54	1,04

Bei den Quantifizierungen sollte das Verhältnis von markierter zu unmarkierter Verbindung innerhalb der Mischungsverhältnisse bei der Bestimmung des Responsefaktors liegen um eine Linearität des Responsefaktors zu gewährleisten.

### **Quantifizierung der relevanten Aromastoffe des DGA-G**

Für die Quantifizierungen im Teegetränk wurde das eingesetzte Teepulver mit der entsprechenden Menge Wasser (Ein Liter pro 12g Teepulver) aufgebrüht und nach dem Abkühlen im Eisbad mit den internen Standards dotiert. Nach einer Äquilibrationszeit von 30 Minuten wurde das Teegetränk mehrmals mit Lösungsmittel extrahiert, nach Konzentrierung die nichtflüchtigen Bestandteile von den flüchtigen durch eine Hochvakuumdestillation abgetrennt (s. 3.4) und abschließend der konzentrierte Extrakt durch HRGC/MS (s. 3.7.2) vermessen.

Die detektierten Konzentration lagen im Teegetränk in einem sehr großen Bereich, der drei Zehnerpotenzen umfasste (Tabelle 14). Der mengenmässig dominierende Aromastoff im DGA-G war Hexansäure mit 344 µg/l. Noch über einer Konzentration von 100 µg/l lagen die Aromastoffe Linalool und Geraniol mit jeweils 142 µg/l und das 2-Phenylethanol mit 131 µg/l. Die Mehrzahl der Aromastoffe verteilte sich auf zwei Konzentrationsbereiche. Zwischen 20 und 100 µg/l lagen insgesamt neun Aromastoffe, darunter das Hexanal (55 µg/l) und das Vanillin (22 µg/l). Im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 3 µg/l befanden sich insgesamt 10 Aromastoffe, unter anderen das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (1,1 µg/l) und das 3-Methyl-2,4-nonandion (0,48 µg/l). Die niedrigste Konzentration wurde für Ethyl-2-methylbutanoat (0,02 µg/l) bestimmt.

Tabelle 14: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe im Teegetränk aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

Aromastoff	µg/l <sup>a</sup>	N Q. <sup>b</sup>	N C. <sup>c</sup>	Bereich [µg/l]
2-Methylpropanal	69	3	1	65-76
3-Methylbutanal	42	3	1	41-43
2-Methylbutanal	82	3	1	74-92
Ethyl-2-methylbutanoat	0,02	2	1	0,02
Hexanal	55	3	1	50-56
(E)-2-Hexenal	77	3	1	74-79
(Z)-4-Heptenal	0,66	2	1	0.65-0.68
(Z)-3-Hexen-1-ol	95	3	1	92-97
(E)-2-Nonenal	0,39	2	1	0,37-0,42
R/S-Linalool	142	4	2	136-149
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,56	4	2	0,52-0,58
Phenylacetaldehyd	57	4	2	56-64
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,45	2	1	0,44-0,46
3-Methyl-2,4-nonandion	0,48	2	1	0,47-0,49
(E,E)-2,4-Decadienal	2,9	2	1	2,9
(E)-β-Damascenon	0,15	2	1	0,14-0,17
Hexansäure	340	2	1	331-356
Geraniol	142	4	2	134-149
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	1,1	8	5	0,49-1,56
2-Phenylethanol	131	2	1	122-139
β-Ionon	1,5	2	1	1,44-1,56
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	26	2	1	26-27
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	0,12	2	1	0,12
Vanillin	22	2	1	22-23

<sup>a</sup> Konzentration des Aromastoffes im Teegetränk in µg/l

<sup>b</sup> Anzahl der durchgeführten Quantifizierungen für den jeweiligen Aromastoff

<sup>c</sup> Anzahl der verwendeten Teechargen (Teepackungen)

### 2.1.1.5 Ermittlung der Geruchsschwellen und der Aromawerte

Mit den ermittelten Konzentrationen der Aromastoffe konnten zwar die Aromastoffe verschiedener Untersuchungsmaterialien verglichen werden, aber eine definitive Aussage, welche Aromastoffe im Tee aromaaktiv waren, konnte damit nicht getroffen werden. Dazu musste die Konzentration der Aromastoffe ins Verhältnis zu den Geruchsschwellen in der untersuchten Matrix gesetzt werden. Mit Hilfe dieses Aromawertes (s. 1.4.3) war es möglich zu erkennen, welche Aromastoffe zum Gesamtaroma beitrugen.

Für die Berechnung der Aromawerte des Teegetränkes mussten zuerst die Schwellenwerte der quantifizierten Aromastoffe in der Matrix Wasser ermittelt werden.

Teilweise wurden bereits in der Literatur bestimmte Geruchsschwellenwerte verwendet, die meisten Geruchsschwellenwerte wurden aber aufgrund der großen Schwankungsbreite der Literaturwerte in einem orthonasalen Triangeltest neu ermittelt (Tabelle 15, s. 3.5.3).

Für das im Tee neu identifizierte (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal musste die Geruchsschwelle bestimmt werden. Problematisch war, dass das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal nicht isomerenrein vorlag, so dass zur Schwellenwertbestimmung das Isomeregemisch aus (E,E,Z) und (E,E,E) benutzt werden musste. Aufgrund der hohen Schwelle in Luft von (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal im Vergleich zum (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal konnte aber angenommen werden, dass das (E,E,E)-Isomer keine Auswirkungen auf die Schwellenbestimmung in Wasser von (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal hatte. Die Konzentration des (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienals in der Isomerenmischung wurde über GC/FID gegen (E,E)-2,4-Nonadienal bestimmt, welches annähernd die gleiche effektive Kohlenstoffzahl besitzt. Anschließend wurde die Schwelle von einem geschulten Sensorikpanel in einer Reihe von orthonasalen Triangeltest bestimmt (s. 3.5.3). Mit einer Schwelle von 0,026 µg/l in Wasser ist (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal ein sehr potenter Aromastoff.

Die verwendeten orthonasalen Geruchsschwellenwerte sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Orthonasale Geruchsschwellenwerte (G) wichtiger Teearomastoffe in Wasser

Aromastoff	G (µg/l in Wasser)	Quelle <sup>a</sup>
2-Methylpropanal	1,9	Czerny et al. <sup>a</sup>
3-Methylbutanal	1,2	Czerny et al. <sup>a</sup>
2-Methylbutanal	4,4	Czerny et al. <sup>a</sup>
Ethyl-2-methylbutanoat	0,06	Czerny et al. <sup>a</sup>
Hexanal	10	Czerny et al. <sup>a</sup>
(Z)-3-Hexenal	0,3	Buttery et al., 1990
(E)-2-Hexenal	190	Czerny et al. <sup>a</sup>
(Z)-4-Heptenal	0,06	s. b. <sup>b</sup>
1-Octen-3-on	0,04	Czerny et al. <sup>a</sup>
(Z)-3-Hexen-1-ol	13	Czerny et al. <sup>a</sup>
(E)-2-Nonenal	0,4	s. b. <sup>b</sup>
R-Linalool	0,6	s. b. <sup>b</sup>
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,03	s. b. <sup>b</sup>
Phenylacetaldehyd	6,3	s. b. <sup>b</sup>
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,16	s. b. <sup>b</sup>
3-Methyl-2,4-nonandion	0,01	s. b. <sup>b</sup>
(E,E)-2,4-Decadienal	0,16	s. b. <sup>b</sup>
(E)-β-Damascenon	0,004	Schieberle, 1991
Hexansäure	890	s. b. <sup>b</sup>
Geraniol	3,2	s. b. <sup>b</sup>
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	0,026	s. b. <sup>b</sup>
2-Phenylethanol	1000	Schieberle, 1991
β-Ionon	0,20	s. b. <sup>b</sup>
4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	0,12	Kerler und Grosch, 1996
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	30	s. b. <sup>b</sup>
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	20	Semmelroch et al., 1995
Phenyllessigsäure	10000	Maga, 1973
Vanillin	25	Semmelroch et al., 1995

<sup>a</sup> Die Daten von Czerny et al. waren zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit noch nicht publiziert

<sup>b</sup> s.b. = Im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Schwellenwerte

Mit den ermittelten Geruchsschwellenwerten konnten die Aromawerte berechnet werden.

Bei der Berechnung der Aromawerte musste beachtet werden, dass die beiden Linalool-Enantiomere stark unterschiedliche Geruchsschwellen besitzen. Laut *Jagella (1999)* hat das R-Linalool in Luft eine 80-fach niedrigere Geruchsschwelle als das S-Linalool und ist damit um ein Vielfaches potenter. Für die Berechnung des Aromawertes von Linalool wurde deshalb der Schwellenwert für R-Linalool, bezogen auf die vorhandene Menge an R-Linalool verwendet.

Insgesamt wurden 16 Aromastoffe mit einem Aromawert über eins im DGA-G gefunden (Tabelle 16). Der mit Abstand höchste Aromawert von 140 wurde für Linalool berechnet. Es folgten die Aromastoffe Geraniol (AW 45), (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (AW 41) und (E)- $\beta$ -Damascenon (AW 38), dicht gefolgt von 2-Methylpropanal, 3-Methylbutanal, 2-Methylbutanal und 3-Methyl-2,4-nonandion mit einem Aromawert von jeweils 37.

Tabelle 16: Aromawerte (AW) wichtiger Aromastoffe des Teegetränks aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

<b>Aromastoff</b>	<b>AW</b>	<b>Aromastoff</b>	<b>AW</b>
R/S-Linalool	140	(Z)-3-Hexen-1-ol	7
Geraniol	45	$\beta$ -Ionon	7
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	41	Hexanal	5
(E)- $\beta$ -Damascenon	38	(E,E)-2,4-Nonadienal	3
2-Methylpropanal	37	(E)-2-Nonenal	<1
3-Methylbutanal	37	4-Hydroxy-2,5-dimethyl- 3(2H)-furanon	<1
2-Methylbutanal	37	Vanillin	<1
3-Methyl-2,4-nonandion	37	Ethyl-2-methylbutanoat	<1
(E,Z)-2,6-Nonadienal	22	(E)-2-Hexenal	<1
(E,E)-2,4-Decadienal	18	Hexansäure	<1
(Z)-4-Heptenal	11	2-Phenylethanol	<1
Phenylacetaldehyd	9	3-Hydroxy-4,5-dimethyl- 2(5H)-furanon	<1

Die Aromastoffe Ethyl-2-methylbutanoat, (E)-2-Hexenal, (E)-2-Nonenal, Hexansäure, 2-Phenylethanol, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon und Vanillin hatten einen Aromawert kleiner eins und trugen deshalb nicht zum Aroma bei. Fast alle Aromastoffe mit einem Aromawert größer eins lagen in einem sehr engen Bereich von eins bis 45.

### 2.1.1.6 Aromasimulation

Durch Mischen der Aromastoffe mit einem Aromawert größer eins und den beiden knapp unter eins liegenden Aromastoffen (E)-2-Nonenal und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon wurden entsprechend der quantifizierten Konzentrationen ein Modelltee in Wasser erstellt (s. 3.5.4).

Das auf 50°C erwärmte Rekombinat wurde von einem geschulten Sensorikpanel bewertet. Dabei wurden dem Sensorikpanel Aromaeindrücke vorgegeben, die sie entsprechend ihrer Intensität analog zum Originaltee bewerten mussten (0=nicht; 1=schwach; 2=deutlich; 3=stark wahrnehmbar).

Die bestimmenden Geruchseindrücke bei dem erstellten Rekombinat waren citrusartig/fruchtig (2,0) und rosenartig/nach Honig (1,7). Aromaeindrücke mit mittlerer Intensität waren heuartig (1,2), nach Haferflocken/süß (1,1) und grasig/grün (1,0), gefolgt von den schwachen Geruchsqualitäten karamellartig (0,7), malzig (0,6) und fettig/frittiert (0,4). Der Aromaeindruck fischig/tranig (0,1) wurde nur sehr schwach detektiert (Abbildung 24).

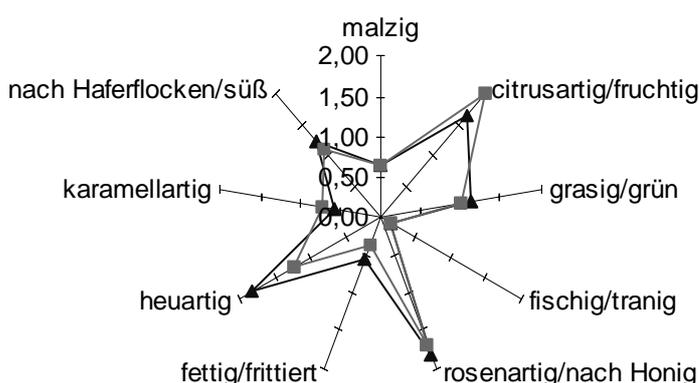


Abbildung 24: Vergleich der Aromaprofile des Rekombinates (■) und des Originalteegetränks (▲) aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G)

Ein Vergleich der Aromasimulation mit dem Realtee offenbarte eine sehr gute Übereinstimmung (Abbildung 24). Eine kleine Abweichung wurde beim Aromaeindruck citrusartig/fruchtig festgestellt und eine größere Differenz wurde bei der Geruchsqualität heuartig detektiert. Die restlichen Aromaeindrücke wurden bei der Aromasimulation, sowie beim Originaltee fast gleich bewertet.

Die Gesamtübereinstimmung des Rekombinats gegenüber den Originalteegetränk wurde ebenfalls vom Sensorikpanel bewertet (0=keine; 1=geringe; 2=gute; 3=vollkommene Übereinstimmung). Das Rekombinat des DGA-G erhielt die Bewertung 2,6.

Mit Hilfe eines Weglassversuches (s. 3.5.5) wurde untersucht, wie sich das Fehlen von (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal im Vergleich zum Vollrekombinat des DGA-G bemerkbar macht.

Neun von zwölf Testpersonen erkannten die abweichende Probe in einem Forced-Choice-Triangeltest, was laut *Jellinek (1985)* signifikant ist. Damit bestätigte sich die Vermutung, dass das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal entscheidend am Gesamtaroma vom Schwarzteegetränk beteiligt ist.

## **2.1.2 Aromastoffe im Teepulver (DGA-P)**

Nach der Analyse des DGA-G wurde mit dem Teepulver des Darjeeling Gold-Ausleses (DGA-P) fortgefahren um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Aromastoffzusammensetzung zwischen dem Teepulver und dem Teegetränk gibt und wie sich die Aromastoffkonzentrationen beim Aufbrühen ändern.

### **2.1.2.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse und Identifizierung**

Dazu wurde zunächst eine AEVA durchgeführt, um die wertgebenden Aromastoffe zu identifizieren.

50g zerkleinertes Teepulver wurden mit Lösungsmittel extrahiert (s. 3.4) und die nichtflüchtigen Bestandteile durch Hochvakuumdestillation abgetrennt, bevor durch sukzessives Verdünnen eine AEVA (s. 3.5.1) durchgeführt wurde.

Die Verbindungen mit den höchsten FD-Faktoren im DGA-P waren die Aromastoffe 19 (citrusartig), 35 (nach Haferflocken, süß), 37 (nach Veilchen), 41 (metallisch), 45 (nach Liebstöckel), 46 (nach Honig) und 47 (nach Vanille) (Abbildung 25). Insgesamt wurden 41 Aromastoffe mit einem FD-Faktor  $\geq 4$  gefunden, wobei zur besseren Übersicht nur Aromastoffe mit FD-Faktor  $\geq 16$  im FD-Chromatogramm dargestellt sind.

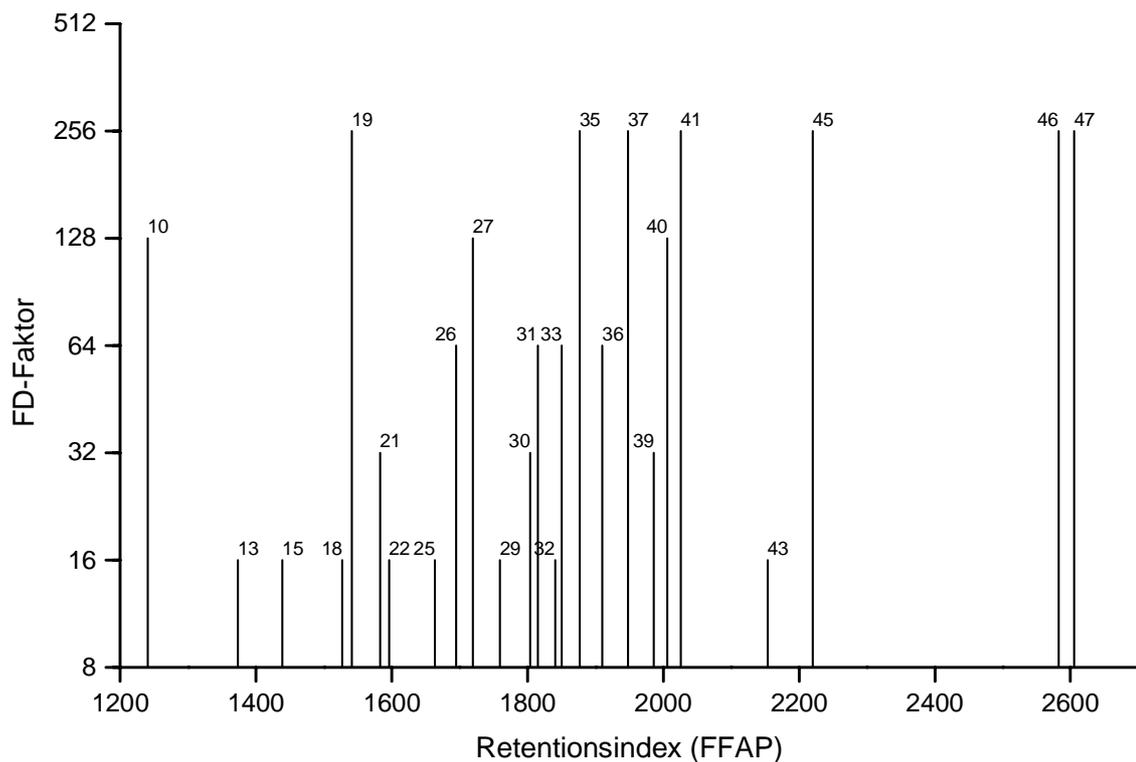


Abbildung 25: FD-Chromatogramm (FD $\geq$ 16) eines Extraktes aus dem Teepulver der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-P)

Die Identifizierung wurde analog zur Identifizierung der Aromastoffe im DGA-G (s. 2.1.1.3) durchgeführt.

Die Aromastoffe mit dem höchsten FD-Faktor von 256 wurden als Linalool (19), (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (35),  $\beta$ -Ionon (37), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (41), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (45), Phenyllessigsäure (36) und Vanillin (47) identifiziert (Tabelle 17). Weitere wichtige Aromastoffe mit einem FD-Faktor von 128 waren (Z)-4-Heptenal (10), 3-Methyl-2,4-nonandion (27) und 4,5-Epoxy-(E)-2-decenal (40).

Insgesamt lagen 14 Aromastoffe im FD-Bereich von 64 bis 256, was erkennen ließ, dass das Aroma vom DGA-P durch eine Vielzahl von nahezu gleichberechtigten Aromastoffen gebildet wird.

Das Isomerenverhältnis von R- zu S-Linalool im DGA-P wurde mit Hilfe der TDHRGC/MS unter Verwendung einer chiralen Säule (s. 3.6.3) als 54 zu 46 bestimmt.

Tabelle 17: Wichtige Aromastoffe (FD $\geq$ 4) im Extrakt aus dem Teepulver der Sorte Darjeeling Gold Auslese (DGA-P)

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	Retentionsindex <sup>d</sup>			FD <sup>e</sup>
			FFAP	OV-1701	SE-54	
2	3-Methylbutanal	malzig	950	735	652	4
4	2,3-Butandion	butterartig	967	690	587	4
5	Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	1049	906	848	4
6	Hexanal	grasig, grün	1079	879	802	4
8	(Z)-3-Hexenal	grün	1148	884	800	8
10	(Z)-4-Heptenal	fischig, tranig	1240	988	900	128
11	n-Octanal	citrusartig	1283	1087	1003	4
12	1-Octen-3-on	pilzartig	1298	1071	979	8
13	(Z)-1,5-Octadien-3-on	nach Geranie	1373	1086	981	16
14	(Z)-3-Hexen-1-ol	grün	1381	971	858	4
15	Methional	nach gek. Kartoffel	1439	1040	905	16
16	(E,E)-2,4-Heptadienal	fettig	1489	1135	1012	4
17	Unbekannt	grün	1512	n.b. <sup>f</sup>	n.b. <sup>f</sup>	4
18	(E)-2-Nonenal	fettig, grün	1527	1275	1153	16
19	R/S-Linalool	citrusartig	1541	1198	1098	256
20	Unbekannt	blumig	1564	n.b. <sup>f</sup>	n.b. <sup>f</sup>	4
21	(E,Z)-2,6-Nonadienal	nach Gurke	1583	1275	1130	32
22	(E,E)-2,4-Octadienal	fettig	1596	1247	1115	16
23	Butansäure	schweissig	1625	984	821	4
24	Phenylacetaldehyd	nach Honig	1642	1178	1038	4
25	3-Methylbutansäure	schweissig	1663	1046	870	16
26	(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig, grün	1695	1348	1213	64
27	3-Methyl-2,4-nonandion	heuartig	1719	1398	1242	128
28	Pentansäure	schweißig	1730	1086	911	8
29	(E,Z)-2,6-Nonadienol	grün/ nach Gurke	1759	1270	1173	16

Tabelle 17 (Fortsetzung):

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	Retentionsindex <sup>d</sup>			FD <sup>e</sup>
			FFAP	OV-1701	SE-54	
30	(E,E)-2,4-Decadienal	fettig, frittiert	1804	1453	1318	32
31	(E)- $\beta$ -Damascenon	fruchtig	1815	1500	1387	64
32	Hexansäure	schweissig	1840	1192	1020	16
33	Geraniol	rosenartig	1850	1371	1256	64
34	2-Methoxyphenol	rauchig, süßlich	1859	1231	1089	8
35	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	nach Haferflocken	1877	1426	1269	256
36	2-Phenylethanol	nach Honig	1910	1270	1116	64
37	$\beta$ -Ionon	nach Veilchen	1948	1617	1490	256
39	4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	1986	1563	1374	32
40	4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2006	1563	1379	128
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	karamellartig	2025	1248	1071	256
42	$\gamma$ -Nonalacton	kokosartig	2053	1563	1363	8
43	Bis (2-methyl)-3-furyl)disulphid <sup>g</sup>	fleischig	2153	1639	1534	16
45	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	nach Liebstöckel	2220	1356	1112	256
46	Phenylessigsäure	nach Honig	2582	1531	1262	256
47	Vanillin	nach Vanille, süß	2605	1661	1400	256

<sup>a</sup> Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Säule

<sup>b</sup> Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen aufgrund folgender Kriterien : Vergleich der RI-Werte auf den angegebenen Säulen; Vergleich der Geruchsschwelle und Geruchsqualität am Sniffing-Port; Vergleich der Massenspektren im EI- Und CI-Modus

<sup>c</sup> Geruchsqualität des Aromastoffes am Sniffing-Port

<sup>d</sup> linearer Retentionsindex

<sup>e</sup> Flavour Dilution Faktor

<sup>f</sup> nicht bestimmt

<sup>g</sup> Es konnte kein Massenspektrum der Substanz erhalten werden; Die Identifizierung erfolgte an Hand der restlichen Kriterien in <sup>b</sup>

### **2.1.2.2 Quantifizierung der relevanten Verbindungen**

Nach Ermittlung der FD-Faktoren wurden Quantifizierungen durchgeführt, um die Daten später mit den Quantifizierungsdaten des DGA-G vergleichen zu können.

Das zerkleinerte Teepulver wurde nach Zugabe der isotopenmarkierten Standards mehrfach mit Lösungsmittel extrahiert (s. 3.4) und nach Einengen ein Hochvakuumtransfer durchgeführt. Danach wurde der Extrakt eingeeengt und mittels HRGC/MS und TDHRGC/MS (s. 3.7.2) vermessen.

Hexansäure war der Aromastoff mit der höchsten Konzentration (12300 µg/kg) (Tabelle 18), gefolgt vom Linalool mit einer Konzentration von 6600 µg/kg. Gehalte um oder über der 1 mg/kg Grenze wurden noch für 2-Phenylethanol (2200 µg/kg), Hexanal (1570 µg/kg), (Z)-3-Hexen-1-ol (1560 µg/kg) und 3-Methylbuttersäure (980 µg/kg) bestimmt.

Tabelle 18: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe im Teepulver aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-P)

Aromastoff	c(x) <sup>a</sup>	N Q. <sup>b</sup>	N C. <sup>c</sup>	Bereich [µg/kg]
2-Methylpropanal	250	2	1	230-270
3-Methylbutanal	320	2	1	300-340
2-Methylbutanal	540	2	1	520-560
Hexanal	1600	2	1	1400-1800
(E)-2-Hexenal	270	2	1	260-280
(Z)-4-Heptenal	51	6	3	39-61
(Z)-3-Hexen-1-ol	1600	2	1	1500-1600
(E)-2-Nonenal	32	4	2	27-36
R/S-Linalool	6600	6	3	6000-7100
(E,Z)-2,6-Nonadienal	38	2	1	37-39
Phenylacetaldehyd	650	2	1	650-660
(E,E)-2,4-Nonadienal	87	4	2	63-110
3-Methyl-2,4-nonandion	62	8	4	58-69
(E,E)-2,4-Decadienal	73	6	3	62-98
(E)-β-Damascenon	9,8	2	1	9,6-10,1
Hexansäure	12000	6	3	9900-13400
Geraniol	370	4	2	360-380
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	160	4	2	160-170
2-Phenylethanol	2200	4	2	2100-2400
β-Ionon	170	2	1	160-180
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	100	3	2	89-110
Vanillin	570	8	4	500-600

<sup>a</sup> Konzentration des Aromastoffes in µg/kg

<sup>b</sup> Anzahl der durchgeführten Quantifizierungen für den jeweiligen Aromastoff

<sup>c</sup> Anzahl der verwendeten Teechargen (Teepackungen)

### 2.1.3 Vergleich der Ergebnisse vom Teegetränk und Teepulver

Ein Vergleich der Ergebnisse der AEVAs vom DGA-G und DGA-P gab einen Hinweis auf die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Teepulver und Teegetränk. Es gab Aromastoffe, die sowohl im Getränk, als auch im Pulver einen hohen FD-Faktor hatten. Vertreter diese Gruppe waren Linalool, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal,  $\beta$ -Ionon, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon und Vanillin. Andererseits gab es aber auch Aromastoffe, die nur im DGA-P oder nur im DGA-G einen hohen FD-Faktor erhielten. Das waren im Teegetränk 2-Phenylethanol und Phenylacetaldehyd und im Teepulver 3-Methyl-2,4-nonandion, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon und Phenylelessigsäure.

Allerdings gab es keinen wichtigen Aromastoff der einzig im DGA-G oder DGA-P vorkam. Alle Aromastoffe mit einem FD-Faktor  $\geq 32$  wurden sowohl im Teepulver als auch im Teegetränk identifiziert. Deshalb schien ein Vergleich der quantitativen Daten von DGA-G und DGA-P besser geeignet, um die Unterschiede herauszustellen.

Der Vergleich der Quantifizierungsergebnisse von DGA-P und DGA-G zeigte ein sehr erstaunliches Ergebnis. Prinzipiell gab es vier Gruppen von Aromastoffen. Die erste Gruppe hatte im Teegetränk eine sehr stark erhöhte (10-30fache) Konzentration im Vergleich zum Teepulver (Tabelle 19). Darunter die malzig riechenden Aromastoffe 2- und 3-Methylbutanal und 2-Methylpropanal, aber auch das Geraniol mit seiner rosenartigen, blumigen Aromaqualität. Die Aromastoffkonzentrationen der zweiten Gruppe waren im Teegetränk im Vergleich zum Teepulver leicht bis stark erhöht (2-7fach). Zu dieser Gruppe zählte das Linalool aber auch das (E,E)-2,4-Decadienal. Eine ungefähr gleichbleibende Konzentration zeigten die Aromastoffe der dritten Gruppe. Hierzu zählten z.B. das (E)- $\beta$ -Damascenon und das (E,Z)-2,6-Nonadienal. Die letzte Gruppe beinhaltete die Aromastoffe, deren Konzentration im DGA-G im Vergleich zum DGA-P erniedrigt war, darunter das 3-Methyl-2,4-nonandion, das  $\beta$ -Ionon und das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal.

Tabelle 19: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe im Getränk ( $\mu\text{g/l}$ ) und Pulver ( $\mu\text{g}/12\text{g}$ ) aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA)

Aromastoff	DGA-P	DGA-G	m(G)/m(P) <sup>a</sup>
Geraniol	4,4	142	32
(E)-2-Hexenal	3,2	77	24
2-Methylpropanal	3,0	69	23
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	1,2	26	22
2-Methylbutanal	6,5	82	13
3-Methylbutanal	3,8	42	11
Phenylacetaldehyd	7,8	57	7,3
(Z)-3-Hexenol	19	95	5,1
2-Phenylethanol	26	131	5,0
(E,E)-2,4-Decadienal	0,88	2,9	3,3
Vanillin	6,8	22	3,1
Hexanal	19	55	2,9
Hexansäure	144	340	2,3
R/S-Linalool	79	142	1,8
(E)- $\beta$ -Damascenon	0,12	0,15	1,3
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,46	0,56	1,2
(E)-2-Nonenal	0,38	0,39	1,2
(Z)-4-Heptenal	0,61	0,66	1,1
$\beta$ -Ionon	2,0	1,5	0,7
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	1,9	1,1	0,6
3-Methyl-2,4-nonandion	0,74	0,48	0,6
(E,E)-2,4-Nonadienal	1,0	0,45	0,4

<sup>a</sup> Verhältnis der Aromastoffkonzentration im Teegetränk (G) zum Teepulver (P)

## 2.1.4 Vorstufenexperimente

### 2.1.4.1 Freisetzung von Aromastoffen beim Aufbrühen

Der Vergleich der Aromastoffkonzentrationen von DGA-P und DGA-G erbrachte ein erstaunliches Ergebnis. Von der Annahme ausgehend, dass das Teepulver bei der Aufarbeitung erschöpfend extrahiert wurde, wäre es logisch, dass die Konzentrationen im Teegetränk höchstens gleich oder unterhalb der Konzentrationen des Teepulvers liegen müssten. Eine Auswertung der Ergebnisse ergab aber, dass nur etwa die Hälfte der Aromastoffe in gleicher oder geringerer Konzentration im Teegetränk vorhanden waren, während die restlichen eine zum Teil sehr erhebliche Konzentrationszunahme (bis zu einem Faktor von 30) zeigten.

Um zu überprüfen, ob das Teepulver erschöpfend extrahiert wurde, wurde aus einem extrahiertem Teepulver das Lösungsmittel durch Abblasen mit Stickstoff entfernt. Das extrahierte Teepulver hatte nur noch einen sehr schwachen Geruch, der im Vergleich zum Ausgangsaroma vernachlässigbar war. Somit blieb als Konsequenz nur, dass während des Aufbrühens, beim Kontakt mit Wasser, Reaktionen stattfanden, die zusätzliche Verbindungen freisetzen, wobei aber keine neuen Verbindungen gebildet wurden, sondern lediglich bereits vorhandene Aromastoffkonzentrationen erhöht wurden.

Um zu betrachten, wie sich die Wassertemperatur beim Aufbrühen auf die Aromastoffkonzentrationen im Teegetränk auswirkt, wurde einige orientierende Versuche durchgeführt:

Dazu wurden 4 g des Schwarzteepulvers einmal mit kochendem Wasser und einmal bei einer Wassertemperatur von 20 °C für zweieinhalb Minuten aufgegossen und in einem weiteren Versuch wurde der schwarze Tee für fünfzehn Minuten mit kaltem Wasser (20°C) versetzt (s. 3.4). Die Aromastoffe wurden extrahiert und Linalool, Geraniol und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2(5H)-furanon wurden mittels der IVA (s. 3.6.2) quantifiziert.

Im Vergleich zum normalen Aufbrühen war in dem mit 20°C aufgegossenem Tee nur 15% des Linalools vorhanden (Tabelle 20). Durch die längere Einwirkungszeit des kalten Wasser erhöhte sich die Konzentration des Linalools auf 35 µg/l, was 24% der Konzentration vom Linalool beim Aufbrühen mit kochendem Wasser entsprach. Analoge Beobachtungen wurden für Geraniol und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon gemacht.

Tabelle 20: Freisetzung von Tee-Aromastoffen durch Behandlung mit Wasser

	R/S-Linalool		Geraniol		4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	
	c in µg/l <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	c in µg/l <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	c in µg/l <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>
<b>100°C 2,5 min</b>	144	100	116	100	15	100
<b>20°C 2,5 min</b>	15	10	5	5	1,7	11
<b>20°C 15 min</b>	35	24	9	13	2,3	15

<sup>a</sup> Konzentration des Aromastoffes in µg/l

<sup>b</sup> Konzentration des Aromastoffes im Vergleich zur Konzentration des Aromastoffes beim normalen Aufbrühen angegeben in %

Wie die Versuche zeigten, hatte die Temperatur des verwendeten Wassers eine entscheidende Bedeutung bei der Aromastofffreisetzung. Je höher die Temperatur, desto höher waren die Aromastoffkonzentrationen im Tee.

Auf der Suche nach Aromastoffvorstufen beim Aufbrühen wurde die Möglichkeit von glykosidisch gebundenen Aromastoffvorstufen untersucht. Als Untersuchungsmaterial diente das Teepulver aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-P), da im Schwarztee ein Großteil der Glykoside während der Herstellung bereits abgebaut sind.

100 g GD-P wurden mit einer Pufferlösung bei pH 7 extrahiert und die Polyphenole mit Polyclar AT gefällt (s. 3.4). Mittels der IVA (s. 3.6.2) wurde untersucht, wie sich die Aromastoffkonzentrationen von Linalool, 2-Phenylethanol und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2(5H)-furanon bei Umsetzung mit  $\beta$ -Glucosidase und Pectinase ändern. Zur Überprüfung der Funktion der Enzyme wurde Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid als Testsubstanz zugesetzt. Außerdem wurde untersucht, wie sich die Aromastoffkonzentrationen ändern, wenn der Extrakt für zweieinhalb Minuten aufgekocht wird.

Die Testsubstanz Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid reagierte unter Freisetzung von Phenol bei der Umsetzung mit den Enzymen (Tabelle 21), aber nicht beim Erhitzen des Extraktes. Genauso verhielt sich das 2-Phenylethanol. Das Linalool zeigte keine Veränderungen der Aromastoffkonzentration bei den Versuchen, während das 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon einen leichten Anstieg bei der Erhitzung des Extraktes zeigte.

Tabelle 21: Freisetzung von Aromastoffen nach Enzymbehandlung eines Extraktes des Teepulver aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-P)

Aromastoff	µg/kg			
	Blindwert	β-Glucosi- dase	Pectinase	100°C 2,5 min
R/S-Linalool	97	88	88	24
2-Phenylethanol	31	180	170	21
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	150	130	130	180
Phenol	44	100	390	47

Mit diesen Ergebnissen konnte eine Freisetzung von Linalool und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon aus glykosidischen Vorstufen beim Aufbrühen ausgeschlossen werden.

#### 2.1.4.2 Untersuchungen zum Nonatrienal-Precursor

1975 identifizierten *Grosch und Laskawy* zwei Isomere (ohne geometrische Isomerenzuordnung) des 2,4,6-Nonatrienals als Abbauprodukt der Linolensäure unter Lipoxygenasekatalyse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bildung von 2,4,6-Nonatrienal bei der Autoxidation von Linolensäure untersucht.

Linolensäure wurde im wässrigen Medium bei pH 5,5 mit Tween 80 gelöst, 5 min mit Sauerstoff begast und für 14 Stunden bei 40 °C inkubiert (s. 3.4). Anschließend wurden die gebildeten Isomere identifiziert und das (E,E,E)- und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal mittels IVA quantifiziert (s. 3.6.2).

Bei der Autoxidation von Linolensäure bildeten sich die drei gleichen 2,4,6-Nonatrienalisomere, die bereits im Tee identifiziert worden waren. Im Vergleich zur Konzentration der Isomere von 2,4,6-Nonatrienal in der eingesetzten Linolensäure (Blindwert) hat die Konzentration beider quantifizierter Isomere während der Inkubation stark zugenommen (Tabelle 22).

Tabelle 22: Bildung von 2,4,6-Nonatrienal durch autoxidativen Abbau von Linolensäure

		Konzentration von 2,4,6-Nonatrienal <sup>a</sup>	
		Isomer (E,E,E)	Isomer (E,E,Z)
<b>Blindwert<sup>b</sup></b>	1	0,3	n.d. <sup>d</sup>
	2	0,2	n.d. <sup>d</sup>
<b>Versuch<sup>c</sup></b>	1	54	30
	2	83	52

<sup>a</sup> Konzentration von 2,4,6-Nonatrienal in µg/100 mg eingesetzter Linolensäure

<sup>b</sup> Konzentration von 2,4,6-Nonatrienal in Linolensäure

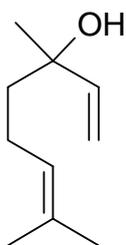
<sup>c</sup> Konzentration von 2,4,6-Nonatrienal nach 14 Stunden Inkubation bei 40 °C

<sup>d</sup> n.d. = nicht detektiert

## 2.1.5 Diskussion

Die höchsten Aromawerte im DGA-G wurden für die Aromastoffe Linalool, Geraniol, (E)-β-Damascenon, 3-Methyl-2,4-nonandion und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal gefunden.

Der in der Literatur meist zitierte Aromastoff ist ohne Zweifel das **Linalool**.



Bisher lag das Hauptaugenmerk auf Linalool, da es in sehr hohen Mengen im Tee vorkommt. Ausserdem wurde Linalool bei einer von *Guth und Grosch (1993)* durchgeführten AEVA von Schwarzteepulver als der Aromastoff mit dem höchsten FD-Faktor identifiziert. Aber auch bei einer von *Masuda und Kumazawa (2000)* durchgeführten AEVA von Schwarzteegetränk konnte ein hoher FD-Faktor für Linalool ermittelt

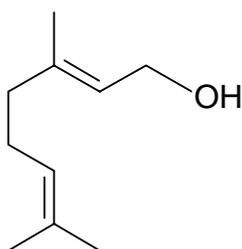
werden. Mit den jetzt erzielten Ergebnissen konnte die entscheidende Bedeutung von Linalool für das Teearoma bewiesen werden. Im untersuchten Schwarzteegetränk war Linalool der Aromastoff mit dem höchsten Aromawert.

Laut *Constantinidis et al. (1995)* wurde Linalool 1937 von Yamamoto und Itoh in Blättern von schwarzen Tee erstmals identifiziert. Linalool existiert aufgrund seines Asymmetriezentrums in zwei enantiomeren Formen: Dem R- und S-Linalool, wobei das Verhältnis von entscheidender Bedeutung ist, da die R-Form eine viel niedrigere Geruchsschwelle aufweist als das S-Linalool (*Jagella, 1999*) und somit die Menge des vorhandenen R-Linalools allein ausschlaggebend für das Linalool-Aroma war.

Sowohl im Teepulver als auch im Teegetränk des DGA lag ein fast racemisches Gemisch vor (R/S=54/46).

Bereits 1981 vermutete *Takeo*, dass Linalool aus einer  $\beta$ -D-glucosidischen Vorstufe beim hydrolytischen Abbau freigesetzt wird. Außerdem postulierte er eine enzymatische Freisetzung des Aromastoffes während der Fermentation. 1994 isolierten *Guo et al.* das (S)-Linalyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid aus frischen Teeblättern und *Kobayashi et al. (2000)* identifizierten das Linalyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und das Linalyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid im Schwarzteepulver. Gleichzeitig untersuchten *Kobayashi et al. (2000)* die Veränderung der Glykosidkonzentrationen während der Schwarzteeherstellung. Die Glykoside wurden durch kochendes Wasser extrahiert und der Extrakt auf einer XAD-2 Säule in verschiedene Fraktionen aufgeteilt um die Glykoside zu isolieren. Nach Derivatisierung der Glykoside zu Trifluoracetaten wurden sie mit Hilfe eines internen Standards am HRGC quantifiziert. Es wurden die Glykosidgehalte in frischen, in getrockneten, in gerollten und in fermentierten Teeblättern gemessen. Das Linalyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid nahm während den Produktionsschritten kontinuierlich ab (Tabelle 23), wobei die prozentual größte Abnahme nach dem Rollen stattgefunden hat. Durch die Isolierung von  $\beta$ -Glykosidase (*Yano et al., 1990*) und  $\beta$ -Primeverosidase (*Guo et al., 1996; Ijima et al., 1998*) aus Teeblättern wird eine enzymatische Freisetzung von Linalool aus den Glykosidvorstufen vermutet.

Strukturell verwandt mit dem Linalool ist das **Geraniol**.



Ähnlich zum Linalool wurde Geraniol aufgrund seiner hohen Konzentration in zahlreichen Veröffentlichungen als wichtige flüchtige Verbindung angesehen. Ebenso wie für das Linalool wurden für das Geraniol hohe FD-Faktoren bei der von *Guth und Grosch (1993)* und von *Masuda und Kumazawa (2000)* durchgeführten AEVA von Schwarzteepulver und

Schwarzteegetränk ermittelt. In dieser Arbeit konnte erstmalig bewiesen werden, dass Geraniol im Schwarzteegetränk ein wichtiger Aromastoff ist.

Tabelle 23: Veränderung ausgesuchter Glykosidkonzentrationen während der Herstellung von Schwarzteepulver nach *Kobayashi et al. (2000)*

Glykosid	mg/kg			
	frische Blätter	gewelkte Blätter	gerollte Blätter	fermentierte Blätter
Linalyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	40	34	13	10
Geranyl-6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	6	4	9	2
Geranyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	3	2	4	2
Geranyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	164	123	2	1

Es wurde laut *Constantinidis et al. (1995)* bereits 1935 von Yamamoto und Kato in schwarzen Tee identifiziert und wie beim Linalool postulierte *Takeo (1980)*  $\beta$ -D-glucosidische Vorstufen. 1993 isolierten und identifizierten *Guo et al.* Geranyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und 1996 gelang *Nishikitani et al.* die Isolierung und Identifizierung von Geranyl-6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid aus frischen Teeblättern. Diese beiden Glykoside und das Geranyl- $\beta$ -D-glucopyranosid wurden von *Kobayashi et al. (2000)* nach Derivatisierung im Schwarzteepulver identifiziert und die Veränderungen der Glykosidkonzentrationen während der Schwarzteeherstellung untersucht (s.o.). Während beim Geranyl-6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und beim Geranyl- $\beta$ -D-glucopyranosid keine Konzentrationsveränderungen zu beobachten waren (Tabelle 23), so zeigte das Geranyl-6-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid eine starke Konzentrationsabnahme nach dem Rollen. Ähnlich wie beim Linalool erfolgt die Freisetzung enzymatisch.

(E,E,E)-, (E,Z,E)- und (E,E,Z)-**2,4,6-Nonatrienal** (Abbildung 11) wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals im Schwarztee pulver und im Schwarzteegetränk identifiziert und charakterisiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Geruchsschwellen der Isomere war nur das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal mit seinem Geruch nach Haferflocken/süß am Gesamtaroma des untersuchten Schwarztees beteiligt. Die niedrige Geruchsschwelle in Wasser von 0,026 µg/l sowie die niedrige Konzentration ist wahrscheinlich der Grund, dass dieser potente Aromastoff erst jetzt im Tee entdeckt wurde.

Die Isomere des 2,4,6-Nonatrienals wurden bisher nur in sieben Lebensmitteln detektiert, wobei bis dato keine exakte Strukturaufklärung der Isomere durchgeführt wurde. Zwar gelang es *Buttery (1975)* das vermutliche (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal nahezu isomerenrein zu synthetisieren, das aufgenommene <sup>1</sup>H-NMR Spektrum erlaubte aber keine genaue Identifizierung, da die Auflösung der Methingruppen nicht ausreichend war um sie klar zu differenzieren.

*Buttery* war auch 1975 der erste, der 2,4,6-Nonatrienal im Lebensmittel fand. Bei der Untersuchung von roten und weißen Bohnen identifizierte er das vermutliche (E,E,E)- und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal.

*Götz-Schmidt und Schreier (1986)* stießen auf drei Isomere des 2,4,6-Nonatrienals bei der Untersuchung von Endiviansalat. Nach *Buttery (1975)* ordneten sie diesen Isomeren die geometrische Struktur (E,E,E), (E,E,Z) und (E,Z,Z) zu.

Zwei Jahre später untersuchte die gleiche Forschergruppe *Götz-Schmidt und Schreier (1988)* Lamb's Lettuce, einen europäischen Wintersalat, und identifizierte darin das (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal.

Bei der Untersuchung von Curubafrucht, einer südamerikanischen Passionsfrucht, fanden *Fröhlich et al. (1989)* ein Isomer des 2,4,6-Nonatrienals, welchem sie die Geometrie (E,Z,Z) zuordneten.

1996 entdeckten *Näf und Velluz* das 2,4,6-Nonatrienal (eine geometrische Zuordnung, um welches Isomer es sich handelt wurde nicht diskutiert) in Orangensaft. Im Rahmen der gleichen Arbeit wurde auch das Aroma von Blutorangensaft untersucht – hier konnte das 2,4,6-Nonatrienal aber nicht detektiert werden.

Zwei Isomere des 2,4,6-Nonatrienals wurden 1997 von *Triqui und Guth* in gereiften Anchovis gefunden. Eine geometrische Zuordnung der Isomere wurde nicht diskutiert. Die letzte Identifizierung von 2,4,6-Nonatrienal war im Jahr 2000, als *Näf und Velluz* die flüchtigen Verbindungen von gekochtem Spinat untersuchten und dort das (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal als Spurenkomponente fanden.

Bereits *Buttery (1975)* machte sich Gedanken, wie das 2,4,6-Nonatrienal gebildet wird. Er vermutete einen Linolensäureabbau, aber gleichzeitig gab er zu Bedenken, dass der Bildungsmechanismus aufgrund der drei Doppelbindungen im Molekül unterschiedlich zum Bildungsmechanismus anderer ungesättigter Aldehyde sein muss.

1975 führten *Grosch und Laskawy* einen Modellversuch mit Linolensäure und Lipoxygenase aus Sojabohnen durch, bei dem zwei Isomere des 2,4,6-Nonatrienals gebildet wurden. Erstaunlicherweise bildete sich das 2,4,6-Nonatrienal nur beim enzymatischen Linolensäureabbau bei pH=6,5. Also waren nur die Lipoxygenase L-2 und L-3 fähig das 2,4,6-Nonatrienal zu bilden. Diese Lipoxygenasen bilden sowohl das 9- als auch das 13-Hydroperoxid.

Ein Jahr später fanden *Grosch et al. (1976)* das 2,4,6-Nonatrienal auch als Abbauprodukt der Linolensäure durch Kartoffel- und Bohnenlipoxygenase, aber wiederum nur im neutralen Medium.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde entdeckt, dass sich das 2,4,6-Nonatrienal nicht nur durch enzymatischen Abbau von Linolensäure bildet, sondern auch bei der Autoxidation.

Im Vergleich zu anderen Abbauprodukten der Linolensäure wie z.B. (E,Z)-2,6-Nonadienal ist das 2,4,6-Nonatrienal höher oxidiert und somit ist entweder ein ähnlicher Bildungsweg ausgeschlossen oder eine Oxidation, z.B. durch ein Enzym, muss während des Abbauweges stattfinden.

Ein alternativer Bildungsweg könnte von Dihydroperoxiden ausgehen, da diese durch die zweite Hydroperoxidgruppe im Molekül höher oxidiert sind, als die Monohydroperoxide. Dihydroperoxide wurden 1982 von *Neff et al.* bei der lichtinduzierten Autoxidation von Linolensäuremethylester isoliert. Als Hauptprodukt entstanden zwei Isomere des 9,16-Dihydroperoxides. Ebenfalls das 9,16-Dihydroperoxid wurde 1991 von *Grechkin et al.* beim Umsatz von Linolensäure mit Lipoxygenase aus Kartoffeln isoliert. Erstaunlich ist, dass die Hydroperoxide nur im neutralen pH-Bereich gebildet wurden, also nicht von der Lipoxygenase Typ 1. Dieses Ergebnis passt gut zur Erkenntnis von *Grosch und Laskawy (1975)*, da in diesen Experimenten das 2,4,6-Nonatrienal auch nur im neutralen Bereich gebildet wurde.

Unter der Annahme, dass die Bildung von 2,4,6-Nonatrienal vom 9,16-Dihydroperoxide der Linolensäure ausgeht, kann folgender hypothetische Bildungsweg formuliert werden.

Nach Protonierung und Abspaltung von Wasser in Position 9 am 9,16-Dihydroperoxid (I) erfolgt eine Umlagerung, wobei das elektronenreiche System mit den drei Doppelbindungen am freien Sauerstoff angreift. Durch eine Wasseranlagerung wird Nonansäurealdehyd (II) abgespalten und durch Wasserstoffperoxidabspaltung wird das 2,4,6-Nonatrienal (III) aus dem 7-Hydroperoxid des 1,3,5-Nonatrienols erhalten.

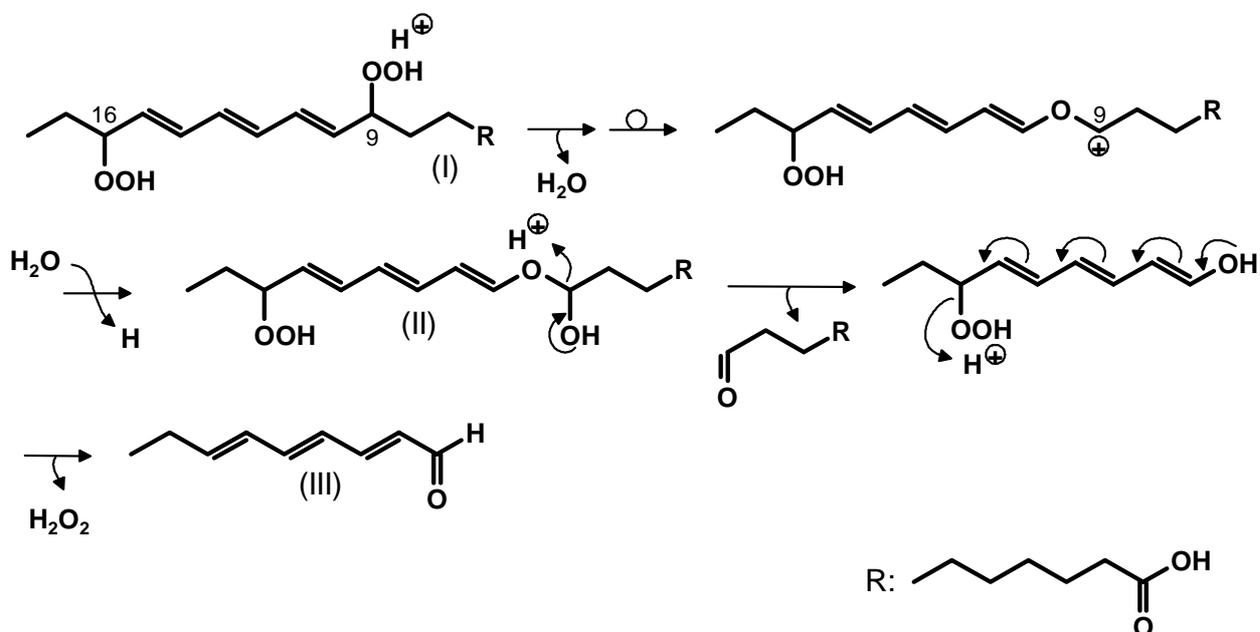
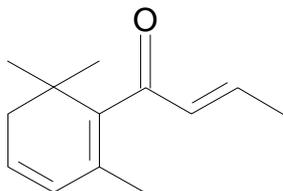


Abbildung 26: Hypothetischer Bildungsweg von 2,4,6-Nonatrienal ausgehend vom 9,16-Dihydroperoxid der Linolensäure

Ebenfalls einen hohen Aromawert im Schwarzteegetränk erhielt der Aromastoff **(E)- $\beta$ -Damascenon**.

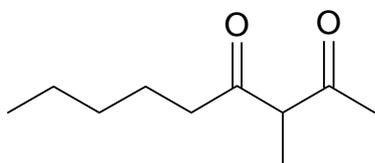


(E)- $\beta$ -Damascenon ist nur eine Minorkomponente im Tee, so dass es erst 1974 von *Renold et al.* im Schwarztee identifiziert wurde. Trotz seiner geringen quantitativen Menge im Tee ist es durch seine sehr niedrige Geruchsschwelle von 0,004  $\mu\text{g/l}$  (*Schieberle, 1991*) ein potenter Aromastoff.

*Sen et al. (1991)* quantifizierten das (E)- $\beta$ -Damascenon im Schwarzteepulver durch Stabilisotopenassays. Nach Lösungsmittlextraktion, Zugabe des markierten (E)- $\beta$ -Damascenon und Vakuumdestillation wurde der Gehalt mittels HRGC/MS bestimmt. Zwei Teeproben wurden untersucht und Konzentrationen von 1,1  $\mu\text{g/kg}$  und 1,7  $\mu\text{g/kg}$  quantifiziert. Mit einem Gehalt von 9,8  $\mu\text{g/kg}$  lag die Konzentration von (E)- $\beta$ -Damascenon im DGA-P um das sechs- bis zehnfache höher als in den von *Sen et al. (1991)* untersuchten Teeproben. Bei der von *Guth und Grosch (1993)* durchgeführten AEVA von Schwarzteepulver wurde das (E)- $\beta$ -Damascenon als einer der Aromastoffe mit dem höchsten FD-Faktor bestimmt.

Als Bildungsweg im Schwarztee wurde von *Reynold et al. (1974)* der Abbau von Carotenoiden postuliert. In anderen Lebensmitteln wie z.B. Fruchtsäften oder Wein wird das (E)- $\beta$ -Damascenon aus glykosidischen aber auch nicht glykosidischen Vorstufen durch säurekatalysierte und thermische Behandlung freigesetzt (*Skouroumounis et al, 1993*). Welche Vorstufen für die Bildung von (E)- $\beta$ -Damascenon im Tee verantwortlich sind, konnte aber bisher nicht geklärt werden.

Das **3-Methyl-2,4-nonandion** wurde aufgrund seiner niedrigen Geruchsschwelle erst



durch Anwendung der AEVA 1993 von *Guth und Grosch* im grünen und schwarzen Tee identifiziert. Bis 1993 war 3-Methyl-2,4-nonandion mit seinem heuartigen Geruch nur als Off-Flavor in Speiseölen (*Guth und Grosch, 1989*

*und 1992*) bekannt. Gebildet wird der Aromastoff laut *Guth und Grosch (1993b)* durch lichtinduzierten oxidativen Abbau der Furanfettsäuremethylester Methyl-10,13-epoxy-11,12-dimethyloctadeca-10,12-dienoat und Methyl-12,15-epoxy-13,14-dimethyleicosa-12,14-dienoat.

Der Vergleich der Aromastoffkonzentrationen von Teepulver und Teegetränk erbrachte ein erstaunliches Ergebnis. Eine Auswertung der Ergebnisse ergab, dass nur etwa die Hälfte der Aromastoffe in gleicher oder geringerer Konzentration im Teegetränk vorhanden waren, während die restlichen eine zum Teil sehr erhebliche Konzentrationszunahme (bis zu einem Faktor von 30) zeigten.

Durch einen Versuch im Rahmen dieser Arbeit konnte die Spaltung von Terpenalkoholglykosiden unter Aufbrühbedingungen ausgeschlossen werden. Welche Reaktionen während des Aufbrühens stattfanden, lässt sich nur vermuten. So wäre Geranylpyrophosphat eine denkbare Vorstufe für Linalool und Geraniol, oder instabile Hydroperoxide der Fettsäuren für die Fettsäureabbauprodukte.

Der Grund für den Konzentrationsunterschied einiger Aromastoffe zwischen Teepulver und Teegetränk bleibt weiter unklar. Glykosidische Vorstufen können ausgeschlossen werden, aber leider konnten im Rahmen dieser Arbeit auch keine Beweise für Aromastoffvorstufen, die Aromastoffe während des Aufbrühvorganges freisetzen, gefunden werden.

## 2.2 Potente Aromastoffe im „Grüner Darjeeling“

Als nächstes wurden die wichtigen Aromastoffe im Grüntee untersucht. Dafür wurde ein grüner Tee aus dem Darjeeling Anbaugebiet gewählt, um einen direkten Vergleich zum bereits untersuchtem schwarzen Tee (DGA) herstellen zu können. Das Zielstellung war den Einfluß der Fermentation auf die Zusammensetzung und Konzentrationen der Aromastoffe darzustellen.

### 2.2.1 Aromastoffe im Teegetränk (GD-G)

#### 2.2.1.1 Aromaprofilanalyse

Analog zum DGA wurde mit der Erstellung einer Aromaprofilanalyse des Teegetränkes begonnen. Dazu wurde der frisch aufgebrühte Tee auf 50°C temperiert und einem geschulten Sensorikpanel zur Bewertung vorgelegt. Die teilnehmenden Sensoriker mussten die vorgegebenen Geruchseindrücke nach ihrer Intensität (0=nicht; 1=schwach; 2=deutlich; 3=stark wahrnehmbar) bewerten.

Der dominierende Geruchseindruck war heuartig (1,9) (Abbildung 27), dicht gefolgt von citrusartig/fruchtig (1,7). Mit einem kleinen Abstand folgen die Aromaqualitäten rosenartig/nach Honig (1,4), grasig/grün (1,2) und nach Haferflocken/süß (1,2) bevor die restlichen Geruchseindrücken mit Intensitäten von 0,8 bis 0,5 folgten.

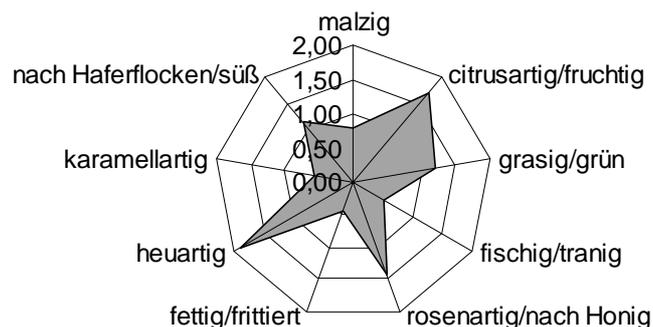


Abbildung 27: Orthonasale Aromaprofil Analyse des Teegetränks aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G)

### 2.2.1.2 Aromaextraktverdünnungsanalyse und Identifizierungen

Die AEVA und Identifizierungen der Aromastoffe des GD-G wurden in analoger Weise zum DGA-G (s. 2.1.1.2) durchgeführt. Aufgrund der zu erwartenden niedrigeren Aromastoffkonzentrationen (Fehlen der enzymatischen Reaktionen bei der Grünteeherstellung) wurde für die AEVA 50g Teepulver mit 4,2 Liter warmen (70°C) Wasser aufgegossen. Zur Identifizierung der relevanten Aromastoffe wurden 200g Teepulver aufgearbeitet.

Im GD-G wurden die höchsten FD-Faktoren für Vanillin (**47**, nach Vanille, FD 1024) (Tabelle 24), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (**45**, nach Liebstockel, FD 512), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (**41**, karamellartig, FD 256), 3-Methyl-2,4-nonandion (**27**, heuartig, FD 128), Phenyllessigsäure (**46**, nach Honig, FD 128) und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (**35**, nach Haferflocken, süß, FD 64) ermittelt.

Tabelle 24: Wichtige Aromastoffe (FD≥1) im Extrakt aus dem Teegetränk der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G)

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	Retentionsindex <sup>d</sup>			FD <sup>e</sup>
			FFAP	OV-1701	SE-54	
5	Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	1049	906	848	1
7	3-Methylbutylacetat	nach Banane	1114	943	878	4
8	(Z)-3-Hexenal	grün	1148	884	800	1
10	(Z)-4-Heptenal	fischig, tranig	1240	988	900	1
12	1-Octen-3-on	pilzartig	1298	1071	979	8
13	(Z)-1,5-Octadien-3-on <sup>g</sup>	nach Geranie	1373	1086	981	1
14	(Z)-3-Hexen-1-ol	grün	1381	971	858	2
15	Methional	nach gek. Kartoffeln	1439	1040	905	1
16	(E,E)-2,4-Heptadienal	fettig	1489	1135	1012	2
18	(E)-2-Nonenal	fettig, grün	1527	1275	1153	1
19	R/S-Linalool	citrusartig	1541	1198	1098	8
21	(E,Z)-2,6-Nonadienal	nach Gurke	1583	1275	1130	16
23	Butansäure	schweissig	1625	984	821	1
24	Phenylacetaldehyd	nach Honig	1642	1178	1038	1

Tabelle 24: Fortsetzung

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	Retentionsindex <sup>d</sup>			FD <sup>e</sup>
			FFAP	OV-1701	SE-54	
25	3-Methylbutansäure	schweissig	1663	1046	870	1
26	(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig, grün	1695	1348	1213	8
27	3-Methyl-2,4-nonandion	heuartig	1719	1398	1242	128
28	Pentansäure	schweissig	1730	1086	911	1
30	(E,E)-2,4-Decadienal	fettig, frittiert	1804	1453	1318	2
31	(E)- $\beta$ -Damascenon	fruchtig	1815	1500	1387	8
32	Hexansäure	schweißig	1840	1192	1020	1
35	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	nach Haferflocken	1877	1426	1269	64
36	2-Phenylethanol	nach Honig	1910	1270	1116	8
37	$\beta$ -Ionon	nach Veilchen	1948	1617	1490	8
38	$\delta$ -Octalacton	nach Kokos	1982	1475	1261	8
40	4,5-Epoxy-(E)-2-decenal <sup>g</sup>	metallisch	2006	1563	1379	32
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	karamellartig	2025	1248	1071	256
43	Bis-2(methyl-3-furyl)disulfid <sup>g</sup>	fleischig	2153	1639	1534	2
44	3-Ethylphenol	phenolisch, rauchig	2205	1395	1169	2
45	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	nach Liebstöckel	2220	1356	1112	512
46	Phenyllessigsäure	nach Honig	2582	1531	1262	128
47	Vanillin	nach Vanille	2605	1661	1400	1024

<sup>a</sup> Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Säule

<sup>b</sup> Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen aufgrund folgender Kriterien : Vergleich der RI-Werte auf den angegebenen Säulen; Vergleich der Geruchsschwelle und Geruchsqualität am Sniffing-Port; Vergleich der Massenspektren im EI- Und CI-Modus

<sup>c</sup> Geruchsqualität des Aromastoffes am Sniffing-Port

<sup>d</sup> Linearer Retentionsindex

<sup>e</sup> Flavour Dilution Faktor

<sup>g</sup> Es konnte kein Massenspektrum der Substanz erhalten werden; Die Identifizierung erfolgte an Hand der restlichen Kriterien in <sup>b</sup>

Auch im GD-G wurde das Verhältnis zu R- und S-Linalool in der gleichen Weise wie beim DGA-G (s. 2.1.1.3) bestimmt. Im GD-G lag ein fast racemisches Gemisch von R- und S-Linalool von 57% zu 43% vor.

### 2.2.1.3 Quantifizierung relevanter Aromastoffe

Zur Quantifizierung der Aromastoffe vom GD-G wurden die gleichen isotoopenmarkierten Standards verwendet, wie beim DGA-G (s. 2.1.1.4). Auch die Aufarbeitungsmethode für die Stabilisotopenassays unterschied sich mit Ausnahme der Wassertemperatur nicht zu der von den Schwarzteegetränken.

Neben den in der AEVA identifizierten wichtigen Aromastoffen des GD-G wurden noch die im DGA-G als wichtig identifizierten Aromastoffe quantifiziert um die Ergebnisse von Schwarz- und Grüntee vergleichen zu können.

Vanillin und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon waren mit einem Gehalt von ca. 10 µg/l (Tabelle 25), die Aromastoffe mit der höchsten Konzentration im GD-G. Es folgten mit Gehalten um die 3 bis 6 µg/l Linalool, 2-Methylbutanal, 2-Phenylethanol und Hexanal, gefolgt von fünf Aromastoffen, die noch einen Gehalt über 1,0 µg/l hatten. Für die restlichen Aromastoffe wurden Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 0,02 µg/l gemessen.

### 2.2.1.4 Ermittlung der Aromawerte

Die Aromawerte der quantifizierten Aromastoffe des GD-G wurden unter Berücksichtigung der quantifizierten Daten und der bereits für den Schwarztee ermittelten Schwellenwerte (s. 2.1.1.5) berechnet.

Der höchste Aromawert von 31 wurde für 3-Methyl-2,4-nonandion ermittelt (Tabelle 26). Mit Abstand folgten die Aromastoffe (E)-β-Damascenon (AW 7,2), Linalool (AW 6,2), (Z)-4-Heptenal (AW 4,7), (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (AW 3,6), (E,Z)-2,6-Nonadienal (AW 2,6), 2-Methylbutanal (AW 1,0) und 3-Methylbutanal (AW 1,0). Die Aromastoffe 2-Methylpropanal, 1-Octen-3-on, (E,E)-2,4-Decadienal, Ethyl-2-methylbutanoat, Hexanal, Phenylacetaldehyd, β-Ionon, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, (Z)-3-Hexen-1-ol, (E)-2-Nonenal, (E,E)-2,4-Nonadienal, Geraniol, (E)-2-Hexenal, 2-Phenylethanol und Vanillin hatten einen Aromawert unter eins und trugen deshalb nicht zum Gesamtaroma des GD-G bei.

Tabelle 25: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe im Teegetränk aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G)

Aromastoff	c in µg/l <sup>a</sup>	N Q. <sup>b</sup>	N C. <sup>c</sup>	Bereich [µg/l]
2-Methylpropanal	1,2	2	2	1,1-1,3
3-Methylbutanal	1,2	2	2	1,0-1,3
2-Methylbutanal	4,4	2	2	4,0-4,9
Ethyl-2-methylbutanoat	0,02	2	1	0,02
Hexanal	3,3	3	1	3,1-3,5
(E)-2-Hexenal	1,2	2	2	1,2-1,3
(Z)-4-Heptenal	0,30	3	2	0,28-0,34
1-Octen-3-on	0,02	2	2	0,02
(Z)-3-Hexen-1-ol	2,0	3	2	1,9-2,0
(E)-2-Nonenal	0,08	3	2	0,07-0,09
R/S-Linalool	6,1	3	2	6,0-6,4
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,06	3	2	0,06-0,07
Phenylacetaldehyd	1,8	3	2	1,4-2,2
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,04	3	2	0,03-0,04
3-Methyl-2,4-nonandion	0,40	5	3	0,37-0,42
(E,E)-2,4-Decadienal	0,07	3	2	0,05-0,08
(E)-β-Damascenon	0,03	3	2	0,02-0,03
Geraniol	0,43	5	3	0,40-0,48
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	0,09	4	3	0,07-0,12
2-Phenylethanol	3,6	3	2	3,1-3,8
β-Ionon	0,07	2	1	0,07
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	9,1	3	2	8,5-9,7
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	0,12	2	2	0,09-0,14
Vanillin	10	2	1	9,8-10,1

<sup>a</sup> Konzentration des Aromastoffes im Teegetränk in µg/l

<sup>b</sup> Anzahl der durchgeführten Quantifizierungen für den jeweiligen Aromastoff

<sup>c</sup> Anzahl der verwendeten Teechargen (Teepackungen)

Tabelle 26: Aromawerte wichtiger Aromastoffe im Teegetränk aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G)

Aromastoff	Aromawert
3-Methyl-2,4-nonandion	31
(E)- $\beta$ -Damascenon	7,2
R/S-Linalool	6,2
(Z)-4-Heptenal	4,7
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	3,6
(E,Z)-2,6-Nonadienal	2,6
3-Methylbutanal	1,0
2-Methylbutanal	1,0

### 2.2.1.5 Aromasimulation und Weglassversuche

Durch Mischen der Aromastoffe mit einem Aromawert größer und gleich eins wurde entsprechend der quantifizierten Konzentrationen ein Modelltee mit der Matrix Wasser erstellt (s. 3.5.4).

Das erstellte, auf 50°C temperierte Rekombinat, wurde von einem geschulten Sensorikpanel bewertet. Dabei wurden dem Sensorikpanel die gleichen Aromaeindrücke vorgegeben, nach denen das DGA-G (s. 2.1.1.1) bewertet wurde. Das Sensorikpanel musste die Aromaeindrücke entsprechend ihrer Intensität bewerten (0=nicht; 1=schwach; 2=deutlich; 3=stark wahrnehmbar).

Die Geruchseindrücke citrusartig/fruchtig (1,8), rosenartig/nach Honig (1,4) und grasig/grün (1,3) wurden am Höchsten bewertet (Abbildung 28), dicht gefolgt von den Aromanoten heuartig (1,2), nach Haferflocken/süß (1,1) und malzig (0,8). Nur schwach detektiert wurden die Geruchseindrücke fettig/frittiert (0,6), fischig/tranig (0,5) und karamellartig (0,5).

Der einzige Unterschied zwischen dem Rekombinat und dem Originaltee war ein verminderter heuartiger Aromaeindruck beim Rekombinat. Alle anderen Geruchseindrücke erhielten identische Bewertungen.

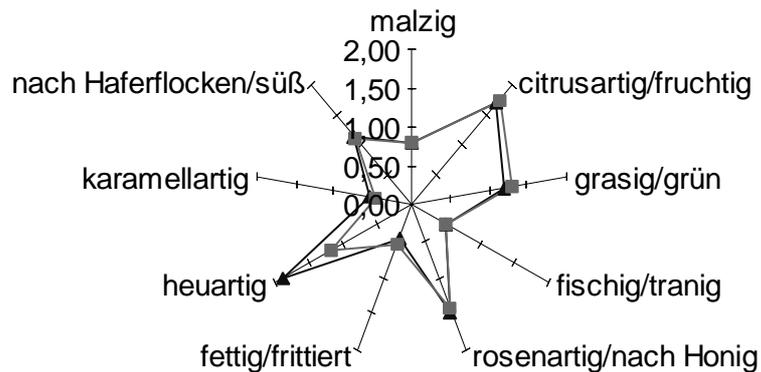


Abbildung 28: Vergleich der Aromaprofile des Rekombinates (■) und des Originalteegetränks (▲) aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G)

Die Gesamtübereinstimmung des Rekombinates gegenüber dem Originalteegetränk wurde mit 2,3 vom Sensorikpanel bewertet (0=keine; 1=geringe; 2=gute; 3=vollkommene Übereinstimmung).

Zur Untersuchung der Bedeutung einzelner Aromastoffe für das Gesamtaroma des Rekombinates des GD-G wurden Weglassversuche durchgeführt. Jeweils ein Teilrekombinat mit einer oder mehreren fehlenden Komponenten wurde in einem Triangeltest einem geschulten Sensorikpanel gegen zwei Vollrekombinat zur Bewertung gegeben (s. 3.5.5).

Das jeweilige Fehlen von 2- und 3-Methylbutanal (1), (E,Z)-2,6-Nonadienal (5), Linalool (6) und (Z)-4-Heptenal (7) wurde nicht erkannt (Tabelle 27). Teilweise, aber nicht signifikant wurden Aromasimulationen erkannt, in denen nur 3-Methyl-2,4-nonandion (2) oder (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (4) fehlte. Sogar ein Rekombinat, das nur aus 3-Methyl-2,4-nonandion, (E)- $\beta$ -Damascenon und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (8) bestand, konnte nicht signifikant von einem Vollrekombinat unterschieden werden. Einzig das Fehlen von (E)- $\beta$ -Damascenon wurde hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) erkannt.

Tabelle 27: Unterschiedsprüfungen am Vollrekombinat des Teegetränks aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G)

Nr. <sup>a</sup>	fehlende(r) Aromastoff(e) <sup>b</sup>	N Prüfer <sup>c</sup>	N Unterschied erkannt <sup>d</sup>
1	2- und 3-Methylbutanal	10	2
2	3-Methyl-2,4-nonandion	10	6
3	(E)- $\beta$ -Damascenon	10	8
4	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	12	5
5	(E,Z)-2,6-Nonadienal	12	2
6	Linalool	11	4
7	(Z)-4-Heptenal	11	4
8	2- und 3-Methylbutanal, (E,Z)-2,6-Nonadienal, Linalool, (Z)-4-Heptenal	12	7

<sup>a</sup> Nummer der durchgeführten Unterschiedsprüfungen

<sup>b</sup> im Teilrekombinat fehlender Aromastoff im Vergleich zum Vollrekombinat

<sup>c</sup> Anzahl der mitwirkenden Sensoriker

<sup>d</sup> Anzahl der Sensoriker, die das Teilrekombinat von den Vollrekombinaten unterscheiden konnten

## 2.2.2 Aromastoffe im Teepulver (GD-P)

Nach den erstaunlichen Ergebnissen beim Vergleich der Aromastoffkonzentrationen von Schwarzteepulver und –getränk wurde nun analog das Grünteepulver (GD-P) untersucht. Die Ergebnisse sollten ein Hinweis geben, ob die Veränderungen der Aromastoffkonzentrationen beim Aufbrühen von der Schwarzteeherstellung (Fermentation) abhängig sind.

### 2.2.2.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse

Die wichtigen Aromastoffe des Grünteetegetränkes wurden bereits (s. 2.2.1.2) identifiziert, so dass es zur Untersuchung, ob sich die Aromastoffzusammensetzung beim Aufgiessen ändert, nur noch nötig war, die wichtigen Aromastoffe des Grünteepulvers zu untersuchen. Dazu wurde eine AEVA von 50 g GD-P durchgeführt. Die Aufarbeitung zur AEVA und die Identifizierungen erfolgten in analoger Weise zum Schwarzteepulver DGA-P (s. 2.1.2.1). Es wurden insgesamt nur 24 Aromastoffe mit einem FD-Faktor  $\geq 1$  (Tabelle 28) identifiziert.

Tabelle 28: Wichtige Aromastoffe (FD $\geq$ 1) im Extrakt aus dem Teepulver der Sorte Grüner Darjeeling (GD-P)

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	RI-Wert <sup>d</sup>			FD <sup>e</sup>
			FFAP	OV-1701	SE-54	
5	Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig	1049	906	848	4
8	(Z)-3-Hexenal	grün	1148	884	800	8
10	(Z)-4-Heptenal	fischig, tranig	1240	988	900	64
12	1-Octen-3-on	pilzartig	1298	1071	979	8
13	(Z)-1,5-Octadien-3-on <sup>f</sup>	nach Geranie	1373	1086	981	4
14	(Z)-3-Hexen-1-ol	grün	1381	971	858	4
16	(E,E)-2,4-Heptadienal	fettig	1489	1135	1012	8
18	(E)-2-Nonenal	fettig, grün	1527	1275	1153	8
19	R/S-Linalool	citrusartig	1541	1198	1098	16
21	(E,Z)-2,6-Nonadienal	nach Gurke	1583	1275	1130	8
23	Butansäure	schweissig	1625	984	821	1
24	Phenylacetaldehyd	nach Honig	1642	1178	1038	4
26	(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig, grün	1695	1348	1213	8
27	3-Methyl-2,4-nonandion	heuartig	1719	1398	1242	64
30	(E,E)-2,4-Decadienal	fettig	1804	1453	1318	16
31	(E)- $\beta$ -Damascenon	fruchtig	1815	1500	1387	4
35	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	nach Haferflocken	1877	1426	1269	64
36	2-Phenylethanol	nach Honig	1910	1270	1116	1
37	$\beta$ -Ionon	nach Veilchen	1948	1617	1490	2
40	4,5-Epoxy-(E)-2-decenal <sup>f</sup>	metallisch	2006	1563	1379	16
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	karamellartig	2025	1248	1071	2
45	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	nach Liebstöckel	2220	1356	1112	8
46	Phenylessigsäure	nach Honig	2582	1531	1262	2
47	Vanillin	nach Vanille	2605	1661	1400	32

- <sup>a</sup> Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Säule
- <sup>b</sup> Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen aufgrund folgender Kriterien : Vergleich der RI-Werte auf den angegebenen Säulen; Vergleich der Geruchsschwelle und Geruchsqualität am Sniffing-Port; Vergleich der Massenspektren im EI- Und CI-Modus
- <sup>c</sup> Geruchsqualität des Aromastoffes am Sniffing-Port
- <sup>d</sup> Linearer Retentionsindex
- <sup>e</sup> Flavour Dilution Faktor
- <sup>f</sup> Es konnte kein Massenspektrum der Substanz erhalten werden; Die Identifizierung erfolgte an Hand der restlichen Kriterien in <sup>b</sup>

Die Aromastoffe mit dem höchsten FD-Faktor von 64 wurden als (Z)-4-Heptenal (**10**, fischig, tranig), 3-Methyl-2,4-nonandion (**27**, heuartig) und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (**35**, nach Haferflocken, süß) identifiziert, dicht gefolgt von Vanillin (**47**, nach Vanille) mit einem FD-Faktor von 32.

Das Enantiomerenverhältnis von Linalool wurde mittels zweidimensionaler Gaschromatographie/Massenspektrometrie (TDHRGC/MS) bestimmt (s. 3.6.3). Als zweite Säule diente dabei eine chirale Säule, um die beiden Enantiomere vollständig zu trennen. Das Verhältnis von R- zu S-Linalool wurde im GD-P als 56% zu 44% bestimmt.

#### **2.2.2.2 Quantifizierung der relevanten Aromastoffe**

Zum Vergleich der Aromastoffkonzentrationen im Grünteepulver und Grüntegetränk wurden diese nach dem Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse quantifiziert. Die Daten des GD-G wurden bereits in 2.2.1.3 besprochen. Für die Quantifizierung der Aromastoffe im GD-P wurden die gleichen isotopenmarkierten Standards, welche vor der Lösungsmittlextraktion zugegeben wurden, verwendet wie im Grüntegetränk. Die weitere Aufarbeitung war analog zum DGA-P (s. 2.1.2.2).

Im GD-P gab es drei dominierende Aromastoffe mit Konzentrationen zwischen 300 und 400 µg/kg: Linalool, Vanillin und Hexanal. Mit Abstand folgten die restlichen Aromastoffe mit Konzentrationen zwischen 1,0 und 100 µg/kg. Nur (E)-β-Damascenon hatte mit 0,9 µg/kg eine Konzentration knapp unter 1,0 µg/kg.

Tabelle 29: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe im Teepulver der Sorte Grüner Darjeeling (GD-P)

Aromastoff	c(x) <sup>a</sup>	N Q. <sup>b</sup>	N C. <sup>c</sup>	Bereich [µg/kg]
2-Methylpropanal	20	2	1	18-21
3-Methylbutanal	19	2	1	17-20
2-Methylbutanal	14	2	1	13-15
Ethyl-2-methylbutanoat	8,1	3	2	7,1-9,6
Hexanal	300	4	2	280-320
(E)-2-Hexenal	62	3	2	59-66
(Z)-4-Heptenal	17	3	2	17
1-Octen-3-on	1,8	3	2	1,7-1,9
(Z)-3-Hexen-1-ol	58	3	2	56-59
(E)-2-Nonenal	8,2	3	2	7,8-8,7
R/S-Linalool	400	2	1	390-400
(E,Z)-2,6-Nonadienal	7,2	3	2	6,6-8,1
Phenylacetaldehyd	26	3	1	24-29
(E,E)-2,4-Nonadienal	4,2	3	2	3,7-4,5
3-Methyl-2,4-nonandion	24	4	3	23-27
(E,E)-2,4-Decadienal	10	4	2	6-12
(E)-β-Damascenon	0,9	3	2	0,7-1,1
Geraniol	2,4	2	1	2,3-2,5
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	6,1	4	3	4,2-8,7
2-Phenylethanol	41	2	2	39-42
β-Ionon	12	5	2	19-22
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	20	2	1	19-22
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	2,2	2	1	2,1-2,2
Vanillin	390	2	1	370-400

<sup>a</sup> Konzentration des Aromastoffes in µg/kg

<sup>b</sup> Anzahl der durchgeführten Quantifizierungen für den jeweiligen Aromastoff

<sup>c</sup> Anzahl der verwendeten Teechargen (Teepackungen)

### 2.2.3 Vergleich der Ergebnisse von Teegetränk und Teepulver

Es wurde sowohl vom GD-P als auch vom GD-G eine AEVA durchgeführt. Dabei wurden keine wichtigen Aromastoffe identifiziert, die alleinig im Teepulver oder im Teegetränk vorkamen.

Die Aromastoffe 3-Methyl-2,4-nonandion, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal und Vanillin hatten sowohl im Pulver als auch im Getränk hohe FD-Faktoren. Während (Z)-4-Heptenal nur im GD-P eine hohe Bewertung erhielt, so erhielten die Aromastoffe 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon und Phenyllessigsäure nur im GD-G hohe FD-Faktoren.

Demnach war der Unterschied zwischen Teepulver und Teegetränk des GD nur in den Konzentrationen der Aromastoffe zu suchen.

Um die Unterschiede zwischen GD-P und GD-G genauer zu untersuchen wurden die relevanten Aromastoffe durch Stabilisotopenassays (s. 3.6.2) quantifiziert.

Die Aromastoffe liessen sich geordnet nach Konzentrationsunterschied in vier Gruppen einteilen:

Die erste Gruppe, die alle Aromastoffe beinhaltet, die eine sehr starke (15-38 fache) Zunahme im GD-G gegenüber dem Teepulver zeigten, bestand aus 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, 2-Methylbutanal und Geraniol (Tabelle 30). Das 3-Methylbutanal und das (E)- $\beta$ -Damascenon waren unter anderen in der zweiten Gruppe der Aromastoffe, die im GD-G leicht bis stark erhöht (1,5-7 fach) waren. In der Konzentration gleich geblieben waren die Aromastoffe der dritten Gruppen zu der z.B. 3-Methyl-2,4-nonandion, Linalool und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal gehörten. Die letzte Gruppe beinhaltete alle Aromastoffe deren Konzentrationen im Teegetränk abnahmen, dazu zählten unter anderen (E,Z)-2,6-Nonadienal und (E,E)-2,4-Decadienal.

Beim Verhältnis von R- und S-Linalool gab es keinen Unterschied zwischen GD-G und GD-P.

Tabelle 30: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe im Getränk ( $\mu\text{g/l}$ ) und Pulver ( $\mu\text{g}/12\text{g}$ ) aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD)

<b>Aromastoff</b>	<b>GD-P</b>	<b>GD-G</b>	<b>m(G)/m(P)<sup>a</sup></b>
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	0,24	9,1	38
2-Methylbutanal	0,17	4,4	26
Geraniol	0,03	0,43	15
2-Phenylethanol	0,49	3,6	7,3
Phenylacetaldehyd	0,31	1,8	5,8
3-Methylbutanal	0,23	1,2	5,1
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	0,026	0,12	4,6
(Z)-3-Hexenol	0,70	2,0	2,9
(E)- $\beta$ -Damascenon	0,01	0,03	3,0
Vanillin	4,7	10	2,1
(E)-2-Hexenal	0,74	1,2	1,6
(Z)-4-Heptenal	0,20	0,30	1,5
3-Methyl-2,4-nonandion	0,29	0,40	1,4
2-Methylpropanal	0,24	1,2	1,3
R/S-Linalool	4,8	6,1	1,3
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	0,07	0,09	1,3
Hexanal	3,6	3,3	0,9
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,09	0,06	0,7
(E)-2-Nonenal	0,10	0,08	0,8
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,05	0,04	0,8
(E,E)-2,4-Decadienal	0,12	0,07	0,6
$\beta$ -Ionon	0,14	0,07	0,5

<sup>a</sup> Verhältnis der Aromastoffkonzentration im Teegetränk (G) zum Teepulver (P)

## 2.2.4 Diskussion

Der mit Abstand höchste Aromawert im GD-G wurde für 3-Methyl-2,4-nonandion berechnet. Neben diesem Aromastoff hatten noch die Verbindungen (E)- $\beta$ -Damascenon, Linalool und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal einen Einfluss auf das Gesamtaroma des GD-G.

*Guth und Grosch* (1993) führten eine komplette Analyse mit AEVA, Quantifizierung, Schwellenwertbestimmung und Berechnung der Aromawerte eines Grüntees, sowohl am Pulver als auch am Getränk durch.

Beim Vergleich der beiden Untersuchungen von Grünteegetränken zeigten sich auffällige Unterschiede in den quantitativen Daten von (E,Z)-2,6-Nonadienal, (E,E)-2,4-Decadienal und Linalool (Tabelle 31). Gute Übereinstimmung zwischen den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen und denen von *Guth und Grosch* gab es für 3-Methyl-2,4-nonandion, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, (Z)-4-Heptenal, 1-Octen-3-on und (E)- $\beta$ -Damascenon.

Die Aufarbeitungsmethode von *Guth und Grosch* unterschied sich nicht wesentlich zu den hier angewendeten Methoden. Unterschiedlich war allerdings, dass *Guth und Grosch* nur 10g Teepulver pro Liter Wasser für das Teegetränk einsetzten. Die Aromastoffe wurden in beiden Fällen durch Lösungsmittel extrahiert und anschließend durch Vakuumdestillation von den nichtflüchtigen Verbindungen abgetrennt. Die Quantifizierungen erfolgte in beiden Untersuchungen mittels der Isotopenverdünnungsanalyse.

Die unterschiedlichen Aromawerte dieser Aromastoffe lagen darin begründet, dass unterschiedliche Schwellenwerte zur Berechnung der Aromawerte verwendet wurden. *Guth und Grosch* führten außerdem keine Unterscheidung zwischen R- und S-Linalool durch, was bei den hier in der Arbeit erzielten Ergebnissen das Linalool aufwertete. Des weiteren konnten *Guth und Grosch* das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal nicht als wichtigen Aromastoff detektieren. Zusätzlich zu den hier in der Arbeit identifizierten Aromastoffen ermittelten *Guth und Grosch* noch für (Z)-1,5-Octadien-3-on und für (Z)-3-Hexenal Aromawerte über eins.

Tabelle 31: Vergleich der Konzentrationen, der Geruchsschwellenwerte und der Aromawerte wichtiger Aromastoffe im Teegetränk aus der Sorte Grüner Darjeeling (GD-G) mit den Daten von *Guth und Grosch (1993)*

Aromastoff	µg/l		Geruchsschwelle <sup>a</sup>		Aromawert	
	Lit <sup>b</sup>	Erg <sup>c</sup>	Lit <sup>b</sup>	Erg <sup>c</sup>	Lit <sup>b</sup>	Erg <sup>c</sup>
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	9,3	9,1	50	30	<1	<1
3-Methyl-2,4-nonandion	0,56	0,40	0,02	0,01	28	31
(Z)-4-Heptenal	0,63	0,30	0,06	0,06	11	4,7
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,48	0,06	0,02	0,03	24	2,6
1-Octen-3-on	0,03	0,02	0,01	0,04	3	<1
(E,E)-2,4-Decadienal	0,9	0,07	0,05	0,16	18	<1
(E)-β-Damascenon	0,01	0,03	0,001	0,004	10	7,2
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	0,6	0,1	0,08	20	8	<1
2-Phenylethanol	10,5	3,6	45	1000	<1	<1
Linalool	1,0	6,1	1,5	0,55 <sup>d</sup>	<1	6,2

<sup>a</sup> Orthonasale Geruchsschwelle in Wasser in µg/l

<sup>b</sup> Ergebnisse von *Guth und Grosch (1993)*

<sup>c</sup> Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

<sup>d</sup> Geruchsschwelle von R-Linalool

Im GD-P wurden (Z)-4-Heptenal, 3-Methyl-2,4-nonandion, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal und Vanillin als die Aromastoffe mit den höchsten FD-Faktoren identifiziert. Als Aromastoffe mit dem höchsten FD-Faktor wurden von Guth und Grosch (Z)-1,5-Octadien-3-on, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon und 3-Methyl-2,4-nonandion identifiziert (Tabelle 32). Insgesamt weichen die hier in der Arbeit erzielten Ergebnisse von den Daten von Guth und Grosch stark ab. So wurden zwar viele Verbindungen in beiden Teepulvern entdeckt, aber die Gewichtung (FD-Faktoren) war stark unterschiedlich. Während (Z)-1,5-Octadien-3-on und 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5h)-furanon die höchsten FD-Faktoren beim von Guth und Grosch untersuchten Teepulver aufwiesen, so wurden sie zwar im DG-P identifiziert, hatten dort aber vergleichsweise niedrige FD-Faktoren. Andererseits

wurde das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal, das im GD-P den höchsten FD-Faktor besaß von Guth und Grosch nicht detektiert. Auch ein Vergleich der Konzentrationen der Aromastoffe offenbarte große Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungen (Tabelle 32). Nur die Konzentrationen der Aromastoffe Linalool, 3-Methyl-2,4-nonandion und (Z)-4-Heptenal lagen im gleichen Konzentrationsbereich bei den beiden Grünteepulvern. Alle anderen Aromastoffe waren im Grüntee von Guth und Grosch um einen Faktor von 10 ((E,Z)-2,6-Nonadienal, (E)- $\beta$ -Damascenon) bis 25 (2-Phenylethanol) erhöht. Worauf die großen Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungen der Teepulver zurückzuführen waren bleibt unklar. Verantwortlich für die Unterschiede könnte die unterschiedlichen Herkunft sein. Leider ist aus der Veröffentlichung von Guth und Grosch nicht ersichtlich aus welchem Anbaugebiet der untersuchte grüne Tee stammte.

Tabelle 32: Vergleich der erzielten Ergebnisse der Grünteepulveruntersuchungen mit den Literaturdaten von Guth und Grosch (1993)

Aromastoff	$\mu\text{g/kg}$	
	Lit <sup>a</sup>	Erg <sup>b</sup>
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	49	2,2
3-Methyl-2,4-nonandion	83	24
(Z)-4-Heptenal	112	17
(E,Z)-2,6-Nonadienal	61	7,2
1-Octen-3-on	6	1,8
(E,E)-2,4-Decadienal	127	10
(E)- $\beta$ -Damascenon	9	0,9
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	276	20
2-Phenylethanol	1140	41
Linalool	206	400

<sup>a</sup> Literaturergebnisse von Guth und Grosch

<sup>b</sup> In der vorliegenden Arbeit ermittelte Ergebnisse

Der Vergleich von GD-P und GD-G zeigte, dass die Konzentrationen einiger Aromastoffe im Teegetränk bis zu einem Faktor von 40 zunahmen. Auch Guth und Grosch (1993) quantifizierten für 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon eine um den Faktor 3,5 höhere Konzentration im Teegetränk als im Teepulver. Wie schon bei der Diskussion vom schwarzen Tee DGA (s. 2.1.5) besprochen, gibt es bisher keine Anhaltspunkte aus welchen Vorstufen die zusätzlichen Aromastoffe entstanden sind.

## **2.3 Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungen an Darjeeling Gold-Auslese und Grüner Darjeeling**

Bei der Auswahl des zu untersuchenden Grüntees wurde der GD gewählt, um die analysierten Ergebnisse mit dem Schwarztee DGA vergleichen zu können. Beide stammten aus dem selben Teeanbaugebiet und wurden zur gleichen Jahreszeit geerntet.

### **Vergleich der Teegetränke**

An Hand der quantitativen Daten konnten das GD-G und das DGA-G direkt verglichen werden. In Tabelle 33 sind die Konzentrationen der wichtigen Aromastoffe der beiden Teegetränke aufgelistet. Mit einer Ausnahme waren alle untersuchten Aromastoffkonzentrationen im schwarzen Tee höher als im grünen Tee. Nur das 3-Methyl-2,4-nonandion kam sowohl im schwarzen als auch im grünen Tee in ähnlicher Konzentration vor. Der mit Abstand größte Konzentrationsunterschied (Faktor 447) trat bei Geraniol auf. Aber auch 2-Methylpropanal, (E,E)-2,4-Decadienal, 3-Methylbutanal, (Z)-3-Hexen-1-ol und Phenylacetaldehyd waren im DGA-G deutlich höher (Faktor 30-60) vertreten.

Da die quantitativen Daten in direkter Korrelation zu den Aromawerten stehen, sind die Aromawerte, ausgenommen 3-Methyl-2,4-nonandion, für das GD-G viel niedriger als für das DGA-G (Tabelle 33). Die verringerte Konzentration im grünen Tee schlägt sich auch in der Anzahl der Aromastoffe nieder, die einen Aromawert größer oder gleich eins hatten. Während im Schwarztee DGA-G 16 Aromastoffe einen Aromawert größer oder gleich eins hatten, so waren es im GD-G nur die Hälfte.

Tabelle 33: Vergleich der Konzentrationen ( $\mu\text{g/l}$ ) und der Aromawerte (AW) wichtiger Aromastoffe in den Teegetränken aus den Sorten Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G) und Grüner Darjeeling (GD-G)

Aromastoff	c(DGA-G)	c(GD-G)	AW (DGA-G)	(AW GD-G)
R/S-Linalool	142	6,1	140	6
Geraniol	142	0,43	45	<1
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	1,1	0,09	41	4
(E)- $\beta$ -Damascenon	0,15	0,03	38	7
3-Methyl-2,4-nonandion	0,48	0,40	37	31
2-Methylbutanal	82	4,4	37	1
2-Methylpropanal	69	1,2	37	<1
3-Methylbutanal	42	1,2	37	1
(E,Z)-2,6-Nonadienal	0,56	0,06	22	3
(E,E)-2,4-Decadienal	2,9	0,07	18	<1
(Z)-4-Heptenal	0,66	0,30	11	5
Phenylacetaldehyd	57	1,8	9	<1
(Z)-3-Hexen-1-ol	95	2,0	7	<1
$\beta$ -Ionon	1,5	0,07	7	<1
Hexanal	55	3,3	5	<1
(E,E)-2,4-Nonadienal	0,45	0,04	3	<1

### Vergleich der Teepulver

Deutliche Unterschiede in den Teegetränken von Schwarz- und Grüntee wurden gefunden. Um zu analysieren, ob es Unterschiede zwischen den Teepulvern gibt, wurden die Konzentrationen der quantifizierten Aromastoffe der Teepulver verglichen.

Analog waren die Aromastoffkonzentrationen im Schwarzteepulver höher als im Grünteepulver (Tabelle 34). Das reichte von einem Faktor 154 (Geraniol) bis zum 3-Methyl-2,4-nonandion.

Tabelle 34: Vergleich der Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) wichtiger Aromastoffe in den Teegepulvern der Sorten Darjeeling Gold-Auslese (DGA-P) und Grüner Darjeeling (GD-P)

<b>Aromastoff</b>	<b>c (DGA-P)</b>	<b>c (GD-P)</b>
Geraniol	370	2,4
2-Methylbutanal	540	14
(Z)-3-Hexen-1-ol	1600	58
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	160	6,1
Phenylacetaldehyd	650	26
(E,E)-2,4-Nonadienal	87	4,2
3-Methylbutanal	320	19
R/S-Linalool	6600	400
$\beta$ -Ionon	170	12
2-Methylpropanal	250	20
(E)- $\beta$ -Damascenon	9,8	0,9
(E,E)-2,4-Decadienal	73	10
Hexanal	1600	300
(E,Z)-2,6-Nonadienal	38	7,2
(Z)-4-Heptenal	51	17
3-Methyl-2,4-nonandion	62	24

## 2.4 Potente Aromastoffe in den Schwarzteegetränken aus den Sorten Darjeeling Star (DS-G), Golden Palace (GP-G), Admiral`s Cup (AC-G) und Ceylon Best (CB-G)

Nach Ermittlung der für das Aroma von DGA-G und GD-G verantwortlichen Aromastoffen, wurde nun Unterschiede zwischen Schwarzteegetränken aus verschiedenen Anbaugebieten untersucht.

### 2.4.1 Aromaprofile

Begonnen wurde mit der Erstellung der Aromaprofile der ausgewählten Schwarzteegetränke, die im gleichen Verfahren wie beim DGA-G (s. 2.1.1.1) erstellt wurden. Dazu wurde jeweils der frisch aufgebrühte Tee auf 50°C temperiert und einem geschulten Sensorikpanel zur Bewertung vorgelegt. Die teilnehmenden Sensoriker mussten die vorgegebenen Geruchseindrücke nach ihrer Intensität (0=nicht; 1=schwach; 2=deutlich; 3=stark wahrnehmbar) bewerten.

Die Aromaprofile der Schwarzteegetränke (inklusive DGA-G) zeigten alle das gleiche Grobbild (Abb 29-32): Mit hohen Intensitäten wurden die Aromaqualitäten heuartig, rosenartig/nach Honig, citrusartig/fruchtig, grasig/grün und nach Haferflocken/süss bewertet. Nur mittelmässig bis schwach wurden die Aromaqualitäten malzig, karamellartig, fettig/frittiert fischig/tranig bewertet.

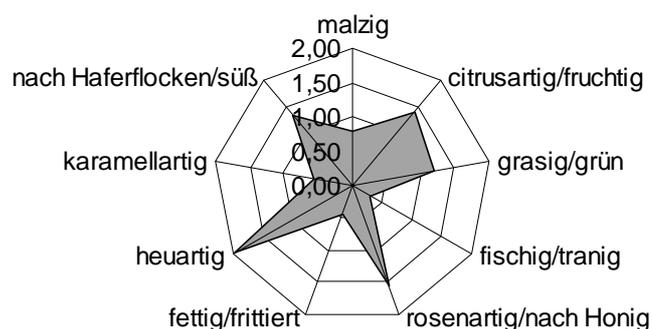


Abbildung 29: Orthonasale Aromaprofil Analyse des Teegetränkes aus der Sorte Darjeeling Star (DS-G)

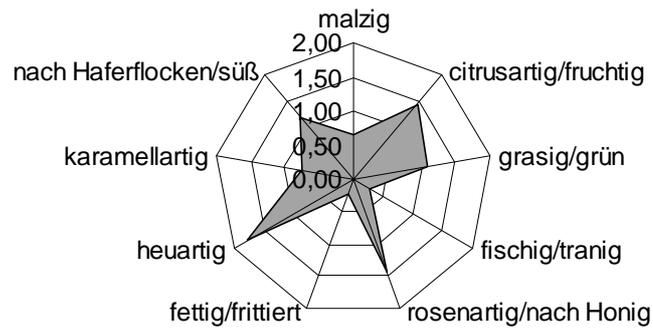


Abbildung 30: Orthonasale Aromaprofil Analyse des Teegetränkes aus der Sorte Golden Palace (GP-G)

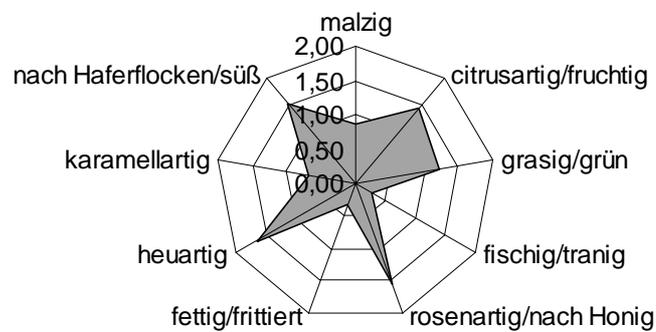


Abbildung 31: Orthonasale Aromaprofil Analyse des Teegetränkes aus der Sorte Admiral's Cup (AC-G)

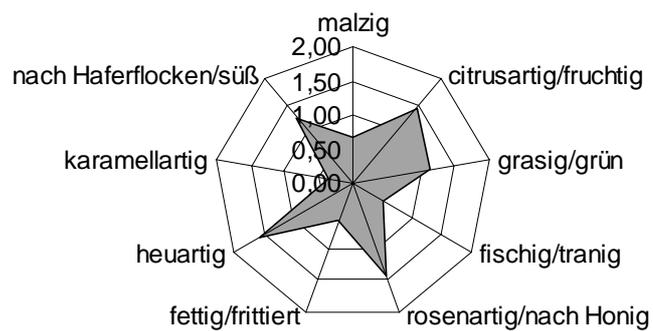


Abbildung 32: Orthonasale Aromaprofil Analyse des Teegetränkes aus der Sorte Ceylon Best (CB-G)

Die erstellten Aromaprofile der Schwarzteegetränke offenbarten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Teegetränken, aber kleinere Unterschiede in den Intensitäten der einzelnen Aromaqualitäten konnten gefunden werden: So hatte das DGA-G im Vergleich zu den anderen Teesorten eine stärkere blumige und citrusartige/fruchtige Aromaqualität. Das DS-G hatte eine besonders ausgeprägte heuartige und fettig/frittierte Aromanote im Gegensatz zu den anderen Teesorten. Beim GP-G waren die Aromaqualitäten fettig/frittiert und malzig im Vergleich schwächer, dagegen hatte es eine ausgeprägtere karamellartige Note. Die stärkste Aromaqualität von nach Haferflocken/süß wurde beim AC-G bestimmt, der ausserdem im Vergleich noch einen starken malzartigen Geruch hatte. Für das CB-G charakteristisch waren eine im Vergleich starke fettig/frittierte Note und ein schwächerer karamellartiger Geruch.

### **2.4.2 Aromaextraktverdünnungsanalysen**

Die Bewertungen der Geruchsqualitäten in den Aromaprofilen der einzelnen Schwarzteegetränke waren nicht sehr unterschiedlich. Um zu analysieren, ob in den einzelnen Teesorten unterschiedliche Aromastoffe vorhanden waren wurden AEVAs der einzelnen Schwarzteegetränke durchgeführt.

Die Aromextraktverdünnungsanalysen der Schwarzteegetränke DS-G, GP-G, AC-G und CB-G wurden analog zur AEVA des DGA-G durchgeführt (s. 2.1.1.2), um die Ergebnisse direkt vergleichen zu können. Dazu wurden jeweils 20g Schwarzteepulver mit 1670ml Wasser aufgebrüht und nach dem Abkühlen mit Lösungsmittel extrahiert. Die AEVAs wurden mit den durch Hochvakuumdestillation erhaltenen Destillaten durchgeführt.

Die Aromastoffe mit hohen FD-Faktoren ( $\geq 64$ ) in den Schwarzteegetränken (inklusive DGA-G) wurden als Linalool (19), 3-Methyl-2,4-nonandion (27), (E)- $\beta$ -Damascenon (31), Geraniol (33), (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal (35), 2-Phenylethanol (36),  $\beta$ -Ionon (37), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (41), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (45) und Vanillin (47) identifiziert (Tabelle 35). Speziell bei den Aromastoffen Linalool, Geraniol,  $\beta$ -Ionon und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon gab es signifikante Unterschiede in den ermittelten FD-Faktoren der Schwarzteegetränke. So wurden für die genannten Aromastoffe beim DGA-G, DS-G und GP-G viel höhere FD-Faktoren ermittelt als beim AC-G und CB-G.

Tabelle 35: Wichtige Aromastoffe (FD $\geq$ 4) in den Schwarzteegetränken aus den Sorten Darjeeling Gold Star (DS-G), Golden Palace (GP-G), Admiral's Cup (AC-G) und Ceylon Best (CB-G)

Nr. <sup>a</sup>	Aromastoff <sup>b</sup>	Aromaqualität <sup>c</sup>	RI-Wert <sup>d</sup>	FD			
				FFAP	DS	GP	AC
10	(Z)-4-Heptenal	fischig, tranig	1240	4	16	2	4
13	(Z)-1,5-Octadien-3-on	nach Geranie	1373	0	0	2	2
16	(E,E)-2,4-Heptadienal	fettig	1489	8	16	8	8
18	(E)-2-Nonenal	fettig, grün	1527	32	8	8	16
19	R/S-Linalool	citrusartig	1541	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>16</b>	<b>32</b>
21	(E,Z)-2,6-Nonadienal	nach Gurke	1583	4	8	2	4
24	Phenylacetaldehyd	nach Honig	1642	16	16	32	16
25	3-Methylbutansäure	schweissig	1663	4	2	2	4
26	(E,E)-2,4-Nonadienal	fettig, grün	1695	8	16	8	16
27	3-Methyl-2,4-nonandion	heuartig	1719	32	64	64	32
30	(E,E)-2,4-Decadienal	fettig, frittiert	1804	32	16	8	16
31	(E)- $\beta$ -Damascenon	fruchtig	1815	64	32	16	64
32	Hexansäure	schweissig	1840	4	4	1	4
33	Geraniol	rosenartig	1850	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>8</b>
34	2-Methoxyphenol	rauchig, süßlich	1859	4	2	8	4
35	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	nach Haferflocken	1877	128	256	128	128
36	2-Phenylethanol	nach Honig	1910	64	64	32	64
37	$\beta$ -Ionon	nach Veilchen	1948	<b>256</b>	<b>64</b>	<b>8</b>	<b>32</b>
40	4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	metallisch	2006	16	16	8	8
41	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	karamellartig	2025	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>8</b>	<b>128</b>
43	3-Ethylphenol	phenolisch	2205	2	4	1	8
45	3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	nach Liebstöckel	2220	64	16	16	32
46	Phenylelessigsäure	nach Honig	2582	16	32	16	32
47	Vanillin	nach Vanille, süß	2605	128	128	128	128

- <sup>a</sup> Die Nummerierung erfolgte entsprechend der Elutionsreihenfolge auf der FFAP-Säule
- <sup>b</sup> Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen aufgrund folgender Kriterien :  
Vergleich der RI-Werte auf den angegebenen Säulen; Vergleich der Geruchsschwelle und Geruchsqualität am Sniffing-Port; Vergleich der Massenspektren im EI- Und CI-Modus
- <sup>c</sup> Geruchsqualität des Aromastoffes am Sniffing-Port
- <sup>d</sup> Linearer Retentionsindex

Jeder Aromastoff in den Schwarzteegetränken mit einem FD-Faktor größer oder gleich vier wurde in allen untersuchten Schwarzgetränken gefunden. Gleichzeitig wurde kein zusätzlicher Aromastoff detektiert, der nicht bereits im DGA-G identifiziert wurde (s. 2.1.1.2).

Auch für diese Schwarzteegetränke wurde analog zum DGA-G das Verhältnis von R- und S-Linalool bestimmt. Während im DS-G ein Verhältnis von R zu S gleich 40 zu 60 vorlag, so lag das R/S-Verhältnis in allen anderen Schwarzteegetränken inklusive dem DGA-G bei etwa 55 zu 45 (Tabelle 36).

Bisher wurde das R/S-Verhältnis von Linalool im Schwarztee erst einmal von *Wang et al.* (1994) bestimmt. Nach Wasserdampfdestillation unter reduziertem Druck um einer Isomerisierung von Linalool vorzubeugen, wurde das Verhältnis von R/S-Linalool mit Hilfe einer Cyclodextrinsäule über GC/FID bestimmt. Es wurden zwei Schwarztees aus Ceylon untersucht und die R/S-Linalool Verhältnisse wurden als 60/40 und 53/47 bestimmt. Diese Ergebnisse stimmten mit dem hier in der Arbeit bestimmten R/S-Verhältnisses des CB (58/42) sehr gut überein (Tabelle 36).

Tabelle 36: Vergleich der Enantiomerenverteilung von R- und S-Linalool in den Schwarzteegetränken mit bisher bekannten Literaturdaten

	<b>DGA-G</b>	<b>DS-G</b>	<b>GP-G</b>	<b>AC-G</b>	<b>CB-G</b>	<b>Lit1<sup>a</sup></b>	<b>Lit2<sup>a</sup></b>
R-/S-Linalool	54/46	40/60	55/45	52/48	58/42	60/40	53/47

<sup>a</sup> Lit=Literaturdaten von *Wang et al.* (1994)

### 2.4.3 Quantifizierung der relevanten Aromastoffe

Demnach waren die Aromaunterschiede der einzelnen Teegetränke (einschließlich des DGA-G) ausschließlich in den unterschiedlichen Aromastoffkonzentrationen zu suchen.

Die bei den AEVAs identifizierten wichtigen Aromastoffe der Schwarzteegetränke wurden durch Isotopenassays quantifiziert. Dabei wurden die selben markierten Verbindungen benutzt, die schon bei der Quantifizierung der Aromastoffe des DGA-G zum Einsatz kamen (2.1.1.4). Auch die Aufarbeitung unterschied sich nicht zu der beim DGA-G angewandten Vorgehensweise.

Die Konzentrationen der quantifizierten Aromastoffe der Schwarzteegetränke sind in Tabelle 37 (DS-G und GP-G) und in Tabelle 38 (AC-G und CB-G) aufgelistet. Die Daten des DGA-G wurden bereits in 2.1.1.4 besprochen (Tabelle 14).

Der Großteil der quantifizierten Aromastoffe zeigten ähnliche Konzentrationen in den Schwarzteegetränken. Auffällige Unterschiede gab es lediglich in den Konzentrationen von Linalool, Geraniol und (E)- $\beta$ -Damascenon. Während hohe Konzentrationen für Linalool und Geraniol in den beiden Darjeelingtees (DGA-G und DS-G) gemessen wurden, so waren die Konzentrationen für (E)- $\beta$ -Damascenon im AC-G und CB-G signifikant höher. Das GP-G nahm eine Mittelstellung zwischen diesen beiden Gruppen ein und hatte sowohl für Linalool und Geraniol, als auch für (E)- $\beta$ -Damascenon eine mittlere Konzentration.

*Takeo (1983)* analysierte die Konzentrationen von Linalool und Geraniol in Schwarzteegetränken aus Ceylon, Indien (sowohl Darjeeling, als auch Assam), China und Japan. Leider wurden die Ergebnisse für Linalool nicht separat angegeben, sondern als Summe von Linalool und Linalooloxiden. Dadurch war ein Vergleich von Linalool zwischen den einzelnen Teesorten unmöglich. Für Geraniol wurden hohe Gehalte in den Schwarztees aus Japan, China und Darjeeling gemessen, während die Schwarztees aus Ceylon und dem Assamanbaugebiet weniger Geraniol aufwiesen.

Takeo korrelierte die Schwankungen der Linalool- und Geraniolkonzentrationen zu der verwendeten Züchtungsform. Teepflanzen, die hauptsächlich aus der Varietät *assamica* gezüchtet waren, hatten durchgehend weniger Geraniol als Züchtungen der Varietät *sinensis*. Da die Varietät *sinensis* die resistenterere und frostvertragende Form ist, wird sie in den höher gelegenen Teeregionen, wie Darjeeling und Nepal verwendet. Diese Korrelation stimmt mit den hier erzielten Ergebnissen überein.

Tabelle 37: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe in den Teegetränken aus den Sorten Darjeeling Star (DS-G) und Golden Palace (GP-G)

Aromastoff	DS-G			GP-G		
	µg/l	N <sup>a</sup>	Bereich [µg/l]	µg/l	N <sup>a</sup>	Bereich [µg/l]
2-Methylpropanal	<b>23</b>	3/1	22-24	<b>42</b>	3/2	38-48
3-Methylbutanal	<b>18</b>	3/1	18	<b>31</b>	2/1	29-32
2-Methylbutanal	<b>24</b>	3/1	24	<b>51</b>	2/1	50-53
Ethyl-2-methylbutanoat	<b>0,04</b>	2/1	0,03-0,04	<b>0,03</b>	2/1	0,03-0,04
Hexanal	<b>47</b>	3/1	46-49	<b>41</b>	3/1	41
(Z)-3-Hexenal			<b>n.b.<sup>b</sup></b>	<b>0,08</b>	2/1	0,08-0,09
(E)-2-Hexenal	<b>70</b>	3/1	70-72	<b>64</b>	4/2	62-65
(Z)-4-Heptenal	<b>0,69</b>	2/1	0,68-0,70	<b>1,4</b>	3/2	1,3-1,6
(Z)-3-Hexen-1-ol	<b>59</b>	3/1	57-60	<b>86</b>	2/1	86
(E)-2-Nonenal	<b>0,37</b>	2/1	0,36-0,38	<b>0,36</b>	2/1	0,34-0,37
R/S-Linalool	<b>146</b>	4/2	124-173	<b>107</b>	2/1	106-109
(E,Z)-2,6-Nonadienal	<b>0,18</b>	2/1	0,17-0,20	<b>0,23</b>	2/1	0,22-0,25
Phenylacetaldehyd	<b>18</b>	2/1	18	<b>38</b>	2/1	37-38
(E,E)-2,4-Nonadienal	<b>0,33</b>	2/1	0,31-0,36	<b>0,66</b>	3/2	0,47-0,84
3-Methyl-2,4-nonandion	<b>0,52</b>	2/1	0,49-0,54	<b>0,83</b>	2/1	0,82-0,83
(E,E)-2,4-Decadienal	<b>2,7</b>	2/2	2,7	<b>2,5</b>	2/1	2,5
(E)-β-Damascenon	<b>0,10</b>	2/1	0,10-0,11	<b>0,31</b>	2/1	0,30-0,32
Geraniol	<b>117</b>	2/1	114-120	<b>39</b>	2/1	37-41
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	<b>0,29</b>	3/2	0,28-0,29	<b>0,53</b>	4/2	0,46-0,65
β-Ionon	<b>3,0</b>	2/1	2,9-3,0	<b>2,7</b>	2/1	2,6-2,8
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	<b>15</b>	2/1	14,4-15,6	<b>15</b>	2/1	15
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	<b>0,12</b>	2/1	0,07-0,18	<b>0,13</b>	2/1	0,12-0,14

<sup>a</sup> Anzahl der durchgeführten Quantifizierungen für den jeweiligen Aromastoff / Anzahl der verwendeten Teechargen (Teepackungen)

<sup>b</sup> n.b.= nicht bestimmt

Tabelle 38: Konzentrationen wichtiger Aromastoffe in den Teegetränken aus den Sorten Admiral's Cup (AC-G) und Ceylon Best (CB-G)

Aromastoff	AC-G			CB-G		
	µg/l	N <sup>a</sup>	Bereich [µg/l]	µg/l	N <sup>a</sup>	Bereich [µg/l]
2-Methylpropanal	<b>58</b>	3/1	55-60	<b>41</b>	3/1	40-44
3-Methylbutanal	<b>43</b>	3/1	41-46	<b>29</b>	3/1	28-30
2-Methylbutanal	<b>82</b>	3/1	77-90	<b>55</b>	3/1	54-55
Ethyl-2-methylbutanoat	<b>0,05</b>	2/1	0,04-0,05			<b>n.b.<sup>b</sup></b>
Hexanal	<b>36</b>	3/1	35-37	<b>46</b>	3/1	44-49
(E)-2-Hexenal	<b>77</b>	3/1	73-79	<b>57</b>	3/1	55-60
(Z)-4-Heptenal	<b>0,40</b>	2/1	0,38-0,42	<b>0,78</b>	2/1	0,73-0,85
(Z)-3-Hexen-1-ol	<b>51</b>	3/1	50-52	<b>73</b>	3/1	72-73
(E)-2-Nonenal	<b>0,36</b>	2/2	0,34-0,38	<b>0,38</b>	2/1	0,37-0,38
R/S-Linalool	<b>44</b>	2/1	43-46	<b>43</b>	2/1	42-43
(E,Z)-2,6-Nonadienal	<b>0,18</b>	2/1	0,12-0,24	<b>0,18</b>	2/1	0,18
Phenylacetaldehyd	<b>79</b>	2/1	78-79	<b>48</b>	2/1	48
(E,E)-2,4-Nonadienal	<b>0,24</b>	2/1	0,22-0,26	<b>0,61</b>	2/1	0,60-0,64
3-Methyl-2,4-nonandion	<b>0,43</b>	2/1	0,40-0,47	<b>0,60</b>	2/1	0,60-0,61
(E,E)-2,4-Decadienal	<b>1,6</b>	2/1	1,4-1,7	<b>5,3</b>	2/1	5,2-5,4
(E)-β-Damascenon	<b>0,54</b>	2/1	0,50-0,56	<b>0,42</b>	2/2	0,38-0,50
Geraniol	<b>2,2</b>	2/1	2,2	<b>5,1</b>	2/1	5,0-5,2
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	<b>0,51</b>	3/2	0,48-0,54	<b>0,73</b>	2/1	0,68-0,79
β-Ionon	<b>3,9</b>	2/1	3,8-4,1	<b>3,3</b>	4/2	2,8-3,8
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	<b>5,3</b>	2/1	5,3-5,4	<b>15</b>	3/2	15
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	<b>0,21</b>	2/1	0,20-0,22	<b>0,18</b>	2/1	0,17-0,19

<sup>a</sup> Anzahl der durchgeführten Quantifizierungen für den jeweiligen Aromastoff / Anzahl der verwendeten Teechargen (Teepackungen)

<sup>b</sup> n.b.= nicht bestimmt

#### 2.4.4 Ermittlung der Aromawerte

Analog zum DGA-G wurden für die quantifizierten Verbindungen der Schwarzteegetränke die Aromawerte berechnet. Dafür wurden die selben Schwellenwerte herangezogen, die auch für die Berechnung der Aromawerte des DGA-G benutzt wurden (s. 2.1.1.5).

Aromastoffe mit hohen Aromawerten in den Schwarzteegetränken (inklusive DGA-G) waren Linalool, Geraniol, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal, (E)- $\beta$ -Damascenon, 3-Methyl-2,4-nonandion, 2- und 3-Methylbutanal, 2-Methylpropanal und (E,E)-2,4-Decadienal (Tabelle 39).

Wie schon bei den Quantifizierungsdaten besprochen lagen die größten Unterschiede zwischen den Schwarzteegetränken in den Aromastoffen Linalool, Geraniol und (E)- $\beta$ -Damascenon. Allerdings wurde durch Betrachten der Aromawerte die Bedeutung dieser Aromastoffe deutlich. So waren Linalool und Geraniol im DGA-G, DS-G und GP-G die Aromastoffe mit den höchsten Aromawerten, während im AC-G und CB-G dies (E)- $\beta$ -Damascenon war.

Die auffälligen Konzentrationsunterschiede in Linalool, Geraniol und (E)- $\beta$ -Damascenon beim DGA-G, DS-G und GP-G im Vergleich zum AC-G und CB-G spiegelten sich aber nicht in den Aromaprofilen wieder (s. 2.1.1.1 und 2.4.1). So waren die Intensitäten der blumigen und fruchtigen Aromaqualitäten für alle Schwarzteegetränke nicht signifikant unterschiedlich. Die Konzentrationsunterschiede resultierten demnach in einer Veränderung des Gesamtaromaprofiles der Schwarzteegetränke.

Tabelle 39: Aromawerte (AW) wichtiger Aromastoffe in den Schwarzteegetränken aus den Sorten Darjeeling Gold-Auslese (DGA-G), Darjeeling Star (DS-G), Golden Palace (GP-G), Admiral's Cup (AC-G) und Ceylon Best (CB-G)

Aromastoff	AW				
	DGA-G	DS-G	GP-G	AC-G	CB-G
R/S-Linalool	140	107	106	42	45
Geraniol	45	37	12	0,7	2
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	41	11	20	20	28
(E)- $\beta$ -Damascenon	38	26	77	134	104
3-Methyl-2,4-nonandion	37	40	64	33	46
3-Methylbutanal	37	16	27	37	25
2-Methylbutanal	37	16	27	37	25
2-Methylpropanal	37	12	23	32	22
(E,Z)-2,6-Nonadienal	22	7	9	7	7
(E,E)-2,4-Decadienal	18	17	16	10	34
(Z)-4-Heptenal	11	6	22	6	12
Phenylacetaldehyd	9	3	6	13	8
$\beta$ -Ionon	7	15	13	20	17
(Z)-3-Hexen-1-ol	7	4	7	4	6
Hexanal	5	5	4	4	5
(E,E)-2,4-Nonadienal	3	2	4	2	4
(E)-2-Nonenal	<1	<1	<1	<1	<1
Ethyl-2-methylbutanoat	<1	<1	<1	<1	n.b. <sup>a</sup>
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	<1	<1	<1	<1	<1
(E)-2-Hexenal	<1	<1	<1	<1	<1
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	<1	<1	<1	<1	<1

<sup>a</sup> n.b.=nicht bestimmt

Mit dem DGA-G und dem DS-G wurden zwei Schwarzteegetränke aus dem gleichen Anbaugebiet untersucht. Lediglich die Anbaujahreszeit unterschied diese beiden Tees. Während der DGA ein Schwarztee aus der Sommerpflückung war, so wurde der DS im Frühling geerntet.

Die zwei Aromaprofile der beiden Schwarzteegetränke (Abbildung 4 und Abbildung 29) unterschieden sich nicht wesentlich. Lediglich die Aromaqualitäten citrusartig/fruchtig und rosenartig/honig wurden im DGA-G etwas höher bewertet.

Für die Aromastoffe wurden bis auf eine Ausnahme im DGA-G durchgehend höhere Konzentrationen gemessen. Lediglich  $\beta$ -Ionon hatte im DS-G eine höhere Konzentration als im DGA-G. Diese Konzentrationsunterschiede, vor allem bei Linalool und Geraniol schienen verantwortlich für die höheren Bewertungen der Aromaqualitäten citrusartig/fruchtig und rosenartig/honig im DGA-G zu sein.

Die geringeren Konzentrationen im DS-G beruhen wahrscheinlich auf den unterschiedlichen äußeren Bedingungen (wie Temperatur und Niederschlag).

## 2.4.5 Aromasimulationen

Analog zum DGA-G (s. 2.1.1.6) wurden entsprechend der Konzentrationen der Aromastoffe Modelltees mit der Matrix Wasser erstellt und bewertet (s. 3.5.4).

Im Folgenden werden die Aromasimulationen mit ihren jeweiligen Originaltees verglichen:

Beim Vergleich des Rekombinates des DS-G mit dem Originaltee war nur ein Unterschied bei den Aromaeindrücken citrusartig/fruchtig und heuartig festzustellen (Abbildung 33). Während das Rekombinat eine erhöhte citrusartige, fruchtige Note hatte, so hatte der Originaltee einen intensiveren heuartigen Aromaeindruck. Die anderen untersuchten Aromaqualitäten zeigten eine gute bis teilweise sehr gute Übereinstimmung der Aromasimulation mit dem Originaltee DS. Die Gesamtübereinstimmung des Rekombinates gegenüber dem Originalteegetränk wurde mit 2,3 bewertet.

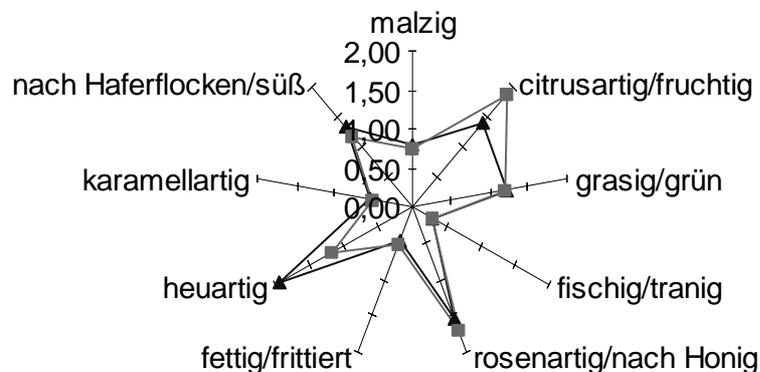


Abbildung 33: Vergleich der Aromaprofile des Rekombinates (■) und des Originalteegetränks (▲) aus der Sorte Darjeeling Star (DS-G)

Die Aromasimulation des GP-G zeigte einen verminderten heuartigen Geruch und einen leicht verstärkte citrusartige, fruchtige Note (Abbildung 34). Alle anderen Aromaeindrücke wurden im Rekombinat und in der Aromasimulation identisch bewertet. Das Sensorikpanel vergab als Ausdruck der sehr guten Übereinstimmung der beiden Proben die Note 2,7.

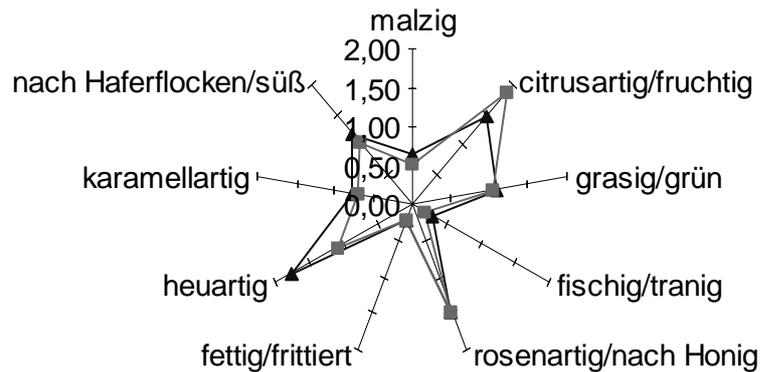


Abbildung 34: Vergleich der Aromaprofile des Rekombinates (■) und des Originalteegetränks (▲) aus der Sorte Golden Palace (GP-G)

Verminderte Intensitäten in der Aromasimulation im Vergleich zum Originaltee des AC-G wurden für die Aromaeindrücke heuartig und malzig erkannt (Abbildung 35). Im Gegensatz dazu wurden die Aromaqualitäten citrusartig/fruchtig und rosenartig/nach Honig im Teegetränk höher bewertet. Die restlichen Aromaeindrücke zeigten eine gute bis sehr gute Übereinstimmung der Intensitäten der beiden Proben. Die Übereinstimmung der Aromasimulation zum Originaltee wurde mit 2,4 bewertet.

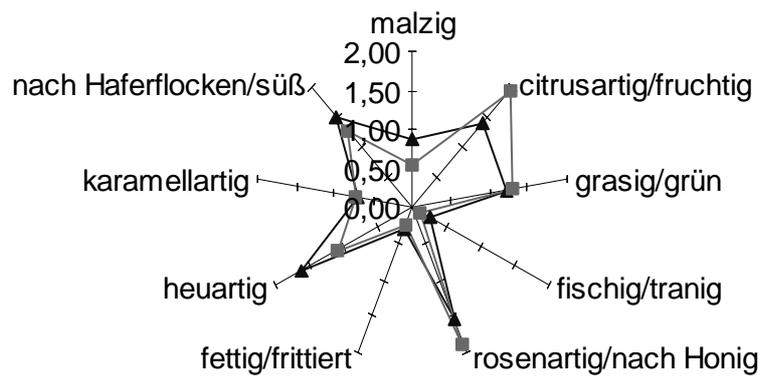


Abbildung 35: Vergleich der Aromaprofile des Rekombinates (■) und des Originalteegetränks (▲) aus der Sorte Admiral's Cup (AC-G)

Die größten Unterschiede zwischen Aromasimulation und Originaltee beim CB-G waren eine verstärkte citrusartige, fruchtige und eine verminderte heuartige Note (Abbildung 36). Zusätzlich gab es noch kleine Unterschiede in den Aromaqualitäten fischig/tranig und nach Haferflocken/süß, die in der Aromasimulation etwas verringert waren. Die Gesamtübereinstimmung des Rekombinates gegenüber den Originalteegetränk wurde mit 2,5 bewertet.

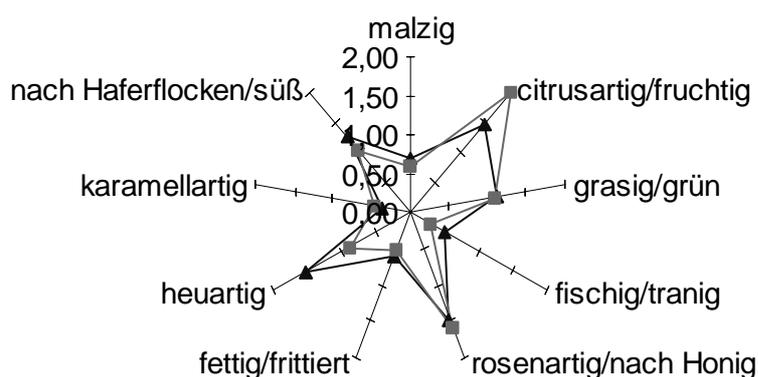


Abbildung 36: Vergleich der Aromaprofile des Rekombinates (■) und des Originalteegetränks (▲) aus der Sorte Ceylon Best (CB-G)

## 2.5 Potente Aromastoffe in Haferflocken

Das 2,4,6-Nonatrienal wurde bisher nicht in Haferflocken identifiziert, obwohl die Aromaqualität der 2,4,6-Nonatrienalisomere sehr stark an Haferflocken erinnert.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das Aroma von Haferflocken mittels AEVA untersucht, um den Beitrag der Isomere von 2,4,6-Nonatrienal zum Haferflockenaroma zu untersuchen.

50 g Haferflocken wurden erschöpfend mit Diethylether extrahiert und anschließend die nichtflüchtigen Bestandteile durch Hochvakuumtransfer abgetrennt (s. 3.4). Nach Einengen wurde eine AEVA (s. 3.5.1) durchgeführt.

Die Aromastoffe wurden durch Vergleich der Aromaqualität und der Retentionsindizes auf drei verschiedenen Säulen mit den Referenzsubstanzen identifiziert.

Den mit Abstand höchsten FD-Faktor von 1024 hatte das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal gefolgt vom (E)- $\beta$ -Damascenon mit einem FD-Faktor von 16 (Tabelle 40).

Tabelle 40: Wichtige Aromastoffe (FD $\geq$ 4) im Extrakt aus Haferflocken

Aromastoff <sup>a</sup>	Aromaqualität <sup>b</sup>	RI-Wert (FFAP) <sup>c</sup>	FD <sup>d</sup>
(Z)-3-Hexenal	grün	1148	8
1-Octen-3-on	pilzartig	1298	4
Essigsäure	essigsauer	1430	8
Buttersäure	schweissig	1625	8
3-Methylbuttersäure	schweissig	1663	4
(E)- $\beta$ -Damascenon	fruchtig	1815	16
(E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal	nach Haferflocken, süß	1869	8
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	nach Haferflocken, süß	1877	1024
Vanillin	nach Vanille	2605	4

<sup>a</sup> Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen aufgrund folgender Kriterien: Vergleich der RI-Werte auf den Säulen FFAP, DB-5 und OV-1701; Vergleich der Geruchsschwellen und der Geruchsqualität am Sniffing-Port

<sup>b</sup> Geruchsqualität am Sniffing-Port

<sup>c</sup> Linearer Retentionsindex

<sup>d</sup> Flavour Dilution Faktor

Zusätzlich zum (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal wurde das (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal und auch das (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal mittels TDHRGC/MS (s. 3.7.2) in Haferflocken identifiziert.

Nach den Ergebnissen der AEVA hat das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal einen dominierenden Einfluss auf das Aroma von Haferflocken.

Bisher war 2,4,6-Nonatrienal nicht in Haferflocken bekannt. In einer von *Guth und Grosch* (1993) durchgeführten AEVA von extrudiertem Hafermehl wurde das 2,4,6-Nonatrienal im Untersuchungsmaterial nicht detektiert. Allerdings beschrieben die Forscher eine Veränderung des Aromas vom Hafermehl (schwach süßlich, nussartig) zum Extrudat (frittiert, fettig), so dass ein Verlust des 2,4,6-Nonatrienals während des Extrudierens möglich war.

Die zwei Isomere (E,E,E)- und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal wurden mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse (s. 3.6.2) in Haferflocken quantifiziert. Dafür wurden für jede Bestimmung 200 g Haferflocken nach 3.4 aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 41 zusammengestellt.

Tabelle 41: Konzentration von (E,E,E)- und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal in Haferflocken und im Teepulver aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese (DGA-P)

	<b>Haferflocken<sup>a</sup></b>	<b>DGA-P<sup>b</sup></b>
(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal	28	264
(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal	13	164

<sup>a</sup> Gehalt von 2,4,6-Nonatrienal in Haferflocken in µg/kg

<sup>b</sup> Gehalt von 2,4,6-Nonatrienal im Teepulver Darjeeling Gold-Auslese in µg/kg

Im Vergleich zum Schwarzteepulver war in den Haferflocken nur etwa ein Zehntel des (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienals enthalten. Aber durch das Fehlen anderer geruchsintensiver Aromastoffe ist der Einfluss des (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienals auf das Haferflockenaroma viel größer, als der Einfluss des Isomers im schwarzen Tee.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Untersuchungsmaterial

Alle Teepakete wurden sofort nach dem Erwerb in Folie eingeschweißt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert.

#### Schwarztee

Sorte: Darjeeling Gold-Auslese  
Erntejahr: 2000  
Anbaugebiet: Darjeeling, Indien  
Erntejahreszeit: Sommer  
Blattgrad: TGFOP  
Bezugsquelle: Tee Handelskontor, Bremen  
Packungsgröße: 250 g

Sorte: Darjeeling Gold Star  
Erntejahr: 2001  
Anbaugebiet: Darjeeling, Indien  
Erntejahreszeit: Frühling  
Blattgrad: FTGFOP  
Bezugsquelle: Tee Handelskontor, Bremen  
Packungsgröße: 250 g

Sorte: Golden Palace  
Erntejahr: 2001  
Anbaugebiet: Nepal  
Erntejahreszeit: Sommer  
Blattgrad: TGFOP  
Bezugsquelle: Tee Handelskontor, Bremen  
Packungsgröße: 100 g

Sorte: Admiral`s Cup  
Erntejahr: 2001  
Anbaugebiet: Assam, Indien  
Erntejahreszeit: Sommer  
Blattgrad: GFBOP  
Bezugsquelle: Tee Handelskontor, Bremen  
Packungsgröße: 250 g

Sorte: Ceylon Best  
Erntejahr: 2001  
Anbaugebiet: Sri Lanka  
Erntejahreszeit: ganzjährig  
Blattgrad: OP  
Bezugsquelle: Tee Handelskontor, Bremen  
Packungsgröße: 250 g

### **Grüntee**

Sorte: Grüner Darjeeling  
Erntejahr: 2002  
Anbaugebiet: Darjeeling, Indien  
Erntejahreszeit: Sommer  
Blattgrad: TGFOP1  
Bezugsquelle: Tee Handelskontor, Bremen  
Packungsgröße: 100 g

### **Haferflocken**

Sorte: Blütenzarte Haferflocken  
Hersteller: Köln, Elmshorn  
Bezugsquelle: Lokaler Supermarkt  
Packungsgröße: 500 g

## 3.2 Chemikalien

### Referenzaromastoffe

Bis-((2-methyl)-3-furyl)-disulfid, Acros Organics, Geel, Belgien

2,3-Butandion, Aldrich, Steinheim

Buttersäure, Fluka, Neu-Ulm

(E)- $\beta$ -Damascenon, Haarmann & Reimer, Holzminden

(E,E)-2,4-Decadienal, Aldrich, Steinheim

(E)-2-Decenal, Lancaster, Mühlheim

tr-Epoxy-(E)-2-decenal, (*Schieberle und Grosch, 1991*)

(S)-Ethyl-2-methylbutanoat, Aldrich, Steinheim

3-Ethylphenol, Aldrich, Steinheim

Geraniol, Roth, Karlsruhe

(E,E)-2,4-Heptadienal, Aldrich, Steinheim

(Z)-4-Heptenal, Haarmann & Reimer, Holzminden

Hexanal, Aldrich, Steinheim

Hexansäure, Fluka, Neu-Ulm

(E)-2-Hexenal, Aldrich, Steinheim

(Z)-3-Hexenal, (*Fielder und Rowan, 1995*)

(Z)-3-Hexen-1-ol, Aldrich, Steinheim

3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon, Aldrich Steinheim

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, Aldrich Steinheim

$\beta$ -Ionon, Roth, Karlsruhe

R-Linalool, Aldrich, Steinheim

R/S-Linalool, Fluka, Neu-Ulm

Methional, Aldrich, Steinheim

2-Methoxyphenol, Merck, Darmstadt

2-Methylbutanal, Aldrich, Steinheim

3-Methylbutanal, Aldrich, Steinheim

3-Methylbuttersäure, Aldrich, Steinheim

3-Methylbutylacetat, Aldrich, Steinheim

Methyloctanoat, Aldrich, Steinheim

2-Methylpropanal, Aldrich, Steinheim

(E,E)-2,4-Nonadienal, Aldrich, Steinheim  
(E,Z)-2,6-Nonadienal, Aldrich, Steinheim  
(E,Z)-2,6-Nonadienol, Aldrich Steinheim  
 $\gamma$ -Nonalacton, Aldrich, Steinheim  
(E)-2-Nonenal, Aldrich, Steinheim  
(Z)-1,5-Octadien-3-on, (*Ullrich und Grosch, 1988*)  
(E,E)-2,4-Octadienal, Aldrich, Steinheim  
 $\delta$ -Octalacton, Aldrich, Steinheim  
Octanal, Aldrich, Steinheim  
1-Octen-3-on, Lancaster, Mühlheim  
Pentansäure, Fluka, Neu-Ulm  
Phenol, Aldrich, Steinheim  
Phenylacetaldehyd, Aldrich, Steinheim  
Phenyllessigsäure, Aldrich, Steinheim  
2-Phenylethanol, Fluka, Neu-Ulm  
Vanillin, Aldrich, Steinheim

### Isotopenmarkierte Aromastoffe

[<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]- (E)- $\beta$ -Damascenon, (*Sen et al, 1991*)  
[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- (E,E)-2,4-Decadienal, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-tr-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Ethyl-2-methylbutanoat, (*Guth und Grosch, 1993c*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- (Z)-4-Heptenal, (*Widder und Grosch, 1994*)  
[<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexanal, (*Guth und Grosch, 1993d*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexansäure, (*Jagella und Grosch, 1999*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- (E)-2-Hexenal, (*Guth und Grosch, 1993c*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- (Z)-3-Hexenal, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- (Z)-3-Hexenol, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon, (*Blank et al., 1993*)  
[<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, (*Sen et al, 1991*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Linalool (*Fritsch, 2001*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-3-Methylbutanal, (*Schieberle und Grosch, 1992*)

[<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-2-Methylpropanal, (*Milo und Grosch, 1995*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E,E*)-2,4-Nonadienal, (*Guth und Grosch, 1993d*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E,Z*)-2,6-Nonadienal, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*E*)-2-Nonenal, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-(*Z*)-1,5-Octadien-3-on, (*Guth und Grosch, 1990a*)  
[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Octen-3-on, (*Guth und Grosch, 1990b*)  
[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Phenol, Aldrich, Steinheim  
[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Vanillin, (*Semmelroch et al, 1995*)

### Sonstige Chemikalien

Acetaldehyd, Merck, Darmstadt  
<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Acetaldehyd, Aldrich, Steinheim  
Butyllithium, Fluka, Neu-Ulm  
Dess-Martin periodinane, Lancaster, Pelham  
Dichlormethan, Merck, Darmstadt  
Diethylether, Merck, Darmstadt  
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat, Merck, Darmstadt  
Essigsäure, Merck, Darmstadt  
Ethanol, Merck, Darmstadt  
(*E,E*)-2,4-Heptadienal, Aldrich, Steinheim  
n-Hexan, Merck, Darmstadt  
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt  
Kaliumhydroxid, Merck, Darmstadt  
Kaliumtertiärbutilat, Fluka, Neu-Ulm  
Kieselgel 60 für Säulenchromatographie, Merck, Darmstadt  
Linolensäure, Fluka, Neu-Ulm  
Lithiumaluminiumhydrid, Aldrich, Steinheim  
Methyliodid, Aldrich, Steinheim  
<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-Methyliodid, Aldrich, Steinheim  
Methyl-4-(triphenylphosphonium)crotonate bromide, Lancaster, Eastgate  
Methanol, Merck, Darmstadt  
Natrium, Merck, Darmstadt  
Natriumcarbonat, Merck, Darmstadt

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt  
Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt  
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt  
Natriumsulfat, Merck, Darmstadt  
2,4-Nonandion, Lancaster, Mühlheim  
Pentan, Merck, Darmstadt  
(E)-2-Pentenal, Aldrich, Steinheim  
(Z)-2-Penten-1-ol, Aldrich, Steinheim  
 $^{13}\text{C}_2$ -Phenyllessigsäure, Aldrich, Steinheim  
Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid, Aldrich, Steinheim  
Polyclar AT, Servar, Heidelberg  
PSC-Platten (Kieselgel 60), Merck Darmstadt  
Salzsäure, 37%, Merck, Darmstadt  
Schwefelsäure, Merck, Darmstadt  
Seesand, Merck, Darmstadt  
Silbernitrat, Merck, Darmstadt  
Stickstoff flüssig, Linde, Wiesbaden  
Tertiärbutylmethylether, Merck, Darmstadt  
Tris-[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]-amine, Lancaster, Eastgate  
Tween 80, Aldrich, Steinheim

### **Reinigung von Chemikalien**

Dichlormethan, Diethylether und Pentan wurde vor Gebrauch an einer Vigreux-Kolonne destilliert.

**Phosphatpuffer**

Lösung A: 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1 l mit destilliertem Wasser

Lösung B: 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat ad 1 l mit destilliertem Wasser

pH 7,0:

612 ml Lösung B ad 1 l mit Lösung A

pH 5,5:

390 ml Lösung B ad 1 l mit Lösung A

## 3.3 Synthesen

### 3.3.1 Referenzaromastoffe

#### 3-Methyl-2,4-nonandion

Die Synthese von 3-Methyl-2,4-nonandion erfolgte in Anlehnung an die Veröffentlichung von *Guth und Grosch (1989)*.

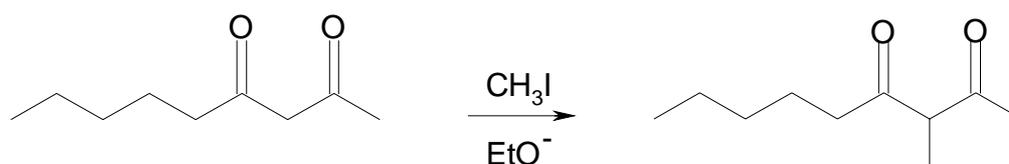


Abbildung 37: Synthese zu 3-Methyl-2,4-nonandion

Zu einer Lösung von Natriumethanolat (26 mmol, 1352 mg) in 13 ml Ethanol, die auf 70 °C erwärmt wurde, wurde langsam 2,4-Nonandion (26 mmol, 4056 mg) zugetropft. Nach Zugabe von Methyljodid (26 mmol, 3692 mg) wurde das Gemisch für drei Stunden gerührt. Anschließend wurde das Ethanol fast vollständig abdestilliert und der Rückstand mit 0,5 % Essigsäure verdünnt. Das Reaktionsprodukt wurde mit Diethylether ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Nicht umgesetztes 2,4-Nonandion wurde mittels mehrfacher Säulenfraktionierung (wassergekühlte Säule, Säulendurchmesser 1,5 cm) abgetrennt, wobei ein nach *Esterbauer (1968)* aufgearbeitetes Kieselgel (25 g) verwendet wurde. Die Elution erfolgte mit Pentan/Ether im Verhältnis 8:2 und das Eluat wurde in Schritten zu 10 ml aufgefangen. Das 3-Methyl-2,4-nonandion wurde kurz nach dem Ausgangsprodukt 2,4-Nonandion eluiert. Der Gehalt der erhaltenen Lösung von 3-Methyl-2,4-nonandion wurde gegen Methyl-octanoat quantifiziert, das die gleiche effektive Kohlenstoffzahl (*Sevcik, 1976*) besitzt.

Ergebnis: 114,4 mg 3-Methyl-2,4-nonandion (0,67 mmol = 2,6 % d. Th.); heuartiger Geruch

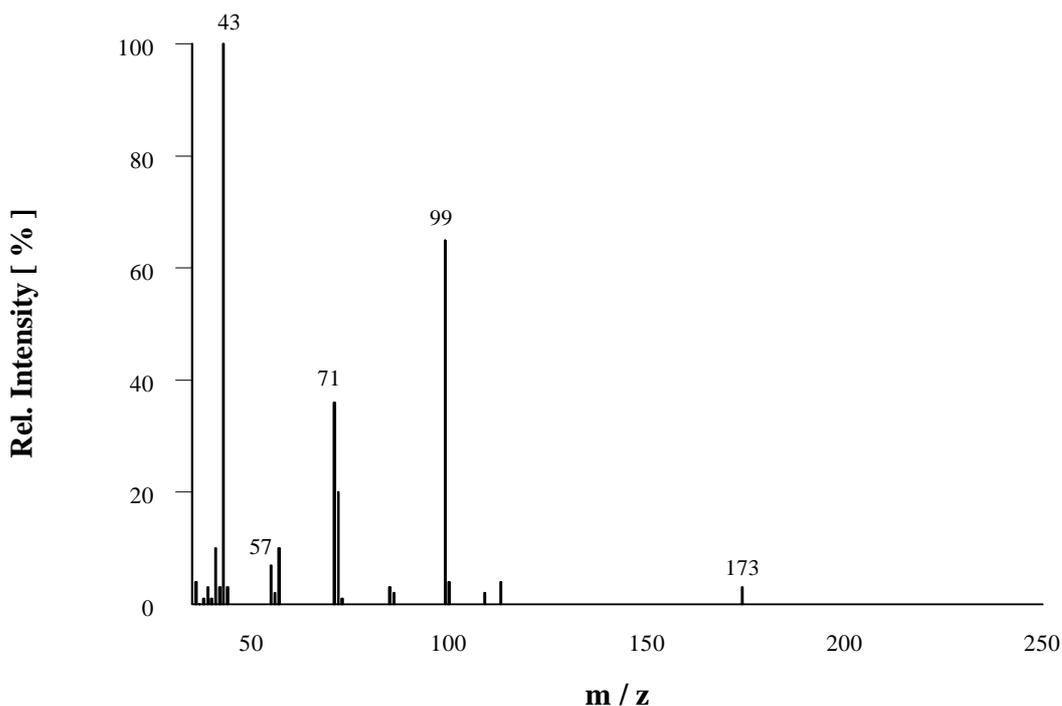


Abbildung 38: Massenspektrum von <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-3-Methyl-2,4-nonandion

### (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal

Die Synthese von 2,4,6-Nonatrienal erfolgte in enger Anlehnung an die Vorschrift von *Buttery* (1975) (Abbildung 39).



Abbildung 39: Syntheseweg zu 2,4,6-Nonatrienal nach *Buttery* (1975)

Zu (E,E)-2,4-Heptadienal (0,6 mg, 6 mmol), das in einem Salzeisbad auf  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurde, wurde zuerst Acetaldehyd (0,55 mg, 12 mmol) und anschließend unter Rühren fünf Tropfen einer 50 % Kaliumhydroxidlösung gegeben. Die Lösung wurde 15 Minuten bei  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und danach eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsprodukt wurde in 100 ml Diethylether aufgenommen, zuerst mit verdünnter Salzsäure (50 ml, 3 N) und anschließend mit gesättigter Natriumcarbonatlösung gewaschen, bevor letztlich die Lösung über Natriumsulfat getrocknet wurde.

Die Abtrennung von nicht umgesetzten (E,E)-2,4-Heptadienal und Nebenprodukten erfolgte säulenchromatographisch (wassergekühlte Säule, Säulendurchmesser 1,5 cm), wobei ein nach *Esterbauer (1968)* aufgearbeitetes Kieselgel (50 g) verwendet wurde. Das 2,4,6-Nonatrienal wurde bei einem Mischungsverhältnis von Pentan/Ether gleich 80/20 eluiert.

Für die **Synthese von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal** wurde auf die phasentransferkatalysierte Wittigreaktion (*Daubresse et al., 1993*) zurückgegriffen.

#### Synthese von 2,4,6-Nonatriensäuremethylester

Tris-[2-(2-methoxyethoxy)-ethyl]-amine (TDA-1) (1 mmol, 323 mg), 80 ml gesättigte Natriumcarbonatlösung und 80 ml Dichlormethan wurden für mehrere Minuten heftig gerührt. Danach wurden Methyl-4-(triphenylphosphonium)crotonate bromide (1,5 mmol, 662 mg) und (E)-2-Pentenal (1 mmol, 84 mg) zugesetzt und 12 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan (100 ml) ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und nach Zugabe von verdünnter Salzsäure (75 ml, 10 %) für 12 h gerührt. Wie beim letzten Schritt wurde nach der Reaktionszeit die organische Phase abgetrennt und die wässrige zweimal mit Dichlormethan (100 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und ein Großteil des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer abgetrennt.

Eine grobe Abtrennung der Nebenprodukte erfolgte durch Säulenchromatographie (wassergekühlte Säule, Säulendurchmesser 1,5 cm) mit Kieselgel (50 g) und Elution mit Diethylether (200 ml).

MS (EI): 77(100), 91(87), 93(53), 59(50), 105(48), 79(46), 166(35), 107(32), 137(31), 78(25), 135(21), 51(18), 106(16), 65(14), 92(11), 136(10), 52(9), 50(8), 150(6), 167(5), 63(5), 53(5), 165(4)

### Reduktion zum 2,4,6-Nonatrien-1-ol

Die Reduktion erfolgte durch Zugabe von Lithiumaluminiumhydrid (kleine Spatelspitze) zur Lösung des 2,4,6-Nonatriensäuremethylesters. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurden ein paar Tropfen Wasser unter starkem Rühren zugegeben. Nach Beenden der Gasentwicklung wurde verdünnte Schwefelsäure (10%) zugetropft, bis sich der Niederschlag aufgelöst hatte. Die Wasserphase wurde im Schütteltrichter abgetrennt und die erhaltene Etherphase über Natriumsulfat getrocknet.

MS (EI): 79(100), 91(35), 77(23), 138(23), 107(14), 80(8), 65(7), 105(7), 109(7)

### Oxidation zum 2,4,6-Nonatrienal

Zur Lösung von 2,4,6-Nonatrien-1-ol in Dichlormethan wurde Dess-Martin-Reagenz (1 mmol, 440 mg) gegeben und zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel fast vollständig am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Pentan aufgenommen und filtriert.

Die Reinigung der beiden Isomere des 2,4,6-Nonatrienals erfolgte säulenchromatographisch (wassergekühlte Säule, Säulendurchmesser 1,5 cm) mit nach *Esterbauer (1968)* aufgearbeitetem Kieselgel (50 g). Die Elutionsmittel und -volumen sind in Tabelle 42 zusammengestellt.

Tabelle 42: Elutionsmittel und Elutionsvolumen zur säulenchromatographischen Trennung bei der Synthese von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal

Fraktion	Elutionsmittel (Pentan/Ether)	Volumen Elutionsmittel (ml)
A	95/5	100
B	90/10	200
C	0/100	100

Die Isomere des 2,4,6-Nonatrienals befanden sich in Fraktion B.

Die **Synthese von (E,E,Z)- und (E,Z,Z)-2,4,6-Nonatrienal** erfolgte analog zur Synthese von (E,E,E)- und (E,Z,E)-2,4,6-Nonatrienal, aber anstelle des (E)-2-Pentenal wurde das (Z)-2-Pental zur Synthese des 2,4,6-Nonatriensäuremethylesters verwendet.

Synthese von (Z)-2-Pental :

Zu einer Lösung von (Z)-2-Penten-1-ol (1,5 mmol, 130 mg) wurde Dess-Martin-Reagenz (2 mmol, 880 mg) gegeben und zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel fast vollständig am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Pentan aufgenommen und filtriert.

Die Zwischenprodukte 2,4,6-Nonatriensäuremethylester und 2,4,6-Nonatrienol unterschieden sich massenspektrometrisch nicht von den Zwischenprodukten der Synthese der (E,E,E)- und (E,Z,E)-Isomere (s.o.).

### 3.3.2 Isotopenmarkierte Aromastoffe

#### $^2\text{H}_3$ -3-Methyl-2,4-nonandion

Die Synthese von  $^2\text{H}_3$ -3-Methyl-2,4-nonandion erfolgte in Anlehnung an die Synthese der unmarkierten Verbindungen (s. 3.3.1; *Guth und Grosch, 1989*).

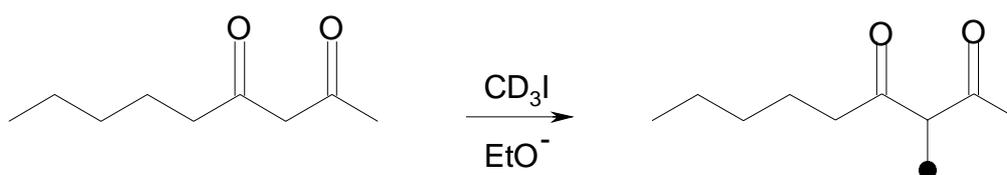
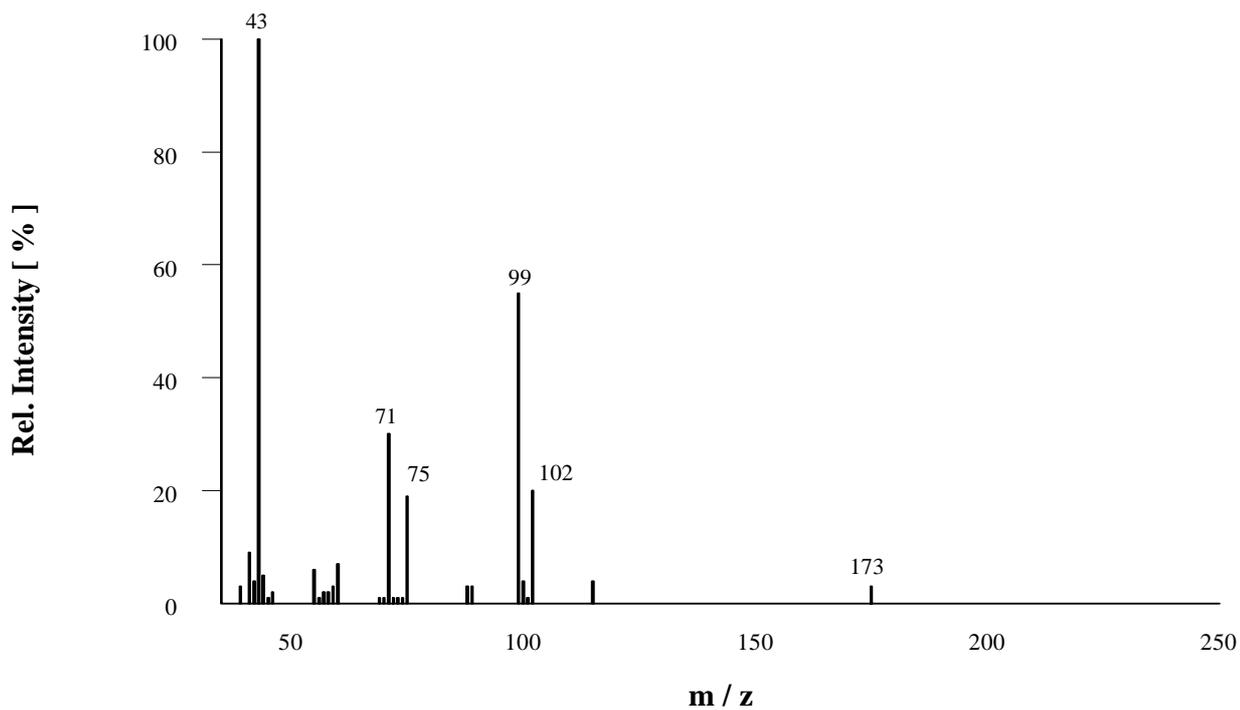
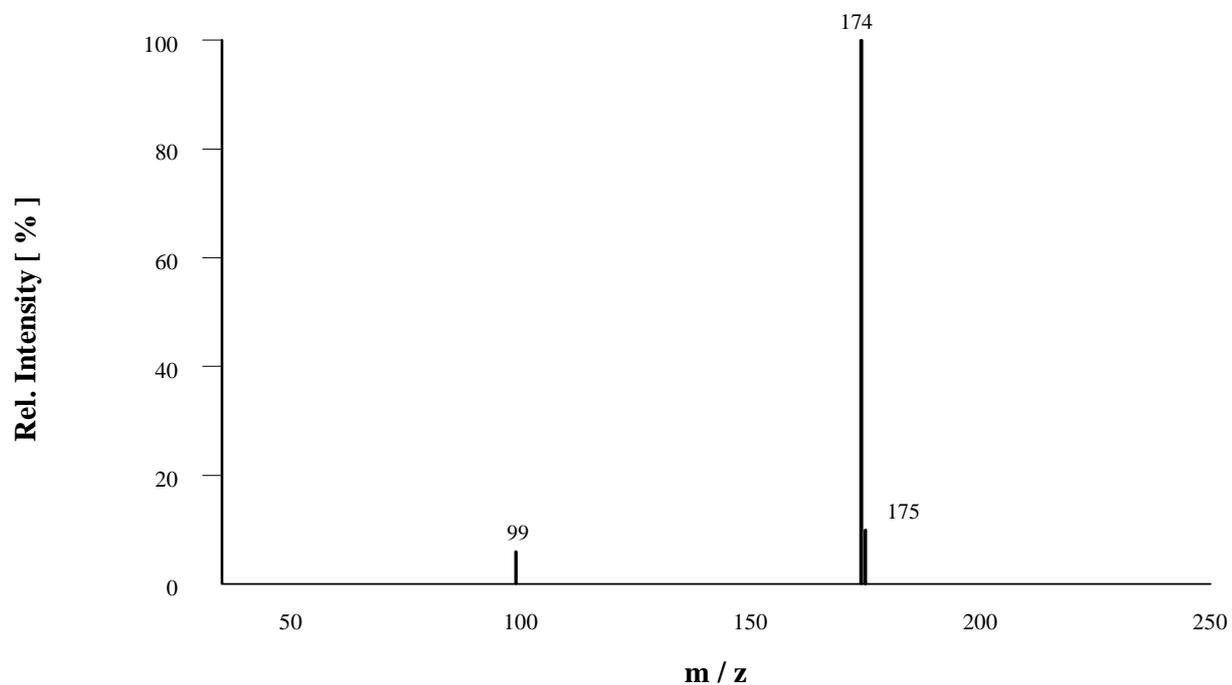


Abbildung 40: Synthese zu  $^2\text{H}_3$ -3-Methyl-2,4-nonandion

Die Isotopenmarkierung wurde durch den Austausch von Methyljodid durch  $^2\text{H}_3$ -Methyljodid in das Molekül eingeführt.

Ergebnis: 805 mg  $^2\text{H}_3$ -3-Methyl-2,4-nonandion (4,65mmol = 17,9% d. Th.); heuartiger Geruch

Abbildung 41: Massenspektrum von  $^2\text{H}_3$ -3-Methyl-2,4-nonandion (MS/EI)Abbildung 42: Massenspektrum von  $^2\text{H}_3$ -3-Methyl-2,4-nonandion (MS/CI)

**$^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal**

Die Synthese von  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal erfolgte analog zur Synthese der unmarkierten Verbindung (s. 3.3.1). Die beiden Kohlenstoffisotope wurden eingeführt, indem der Acetaldehyd durch  $^{13}\text{C}_2$ -Acetaldehyd ersetzt wurde.

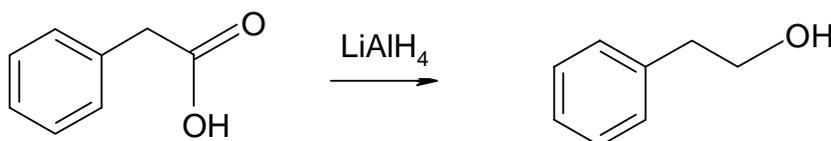
 **$^{13}\text{C}_2$ -2-Phenylethanol**

Abbildung 43: Synthese von  $^{13}\text{C}_2$ -Phenylethanol

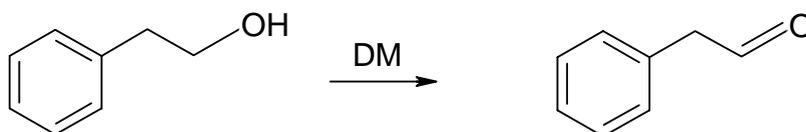
$\text{LiAlH}_4$ : Lithiumaluminiumhydrid

500 mg (3,7 mmol)  $^{13}\text{C}_2$ -Phenyllessigsäure wurden in 20ml wasserfreien Ether gelöst und vorsichtig unter Rühren eine kleine Spatelspitze Lithiumaluminiumhydrid zugegeben.

Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde vorsichtig Wasser zugetropft bis keine Gasentwicklung mehr eintrat und anschließend wurde der Niederschlag durch Zugabe von 4 N Schwefelsäure aufgelöst. In einem Schütteltrichter wurde die organische Phase von der wässrigen getrennt und die wässrige noch zweimal mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet.

MS (EI): 92(100), 93(62), 144(33), 65(15), 39(7), 51(6), 77(5)

MS (CI): 107(100)

**$^{13}\text{C}_2$ -Phenylacetaldehyd**Abbildung 44: Synthese von  $^{13}\text{C}_2$ -Phenylacetaldehyd

DM: Dess-Martin Reagenz

Zu in Dichlormethan gelösten  $^{13}\text{C}_2$ -2-Phenylethanol (3,7 mmol, 460 mg) wurde schrittweise Dess-Martin Reagenz (5,5 mmol, 2500 mg) gegeben und das Gemisch anschließend für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Danach wurde das Lösungsmittel fast vollständig am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Pentan aufgenommen und filtriert.

Der  $^{13}\text{C}_2$ -Phenylacetaldehyd wurde vom nicht umgesetzten  $^{13}\text{C}_2$ -Phenylethanol mittels Säulenchromatographie (wassergekühlte Säule, Säulendurchmesser 1,5 cm) abgetrennt, wobei ein nach *Esterbauer (1968)* aufgearbeitetes Kieselgel (50g) verwendet wurde. Der Aldehyd wurde bei einem Verhältnis von Pentan/Ether gleich 95/5 eluiert.

Die Konzentration der erhaltenen Lösung wurde am GC/FID gegen die Reinsubstanz unter Verwendung des internen Standards Methyl octanoat bestimmt.

MS (EI): 92(100), 93(27), 122(19), 66(14), 65(9), 64(6)

MS (CI): 123(100)

### 3.4 Isolierung von Aromastoffen

Um Nebenreaktionen bei der Isolierung, wie die Bildung oder den Abbau von Aromakomponenten durch Lichteinwirkung zu verhindern, wurde bis zur Abtrennung der Farbstoffe durch den Hochvakuumtransfer ausschließlich Braunglas verwendet oder durch Umwicklung der Glasgeräte mit Aluminiumfolie der Lichteintritt verhindert.

#### **Isolierung flüchtiger Verbindungen aus dem Teepulver für den Einsatz zur AEVA**

50 g des zu untersuchenden Teepulvers wurden in einer handelsüblichen Moulinette zerkleinert und mit 200 ml Dichlormethan für drei Stunden unter Rühren extrahiert. Nach Abtrennung der flüssigen Phase durch Filtration wurde der Rückstand erneut mit 200 ml Dichlormethan versetzt und weitere 16 h extrahiert. Im dritten Schritt wurde der Rückstand weitere drei Stunden mit 200 ml Diethylether extrahiert.

Nach Filtration wurden die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonne bei 42 °C auf 50 ml eingeeengt, die zum anschließenden Hochvakuumtransfer eingesetzt wurden.

#### **Isolierung flüchtiger Verbindungen aus dem Teegetränk für den Einsatz zur AEVA**

Die zu untersuchende Teemenge wurde in einem Becherglas vorgelegt und mit der entsprechenden Menge an kochendem Wasser übergossen. Das Wasservolumen wurde so gewählt, dass pro Liter Wasser 12 g Teeblätter verwendet wurden.

Exakt zweieinhalb Minuten nach Aufbrühen wurden die gequollenen Teeblätter durch Filtration entfernt, einmal mit 100 ml kaltem Wasser gewaschen und das Teegetränk sofort im Eisbad abgekühlt um weitere thermische Reaktionen zu verhindern.

Das abgekühlte Getränk wurde dreimal mit Dichlormethan und zweimal mit Ether ausgeschüttelt, die organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Vor Durchführung des Hochvakuumtransfers wurde der Extrakt an einer Vigreux-Kolonne bei 42 °C auf 50 ml eingeeengt.

## Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE)

Zur Abtrennung der flüchtigen Verbindungen von den nichtflüchtigen wurde ein Hochvakuumtransfer mit der Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE)-Apparatur (Engel *et al.*, 1999) durchgeführt (Abbildung 45).

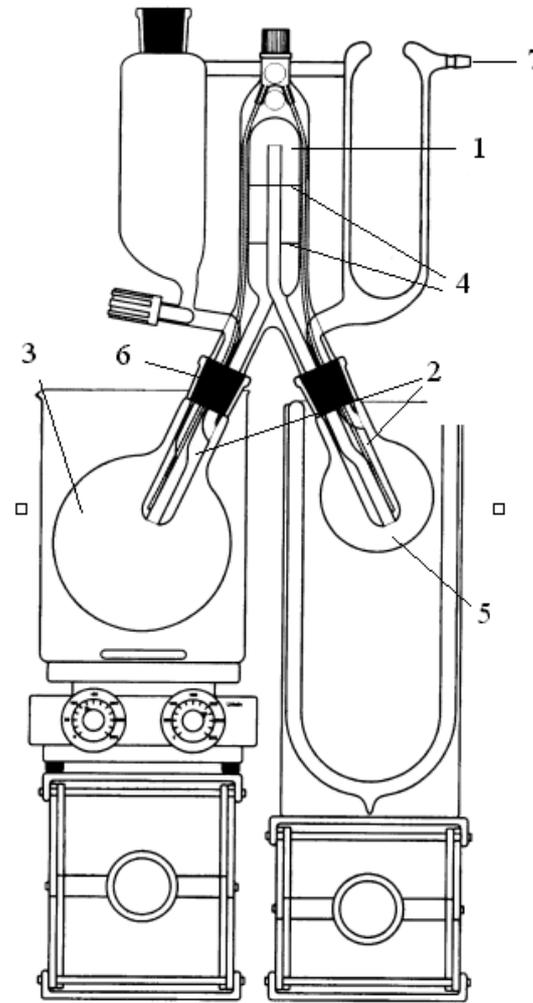


Abbildung 45: Apparatur für die Solvent Assisted Flavor Evaporation (nach Engel *et al.*, 1999)

- 1 Thermostatisierbare Destillationsbrücke
- 2 Thermostatisierbarer Ein- bzw. Ausgang der SAFE
- 3 Einlaßrundkolben
- 4 Spritzschutz
- 5 Kühlfallenrundkolben
- 6 Mit Silikonringen abgedichteter Schliff
- 7 Verbindung zur Hochvakuumpumpe

An den unteren Enden der SAFE-Apparatur wurden zwei Rundkolben (3 und 5) unter Benutzung von Silikonringen (6) dicht angebracht. Nützlich ist die Verwendung eines größeren Rundkolbens unterhalb des Einlassventils, um später das Mitreißen von nicht flüchtigen Bestandteilen bei der Destillation zu erschweren. Das Wasserbad und der beheizbare Teil der Apparatur wurden auf 40 °C temperiert und ein Vakuum von  $10^{-3}$  mbar wurde durch einen Hochvakuumumpfenstand über das Anschlussteil (7) angelegt. Das Dewar-Kühlgefäß um den Rundkolben (5) und die Sicherheitskühlfalle wurden mit flüssigem Stickstoff gefüllt.

Der Extrakt wurde langsam durch den Tropftrichter in das System gelassen, wo er explosionsartig verdampfte. Die flüchtigen Substanzen kondensierten in der Kühlfalle (5), während sich die nicht flüchtigen an dem Rand des Einlassrundkolbens (3) niederschlugen.

Nach Beenden des Hochvakuumtransfers wurde die Apparatur belüftet und der Kolben mit dem Destillat (5) abgenommen.

Das erhaltene Destillat wurde für die AEVA und die Identifizierung anschließend an einer Vigreux-Kolonnen auf 5 ml eingeeengt, bevor es schließlich mittels Mikrodestillation auf 0,5 ml konzentriert wurde.

### **Probenaufarbeitung für die Identifizierung von Aromastoffen**

200 g Tee wurden in einer handelsüblichen Moulinette pulverisiert und mit 300 ml Dichlormethan versetzt. Nach einstündigem Rühren wurde das Lösungsmittel durch Filtration entfernt und der Rückstand erneut mit 200 ml Dichlormethan versetzt und gerührt. Diese Vorgehensweise wurde wiederholt bis insgesamt 1,5 l Lösungsmittel verbraucht wurden. Letztlich folgte eine dreistündige Extraktion mit 300 ml Diethylether bevor die Filtrate kombiniert und an einer Vigreux-Kolonnen auf 100 ml eingeeengt wurden.

Die flüchtigen Bestandteile des konzentrierten Extraktes wurden von den nichtflüchtigen Bestandteilen durch eine Hochvakuumdestillation abgetrennt und das erhaltene Destillat wurde nach Konzentrierung auf 0,5 ml zur Fraktionierung eingesetzt.

Es folgte eine Fraktionierung des Destillates in eine neutral-basische und eine saure Fraktion.

Die aciden Verbindungen wurden durch dreimaliges Ausschütteln mit 50 ml Natriumcarbonatlösung (0,5 mol/l) in die wässrige Phase überführt. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit 100 ml gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und zweimal mit 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Einengen auf 0,5 ml an der Vigreux-Kolonne wurde die neutral-basische Fraktion erhalten.

Die abgetrennten wässrigen Phasen wurden vereinigt, mit verdünnter Salzsäure (1 M) auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und anschließend dreimal mit 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und abschließend mittels einer Vigreux-Kolonne und Mikrodestillation auf 0,5 ml eingengt. Die dadurch erhaltene saure Fraktion wurde direkt zur Identifizierung eingesetzt.

Die neutral-basische Fraktion wurde mittels Säulenchromatographie weiter fraktioniert. Für die Säulenchromatographie, zur weiteren Auftrennung des Extraktes nach der Polarität, wurde Kieselgel 60 verwendet, das nach *Esterbauer (1968)* konditioniert und auf einen Wassergehalt von 7 % eingestellt wurde.

50 g gereinigtes Kieselgel 60 wurden in eine gekühlte Glassäule (29x1 cm) mit Pentan eingeschlämmt und der Extrakt mit Elutionsmitteln zunehmender Polarität aufgetrennt (Tabelle 43).

Tabelle 43: Elutionsmittel und Elutionsvolumen zur säulenchromatographischen Trennung für die Anreicherung der Aromastoffe

Fraktion	Elutionsmittel (Pentan/Ether)	Volumen Elutionsmittel (ml)
A	98/2	50
B	98/2	100
C	95/5	100
D	90/10	100
E	70/30	100
F	0/100	100

Die Fließgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Diezelfraktionen wurden getrennt aufgefangen, über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen und anschließender Mikrodestillation auf 0,5 ml eingengt.

### **Probenaufarbeitung für die Quantifizierung von Aromastoffen**

Die Aufarbeitungsmethoden für die Quantifizierung von Aromastoffen im Teepulver und Teegetränk entsprachen weitestgehend denen für die AEVA (s.o.). Unterschiedlich war lediglich die Zugabe von isotopenmarkierten Standardlösungen. Im Fall der Quantifizierung von Teepulver erfolgte die Dotierung kurz nach der ersten Zugabe des Extraktionsmittels. Bei der Quantifizierung von Teegetränken wurde der Standard nach dem Abkühlen des Teegetränkes zugegeben und das Gemisch 30 Minuten äquilibriert bevor die Aromastoffe ausgeschüttelt wurden.

Die eingesetzte Menge an Teepulver für die Aufarbeitungen richtete sich nach der Konzentration des zu untersuchenden Aromastoffes im Teepulver bzw. im Teegetränk. Die Aufarbeitungsmenge wurde so gewählt, dass sich in der aufgearbeiteten Teemenge ungefähr drei Mikrogramm des Aromastoffes befanden. Die absolute Menge an markierten Aromastoff wurde so gewählt, dass sie im Verhältnisbereich von 0,5 zu 2,0 zum unmarkierten Aromastoff lag.

Die benutzten isotopenmarkierten Verbindungen sind in Tabelle 44 zusammengestellt. Folgende Aromastoffe wurden nicht mit den äquivalenten isotopenmarkierten Verbindungen quantifiziert, sondern mit strukturähnlichen markierten Verbindungen: Geraniol mit  $^2\text{H}_2$ -Linalool, 2-Methylbutanal mit  $^2\text{H}_2$ -3-Methylbutanal,  $\beta$ -Ionon mit  $^2\text{H}_6$ -(E)- $\beta$ -Damascenon und die verschiedenen Isomere des 2,4,6-Nonatrienal mit  $^{13}\text{C}_2$ -(E,E,E)-2,4,6-Nonatrienal.

Die Aufarbeitung zur Quantifizierung der Aromastoffe 2-/3-Methylbutanal und 2-Methylpropanal wurden nur mit Diethylether durchgeführt, um eine Überdeckung der Aromastoffe durch das Lösungsmittel Dichlormethan zu verhindern. Bei den entsprechenden Arbeitsschritten wurde das Dichlormethan durch die gleiche Menge Diethylether ersetzt.

Tabelle 44: Isotopenmarkierte Standards, ausgewählte Massenspuren und Responsefaktoren für die Konzentrationsbestimmungen

Aromastoff	Ion (m/z)	Isotopen- markierung <sup>b</sup>	Ion (m/z)	R <sup>d</sup>
	A <sup>a</sup>		A <sub>m</sub> <sup>c</sup>	
(E)-β-Damascenon	191	<sup>2</sup> H <sub>6</sub>	194-198	1,11
(E,E)-2,4-Decadienal	153	<sup>2</sup> H <sub>4</sub>	156-158	1,03
tr-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal	139	<sup>2</sup> H <sub>4</sub>	143	0,93
Ethyl-2-methylbutanoat	131	<sup>2</sup> H <sub>3</sub>	134	0,99
Geraniol <sup>e</sup>	137	-	-	-
(Z)-4-Heptenal	95	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	97	0,67
Hexanal	101	<sup>2</sup> H <sub>4</sub>	105	0,82
Hexansäure	131	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	133	0,80
(E)-2-Hexenal	99	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	101	0,95
(Z)-3-Hexenal	99	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	101	0,92
(Z)-3-Hexen-1-ol	85	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	87	0,98
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon	129	<sup>13</sup> C <sub>2</sub>	131	0,99
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon	129	<sup>13</sup> C <sub>2</sub>	131	1,00
β-Ionon <sup>f</sup>	193	-	-	-
Linalool	137	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	139	0,96
2/3-Methylbutanal	69	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	71	0,91
3-Methyl-2,4-nonandion	171	<sup>2</sup> H <sub>3</sub>	174	0,86
2-Methylpropanal	73	<sup>2</sup> H <sub>7</sub>	80	0,86
(E,E)-2,4-Nonadienal	139	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	141	0,81
(E,Z)-2,6-Nonadienal	139	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	141	0,61
2,4,6-Nonatrienal	137	<sup>13</sup> C <sub>2</sub>	139	1,01
(E)-2-Nonenal	141	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	143	0,75
(Z)-1,5-Octadien-3-on	125	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	127	0,95
1-Octen-3-on	127	<sup>2</sup> H <sub>2</sub>	129	0,97
Phenol	95	<sup>2</sup> H <sub>5</sub>	100	0,98
Phenylacetaldehyd	121	<sup>13</sup> C <sub>2</sub>	123	1,00
2-Phenylethanol	105	<sup>13</sup> C <sub>2</sub>	107	1,00
Vanillin	153	<sup>2</sup> H <sub>3</sub>	156	0,99

- a m/z des unmarkierten Analyten
- b Isotopenmarkierung des Standards
- c m/z des isotopenmarkierten Standards
- d Responsefaktor
- e Geraniol wurde mit  $^2\text{H}_2$ -Linalool als Standard quantifiziert
- f  $\beta$ -Ionon wurde mit  $^2\text{H}_6$ -(E)- $\beta$ -Damascenon als Standard quantifiziert

### **Probenaufarbeitung für die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses chiraler Aromastoffe**

Für die Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses von R- und S-Linalool im Teepulver und Teegetränk wurden jeweils 2 g Teepulver eingesetzt und analog zu den Aufarbeitungen für die AEVA (s.o.) verarbeitet.

Die von den nichtflüchtigen Bestandteilen entfernten Destillate wurden letztlich auf 0,5 ml eingeeengt und für die massenspektrometrische Bestimmung unter Verwendung einer chiralen Säule eingesetzt (s. 3.6.3).

### **Probenaufarbeitung für die Untersuchung der temperaturabhängigen Freisetzung von Aromastoffen beim Aufbrühen**

Jeweils 4 g des Darjeelin Stars wurden mit 20 °C warmen und kochendem Wasser versetzt. Die Aufbrühhethodik entsprach dem normalen Aufbrühen der Teegetränke (s.o.). In einem dritten Ansatz wurden 4 g mit 20 °C warmen Wasser versetzt, allerdings betrug die Ziehdauer 15 Minuten. Nach dem Abkühlen wurden die für die Isotopenverdünnungsanalyse notwendigen isotopenmarkierten Standards zugesetzt (Tabelle 44) und die Teegetränke wie für die AEVA beschrieben (s.o.) für die quantitative Messung am HRGC/MS Gerät aufgearbeitet.

### **Probenaufarbeitung für die Untersuchung zu glykosidischen Aromastoffvorstufen**

100 g des „Grüner Darjeeling“ wurden in einer handelsüblichen Moulinette zerkleinert und anschließend 15 Minuten mit 500 ml einer Phosphatpufferlösung pH 7 extrahiert und abschließend das nichtgelöste Teepulver abzentrifugiert. Danach wurden die Polyphenole durch Zugabe von 5 g Polyclar AT gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt. Das Filtrat wurde mit Wasser auf exakt 250 ml aufgefüllt. Es wurden vier Ansätze mit jeweils 25 ml des Extraktes erstellt:

Jedem Ansatz wurden 5 ml interner Standard  $^2\text{H}_5$ -Phenol ( $c=1,93 \mu\text{g/ml}$ ) und 4 ml Phenyl- $\beta$ -D-glucopyranosid ( $c=12,1 \mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt. Zusätzlich wurde der zweite Ansatz mit einer Spatelspitze  $\beta$ -Glucosidase versetzt, während zum dritten Ansatz eine kleine Spatelspitze Pectinase gegeben wurde.

Die Ansätze eins bis drei wurden für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert während der vierte Ansatz für zweieinhalb Minuten aufgekocht wurde. Nach dem Abkühlen wurden die für die IVA notwendigen isotopenmarkierten Standards zugegeben (Tabelle 44) und die Ansätze 30 Minuten äquilibriert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die Ansätze zweimal mit 50 ml Diethylether ausgeschüttelt, die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und auf 0,5 ml eingeeengt. Danach wurden die Ansätze mittels HRGC/MS (s. 3.7.2) vermessen.

### **Probenaufarbeitung für die Untersuchung von Linolensäureabbauprodukten**

100 mg Linolensäure wurden in 10 ml Wasser mit 5 ml 0,001% Tween 80 und einigen Tropfen 1 N Natriumhydroxidlösung gelöst und mit Phosphatpuffer pH 5,5 auf 200 ml aufgefüllt. Danach wurde der Ansatz für fünf Minuten mit reinem Sauerstoff begast und für 14 Stunden bei 40 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der für die IVA notwendige isotopenmarkierte Standard zugegeben (Tabelle 44), für 30 Minuten äquilibriert und anschließend der Ansatz zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und die Konzentration der 2,4,6-Nonatrienal-Isomere am TDHRGC/MS-System (s. 3.7.2) gemessen.

Als Blindwert wurde der gleiche Ansatz ohne Inkubationszeit vermessen.

### **Probenaufarbeitung für die AEVA von Haferflocken**

50 g Haferflocken wurden in einer handelsüblichen Moulinette zerkleinert und mit 200 ml Diethylether für drei Stunden unter Rühren extrahiert und der Rückstand durch Filtration abgetrennt. Anschließend wurde der Rückstand erneut mit 200 ml Diethylether versetzt und weitere 16 h extrahiert. Im dritten Schritt wurde der Rückstand weitere drei Stunden mit 200 ml Diethylether extrahiert. Die Filtrate wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C auf 50 ml eingengt. Der Extrakt wurde einem Hochvakuumtransfer ausgesetzt um die nichtflüchtigen Bestandteile abzutrennen und das Destillat wurde abschließend auf 0,5ml eingengt.

### **Probenaufarbeitung für die Quantifizierung der Isomere von 2,4,6-Nonatrienal in Haferflocken**

Für die Quantifizierung von 2,4,6-Nonatrienal wurden 200 g Haferflocken analog zur Probenaufarbeitung für die AEVA bearbeitet (s.o.). Unterschiedlich war lediglich die Zugabe des isotopenmarkierten Standards (Tabelle 44) vor der beginnenden Extraktion zum zerkleinerten Haferflockenpulver. Die Konzentrationen der Isomere von 2,4,6-Nonatrienal wurden am TDHRGC/MS (s. 3.7.2) gemessen.

## 3.5 Sensorische Methoden

### 3.5.1 Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC/O)

#### Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Für die Aromaextraktverdünnungsanalyse wurde der Extrakt sukzessive mit Diethylether 1:1 verdünnt und die Aromastoffe jeder Verdünnungsstufe mittels HRGC/O detektiert, bis keine geruchsaktiven Verbindungen mehr nachweisbar waren (*Schieberle und Grosch, 1987*). Die letzte Verdünnungsstufe, bei der ein Aromastoff noch erkennbar war, ist sein FD-Faktor (FD = Flavor Dilution). Der unverdünnte Extrakt erhielt definitionsgemäß einen FD-Faktor von eins (*Ullrich und Grosch, 1987*).

#### Messen statischer Headspaceproben

Tee wurde frisch aufgebrüht und 50 ml des Teegetränks wurden in einen mit Septum verschlossenen 300 ml Erlenmeyerkolben auf 50 °C im Dunkeln temperiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Wasserphase und Gasraum zu erlangen. 20 ml des Gasraums wurden mit einer gasdichten Spritze entnommen, in das Probenaufgabesystem des Headspace-Gaschromatographen (s. 3.7.1) injiziert und olfaktometrisch detektiert.

### 3.5.2 Sensorische Identifizierung von Aromastoffen

Mit der HRGC/O wurden die Aromastoffe anhand ihrer Aromaqualität, der Geruchsstärke und ihrer Retentionszeiten auf drei Säulen unterschiedlicher Polarität identifiziert.

Es wurden Verdünnungen der Reinsubstanzen erstellt, so dass die Konzentration der Reinsubstanz mit der Konzentration des Aromastoffes im Extrakt äquivalent war. Dann wurden beide Lösungen direkt nacheinander in den Gaschromatographen eingespritzt und die Aromaqualität und –intensität verglichen. Zusätzlich wurde der lineare Retentionsindex der Reinsubstanz und des Aromastoffes auf drei Säulen unterschiedlicher Polarität verglichen.

### 3.5.3 Bestimmung von Geruchsschwellen

#### Geruchsschwellen in Luft

Die Geruchsschwellen in Luft wurden nach dem Prinzip einer AEVA (s. 3.5.1) am Gaschromatographen olfaktometrisch bestimmt (Ullrich und Grosch, 1987). Einer Lösung mit bekannter Konzentration des zu untersuchten Aromastoffes wurde eine definierte Menge an (E)-2-Decenal, das als interner Standard fungierte, zugesetzt. Nach Durchführung der AEVA errechnete sich die Geruchsschwelle des zu untersuchenden Aromastoffes unter Berücksichtigung der Geruchsschwelle von (E)-2-Decenal in Luft (2,7 ng/l; Teranishi et al, 1974) und der beiden ermittelten FD-Faktoren und Konzentrationen nach folgender Gleichung (Gleichung 1):

Gleichung 1: Formel zur Berechnung von Geruchsschwellen in Luft

$$\text{Geruchsschwelle}(x) = 2,7 \text{ ng/l} \times \frac{c(x) \times \text{FD}(\text{Dec})}{c(\text{Dec}) \times \text{FD}(x)}$$

c(x): Konzentration der untersuchten Verbindung

c(Dec): Konzentration von (E)-2-Decenal

FD(x): Flavor Dilution Faktor der untersuchten Verbindung

FD(Dec): Flavor Dilution Faktor von (E)-2-Decenal

#### Geruchsschwellen in Wasser

Für die Bestimmung der Geruchsschwellen in Wasser wurde als erstes untersucht, ob der verwendete Reinstoff Verunreinigungen enthält, die den Geruch beeinflussen. Dazu wurde eine ethanolische Lösung des Reinstoffes mit der Konzentration 1000 µg/ml erstellt und diese einer AEVA (s. 3.5.1) unterzogen. Bei der Reinheitsüberprüfung wurde mit einem Verdünnungsfaktor von zehn gearbeitet. Ein Aromastoff wurde als rein angesehen, wenn die geruchlichen Verunreinigungen einen um mindestens Faktor 100 geringeren FD-Faktor besaßen.

Die Geruchsschwellen der Aromastoffe R-Linalool, Geraniol, 3-Methyl-2,4-nonandion, (E,Z)-2,6-Nonadienal, (Z)-4-Heptenal, Phenylacetaldehyd,  $\beta$ -Ionon, (E,E)-2,4-Decadienal, (E,E)-2,4-Nonadienal, Hexansäure, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, (E)-2-Nonenal und (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal wurden nach folgender Vorschrift ermittelt: Der Reinstoff wurde in Ethanol gelöst und eine Verdünnung mit einem geschätzten Aromawert von 20 erstellt. Die erstellte Verdünnung wurde sukzessive 1+1 (v/v) mit Trinkwasser verdünnt und jede Verdünnungsstufe wurde von einem geschulten Sensorikpanel, mit mindestens 10 Prüfpersonen, in einem Triangeltest gegen zwei Blindproben (Trinkwasser) bewertet.

Die Geruchsschwelle von (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal wurde aus dem Isomerengemisch von (E,E,E) und (E,E,Z) ermittelt. Durch die viel niedrigere Geruchsschwelle des (E,E,Z)-Isomers konnte der Beitrag des (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienals vernachlässigt werden.

Die Aromastoffe 2-Methylpropanal, 3-Methylbutanal, 2-Methylbutanal, (Z)-3-Hexenol, (E)-2-Hexenal, Ethyl-2-methylbutanoat und Hexanal wurden im Rahmen einer koordinierten Geruchsschwellenbestimmung von Mitarbeitern der Technischen Universität München und der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie nach folgender Vorschrift erstellt:

Der Reinstoff wurde in Ethanol gelöst und eine Verdünnung mit Trinkwasser mit einem geschätzten Aromawert von 100 erstellt. Die erstellte Verdünnung wurde sukzessive 1+2 (v/v) mit Trinkwasser verdünnt und jede Verdünnungsstufe wurde von einem geschulten Sensorikpanel, mit mindestens 15 Prüfpersonen, in einem Triangeltest gegen zwei Blindproben (Trinkwasser) bewertet.

Die Geruchsschwellen wurden nach § 35 LMBG, Methoden 00.90-7 und 00.90-9 (Bundesgesundheitsamt, 1996) aus den Schwellenwerten der einzelnen Prüfpersonen nach folgenden Formeln berechnet (Gleichung 2 und Gleichung 3):

Gleichung 2: Formel zur Berechnung von Geruchsschwellen einzelner Prüfpersonen

$$E = \sqrt{c_s \times c_{s+1}}$$

E: Erkennungsschwelle

$c_s$ : Konzentration der letzten wahrgenommenen Probe

$c_{s+1}$ : Konzentration der ersten nicht wahrgenommenen Probe

Gleichung 3: Formel zur Berechnung der Geruchsschwelle für die Prüfergruppe

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

$S_E$ : Erkennungsschwelle der Prüfergruppe

$n$ : Anzahl der Prüfer

$E_i$ : Erkennungsschwelle der einzelnen Prüfer

$\prod_{i=1}^n E_i$ : Produkt der Erkennungsschwellen der einzelnen Prüfer

Ein **Triangeltest** (*Bundesgesundheitsamt, 1996*) wurde durchgeführt, um festzustellen ob eine abweichende Probe noch einen detektierbaren Unterschied aufweist.

Je 10 ml der Probe wurde in ein zylinderförmiges Sensorikgläschen (Höhe 7 cm,  $\varnothing$  3,5 cm) abgefüllt und mit zwei Blindproben in einer beliebigen Reihenfolge einem geschulten Sensorikpanel zur Untersuchung vorgesetzt. Wurde kein Unterschied erkannt, so musste trotzdem eine Probe markiert werden („forced choice“ Technik).

Die Sensorik wurde in einem extra dafür eingerichteten Raum durchgeführt um die Prüfergebnisse zu objektivieren: Die Prüfplätze waren durch Trennwände abgetrennt und der Raum war gut durchlüftet und optimal temperiert (21 °C).

Die Auswertung des Triangeltestes erfolgte nach einer Signifikanztabelle (*Jellinek, 1985*).

### 3.5.4 Aromaprofilanalysen

Als Matrix für die Aromasimulation der untersuchten Teegetränke wurde Trinkwasser benutzt. Die Rekombinate der einzelnen Schwarzteegetränke wurden aus den quantifizierten Daten folgender Aromastoffe erstellt: R-Linalool, Geraniol, Hexanal, (E)-2-Hexenal, (Z)-3-Hexen1-ol, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 2-Methylpropanal, Phenylacetaldehyd, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal, 3-Methyl-2,4-nonandion, (E,Z)-2,6-Nonadienal, (E,E)-2,4-Nonadienal, (E,E)-2,4-Decadienal, (Z)-4-Heptenal,  $\beta$ -Ionon, (E)- $\beta$ -Damascenon, (E)-2-Nonenal und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon. Die Reinstoffe wurden in den entsprechenden Konzentrationen gemischt. Da das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal nicht als Reinstoff vorlag, wurde das Isomeregemisch aus (E,E,E) und (E,E,Z) verwendet.

Durch den großen Unterschied in den Geruchsschwellen der beiden Isomere konnte aber eine Beteiligung des (E,E,E)-2,4,6-Nonatrienals am Gesamtgeruch ausgeschlossen werden.

10 ml des Rekombinates wurden in ein Sensorikgläschen abgefüllt, 5 min in einem Wasserbad auf 50°C temperiert und gegenüber frisch aufgebrühtem Tee, der ebenfalls auf 50 °C temperiert wurde, beurteilt. Dem Sensorikpanel, das aus mindestens zehn Prüfern bestand wurden Aromaeindrücke vorgegeben (Tabelle 45), deren Intensität sie auf einer Skala (0=nicht, 1=schwach, 2=deutlich, 3=stark wahrnehmbar) in 0,5-Schritten bewerten mussten.

Analog wurde das Grünteegetränk mit den quantifizierten Daten der Aromastoffe 3-Methyl-2,4-nonandion, (E)- $\beta$ -Damascenon, R-Linalool, (Z)-4-Heptenal, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal, (E,Z)-2,6-Nonadienal, 2-Methylbutanal und 3-Methylbutanal rekombiniert und bewertet.

Tabelle 45: Referenzaromastoffe

<b>Aromaqualität</b>	<b>Referenzaromastoffe</b>
rosenartig/nach Honig	Geraniol, Phenylacetaldehyd
citrusartig/fruchtig	R-Linalool, (E)- $\beta$ -Damascenon
grasig/grün	Hexanal
malzig	3-Methylbutanal
heuartig	3-Methyl-2,4-nonandion
fettig/frittiert	(E,E)-2,4-Decadienal
fischig/tranig	(Z)-4-Heptenal
karamellartig	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon
nach Haferflocken/süß	(E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal

### 3.5.5 Weglassversuche

Bei der Durchführung der Weglassversuche wurden einzelne oder mehrere Aromastoffe bei der Erstellung des Rekombinates weggelassen und gegen zwei Vollrekombinate in einem Triangeltest von einem Sensorikpanel mit mindestens zehn Teilnehmern bewertet. Neben der Identifizierung der unterschiedlichen Probe mussten die Teilnehmer auch den abweichenden Aromaeindruck nach Tabelle 45 angeben.

## 3.6 Massenspektrometrische Methoden

### 3.6.1 Identifizierungen

Für die Identifizierung von Aromastoffen mussten auch die Massenspektren des Aromastoffes, die im EI- und CI- (Isobutan als Reaktantgas) Modus aufgenommen wurden, mit der Referenz übereinstimmen, um einen Aromastoff eindeutig zu identifizieren.

Die Massenspektren wurden nach säulenchromatographischer Vorreinigung an einem Gaschromatographen, der mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer (s. 3.7.2) gekoppelt war, aufgenommen. Aromastoffe, die trotz der chromatographischen Vorreinigung aufgrund von Interferenzen keine reine Massenspektren lieferten, wurden mit Hilfe der TDHRGC/MS (s. 3.7.2) identifiziert.

### 3.6.2 Quantifizierungen

#### Gehaltsbestimmung der Lösungen isotopenmarkierter Aromastoffe am GC/FID

Die Konzentrationen der Lösungen von Aromastoffen mit markierten Isotopen wurden durch HGRG/FID gegen die entsprechenden kommerziell erwerblichen Reinstoffe unter Einsatz eines internen Standards bestimmt. Als interner Standard, zum Ausgleichen des Einspritz- und Verdünnungsfehlers, wurde Methyl-octanoat verwendet.

Die Konzentrationen isotopenmarkierter Aromastoffe von denen die Reinstoffe nicht zur Verfügung standen, wurden direkt unter Verwendung von Reinstoffen mit gleicher effektiver Kohlenstoffzahl (*Sevcik*, 1967) bestimmt. Für 3-Methyl-2,4-nonandion wurde Methyl-octanoat, für (Z)-3-Hexenal wurde (E)-2-Hexenal, für (Z)-1,5-Octadien-3-on wurde 1-Octen-3-on und für die Isomere des 2,4,6-Nonatrienals wurde (E,Z)-2,4-Nonadienal verwendet.

#### Bestimmung des Responsefaktors R

Zur Ermittlung des Responsefaktors wurden Mischungen des unmarkierten mit dem markierten Aromastoff am HRGC/MS bzw. TDHRGC/MS Gerät gemessen, an dem auch die Quantifizierungen durchgeführt wurden. Von jedem Aromastoff wurden Mischungen im Verhältnis von unmarkiert zu markiert von 1+2, 1+1 und 2+1 (c/c) gemessen und der Responsefaktor nach folgender Formel (Gleichung 4) berechnet:

Gleichung 4: Formel zur Berechnung der Responsefaktoren

$$R = \frac{c_u \times I_m}{I_u \times c_m}$$

- R: Responsefaktor  
c<sub>u</sub>: Konzentration des unmarkierten Analyten  
c<sub>m</sub>: Konzentration des isotonenmarkierten Standards  
I<sub>u</sub> Intensität des Ions m/z des unmarkierten Analyten  
I<sub>m</sub>: Intensität des Ions m/z des isotonenmarkierten Standards

### Konzentrationsmessung am HRGC/MS

Die Quantifizierung der isolierten Aromastoffe erfolgte durch HRGC/MS und TDHRGC/MS (s. 3.7.2) im CI-Modus (Methanol als Reaktantgas). Betrachtet wurden charakteristische Massenfragmente, die über die Berechnungsformel (Gleichung 5) ins Verhältnis gesetzt wurden. Zum Ausgleich uneinheitlicher Isotopenmarkierung wurde ein Korrekturfaktor ermittelt (Responsefaktor).

Gleichung 5: Formel zur Konzentrationsberechnung

$$c_u = \frac{c_m \times I_u}{I_m} \times R$$

- c<sub>u</sub>: Konzentration des unmarkierten Analyten  
c<sub>m</sub>: Konzentration des isotonenmarkierten Standards  
I<sub>u</sub> Intensität des Ions m/z des unmarkierten Analyten  
I<sub>m</sub>: Intensität des Ions m/z des isotonenmarkierten Standards  
R: Responsefaktor

Die Quantifizierung von Säuren erfolgte eindimensional am HRGC/ITD Saturn 2000 (s. 3.7.2) auf einer FFAP-Säule, während die restlichen Aromastoffe zweidimensional gemessen wurden. Bis auf zwei Ausnahmen wurden die Verbindungen am TDGC/ITD Saturn 2000 (s. 3.7.2) mit dem Säulensystem FFAP/OV-1701 gemessen.

Die Aromastoffe (E,Z)-2,6-Nonadienal und die Isomere des 2,4,6-Nonatrienals wurden am TDGC/ITD-800 (s. 3.7.2) mit der Säulenkombination DB-5/FFAP bestimmt. Im Fall des (E,Z)-2,6-Nonadienals coeluierten Verunreinigungen beim FFAP/OV-1701-Systems, während sich die Isomere des 2,4,6-Nonatrienals nur auf der FFAP-Säule eindeutig trennten und somit als letzte Säule eine FFAP-Säule nötig war.

Die verwendeten Massenfragmente der markierten und unmarkierten Aromastoffe sind in Tabelle 44 zusammengestellt.

### **3.6.3 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses chiraler Aromastoffe**

Das Enantiomerenverhältnis von R- und S-Linalool wurde durch direkten Vergleich der Peakflächen massenspektrometrisch ermittelt. Bei der verwendeten MDGC/MS(CI) (s. 3.7.2) wurde als erste Trennsäule eine FFAP und als zweite eine chirale Säule (BGB-176, BGB Analytik, Rothenfluh, CH) verwendet, die eine Trennung der Enantiomere ermöglichte. Die Identifizierung von R- und S-Linalool erfolgte durch Vergleich mit Reinsubstanzen und Zuordnung von RI-Werten.

## 3.7 Analytisch-instrumentelle Methoden

### 3.7.1 Kapillargaschromatographie (HRGC)

Die HRGC-Analysen der Extrakte wurden an einem Gaschromatographen des Typs GC 8160 von Fisons Instruments durchgeführt, der am Säulenausgang über einen Y-Glassplitter und desaktivierten unbelegten Fused-Silica-Kapillaren (0,1 mm ID) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Sniffing-Port verbunden war. Die Aufzeichnung der FID-Signale erfolgte mit einem Schreiber Servogor 124 (ABB Metrawatt Nürnberg) und die Integration mit einem Mega Series Integrator (Carlo Erba, Hofheim).

Gaschromatograph: Gaschromatograph 8160 Fisons Instruments, Mainz

Injektionstechnik: Cool-On-Column mit Sekundärkühlung

Injektionsvolumen: 0,5-2  $\mu\text{l}$

Trärgas: Helium, Vordruck 70 kPa

Brenngase (FID): Wasserstoff, 20 ml/min  
Synthetische Luft, 200 ml/min

Make-up-Gas (FID): Stickstoff, 30 ml/min

Ausgangssplitter: Splitverhältnis 1:1 (v/v) zum FID und Sniffing-Port

Temperaturen: FID: 220 °C  
Sniffing-Port: 220 °C

Eingesetzte Fused-Silica-Kapillartrennsäulen:

DB-5 (SE-54): 30 m x 0,32 mm i.D.; 0,25  $\mu\text{m}$  F.D.; J &W Scientific, Fol-Som;  
USA

DB-FFAP: 30 m x 0,32 mm i.D.; 0,25  $\mu\text{m}$  F.D.; Zebron, Phenomenex

DB-1701 (OV-1701): 30 m x 0,32 mm i.D.; 0,25  $\mu\text{m}$  F.D.; J &W Scientific, Fol-Som;  
USA

Es wurde für alle Säulen ein einheitliches Temperaturprogramm verwendet:

$40^{\circ}\text{C}(2\text{ min}) \xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}} 150^{\circ}\text{C}(0) \xrightarrow{20^{\circ}\text{C}/\text{min}} 230^{\circ}\text{C}(10\text{ min})$

Die Aromastoffe 2-/3-Methylbutanal und 2-Methylpropanal wurden isotherm bei 35 °C quantifiziert.

Durch Cochromatographie einer homologen Reihe von Alkanen konnte der lineare Retentionsindex RI (*Van den Dool und Kratz, 1963*) einer Verbindung durch lineare Interpolation ermittelt werden. Für die FFAP-Säule wurde eine 0,05 % Mischung von C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub> Alkanen in Pentan verwendet, während für die DB-5 und die OV-1701-Säule eine Alkanreihe von C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> ausreichend war.

Die HRGC von statischen Headspaceproben wurden an einem Gaschromatographen Typ CP-9001 (Chrompack, Frankfurt), der mit einem Purge und Trap System TCT/PTI 4001 (Chrompack, Frankfurt) gekoppelt ist, durchgeführt. Die Aromastoffe wurden mittels FID und olfaktometrisch bestimmt.

Desorptionsblock: Sylisierter Glasverbinder  
Trap: CP-Sil 8CP FS Kapillare (40 cm x 0,53 mm; 1,5 µm Filmdicke),  
gekühlt mit flüssigem Stickstoff  
Injektionsvolumen: 20 µl  
Trägergas : Helium, Vordruck 95 kPa  
Brenngase: Wasserstoff, Vordruck 150 kPa  
Synthetische Luft, Vordruck 150 kPa  
Make-up-Gas (FID): Stickstoff, 30 ml/min  
Ausgangssplitter: Splitverhältnis 1:1 (v/v) zum FID und Sniffing-Port  
Temperaturen: FID: 240 °C  
Sniffing-Port: 240 °C

Eingesetzte Kapillarsäule:

RTX-5: SE-54-FS Kapillare, 57m x 0,52mm (ID), 1,5µm Filmdicke,  
Amchro, Sulzbach/Taunus

### 3.7.2 Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie (HRGC/MS)

#### HRGC/MAT 95 S

Zur Identifizierung von Aromastoffen wurden Massenspektren mit einem Gaschromatographen vom Typ 5890 HP Series II (Hewlett Packard, Heilbronn), der mit einem Doppelfocus-Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen) gekoppelt war, durchgeführt. Zur Erzeugung der Spektren wurde Elektronenstoßionisation mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV (EI-Modus) bzw. chemische Ionisation mit Isobutan als Reaktantgas mit einer Ionisierungsenergie von 115 eV (CI-Modus) angewendet. Neben der Identifizierung wurde dieses System auch zur Synthesekontrolle und zur Aufnahme von hochauflösenden Massenspektren verwendet.

#### HRGC/ITD Saturn 2000

Der Gaschromatographen vom Typ Varian GC 3800 (Varian, Darmstadt), der mit einem Massenspektrometer vom Typ Saturn 2000 (Varian, Darmstadt) gekoppelt war, wurde zur eindimensionalen Quantifizierung aus Lösungsmittlextrakten genutzt. Als Reaktandgas diente Methanol und die Ionisierungsenergie im CI-Modus betrug 70 eV.

#### HRGC/MD-800

Dieses ausschließlich zur Überprüfung von Synthesen benutzte HRGC/MS bestand aus einem Gaschromatographen GC 8000 Series (ThermoQuest, Egelsbach) der mit einem Quadrupol-Massenspektrometer MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach) gekoppelt war. Die Ionisierungsenergie im EI-Modus betrug 70 eV.

Die **Zweidimensionale Gaschromatographie (TDHRGC)** fand dort Anwendung, wo Überlagerungen durch coeluiierende Stoffe eine Identifizierung oder Quantifizierung unmöglich machten.

Zwei Gaschromatographen waren über eine thermostatisierbare Transferline (eine unbelegte Kapillarsäule) verbunden. Nach der Auftrennung der Substanzen am ersten Gaschromatographen wurde ein Teil des Gasflusses selektiv mit Hilfe des Moving-Column-Stream-Switching-Systems (MCSS) ausgeschnitten und in einer mit flüssigen

Stickstoff gekühlten Falle fokussiert. Die Schnittstellenzeit wurde durch Einspritzen einer Referenzlösung des zu bestimmenden Aromastoffes mit Hilfe des FID und des Sniffing-Ports festgelegt. Nach dem Ausschneiden wurde die Falle schlagartig auf 200 °C erhitzt und die ausgeschnittenen flüchtigen Verbindungen auf die Säule des zweiten Gaschromatographen gespült. Dort wurde der Aromastoff von den coeluierenden Verbindungen des ersten Gaschromatographen durch die unterschiedliche Polarität der zweiten Säule getrennt und mittels eines Massenspektrometers analysiert.

### **TDGC/ITD-800**

Bei diesem zweidimensionalen System war ein Gaschromatograph Mega 2-Series (Fisons Instruments, Mainz-Kastel) mit einem Gaschromatograph Typ 5160 Mega Series (Carlo Erba, Hofheim) verbunden. Während der erste Gaschromatograph über einen FID und einen Sniffing-Port als Detektoren verfügte, war der zweite Gaschromatograph mit einem Ion-Trap-Massenspektrometer ITD-800 (Finnigan MAT, Bremen) gekoppelt. Gemessen wurden die Massenspektren im CI-Modus mit Methanol als Reaktandgas und einer Ionisierungsenergie von 70 eV oder im EI-Modus mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV. Das System wurde zur Quantifizierung und zur Identifizierung durch optionales Einbauen eines Sniffing-Ports am zweiten GC genutzt.

### **TDGC/ITD Saturn 2000**

Ein Gaschromatograph CP 3800 (Varian, Darmstadt), mit FID und Sniffing-Port, wurde in diesem zweidimensionalen System mit einem Gaschromatographen Trace 2000 (ThermoQuest, Egelsbach), der mit einem Ion-Trap-Massenspektrometer Saturn 2000 (Varian, Darmstadt) verbunden war, gekoppelt. Dieses System wurde ausschließlich zur Quantifizierung benutzt und die Massenspektren wurden im CI-Modus mit Methanol als Reaktandgas bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV aufgenommen.

### **3.7.3 Präparative Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Probe wurde mit einer HPLC-Spritze (250 µl) in der Konzentrierungszone der DC-Platte (Kieselgel 60 F254 20x20cm mit Konzentrierungszone 20x2,5 cm, Schichtdicke 0,5 mm, MERCK, Darmstadt) aufgetragen und in einer mit Diethylether gefüllten Laufkammer am unteren Rand der Trennschicht fokussiert. Anschließend wurde die

DC-Platte in einer geschlossenen Laufkammer mit dem Lösungsmittelgemisch Pentan/Ether = 90/10 (v/v) entwickelt.

Nach Beenden der Laufphase wurden die fluoreszenzlöschenden Bereiche (UV-Lampe; Spectroline Model EWF-260 C/FE, Spectronics Corporation, Westbury, New York USA) markiert, vorsichtig mit einem Spatel abgekratzt und separat gesammelt. Die verschiedenen Isomere wurden vom Kieselgel der einzelnen Fraktionen durch Diethylether gelöst, filtriert und die Reinheit am HRGC/FID (s. 3.7.1) überprüft.

### 3.7.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Synthese wurde über eine Probenschleife in eine isobar arbeitende Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage eingespritzt und nach Trennung über eine Silica-Säule mittels UV-Absorption detektiert.

HPLC-Komponenten:

Pumpe ABIMED 305 von GILSON, Den Haag

Manometric Module 806, GILSON, Den Haag

Dinamic Mixer 811C, GILSON, Den Haag

Photometrischer Detektor SPD-2A, Shimadzu, Duisburg

Kompensationsschreiber RE511, Servogor, Nürnberg

Geräteparameter :

Wellenlänge: 305 nm

Absorbance: 0,32

Flussrate: 1 ml/min

Schreiberempfindlichkeit: 5 V

Schreibergeschwindigkeit: 1 cm/min

Probeschleifenvolumen: 250 µl

Säule: Hypersil® Silica 3 u, 150x4,6 mm von ThermoHypersil

Eluent: Hexan : Tertiärbutylmethylether = 95:5

Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt gesammelt und nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde die Reinheit der gesammelten Fraktionen am HRGC/FID (s. 3.7.1) überprüft.

### 3.7.5 Argentationssäulenchromatographie

10 g Silbernitrat wurden in 200 ml Wasser gelöst und mit 100 g Kieselgel60 vermischt. Am Rotationsverdampfer wurde in einem Braunglaskolben unter Hochvakuum das Wasser bis zu einem Wassergehalt von 7 % entfernt.

Es wurde darauf geachtet, dass während der Benutzung das imprägnierte Kieselgel nie direkt dem Licht ausgesetzt war.

Das imprägnierte Kieselgel wurde in Pentan aufgeschlämmt und in eine wassergekühlte Braunglassäule (20x1 cm) gefüllt.

Die vorgereinigte Synthese wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgegeben und mit Pentan/Ether = 90/10 (v/v) eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Der Eluent wurde mit Hilfe eines Fraktionensammlers in Fraktionen à 5 ml aufgeteilt. Die interessanten Fraktionen wurden durch Riechen selektiert und die Reinheit am HRGC/FID (s. 3.7.1) untersucht.

### 3.7.6 Kernresonanzspektrometrie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem Spektrometer Bruker AMX 400-III (Bruker, Rheinstetten) aufgenommen. Die Proben wurden in Deuteriochloroform gelöst und TMS als interner Standard zugegeben. Die Transmitterfrequenz für die  $^1\text{H}$ -NMR Messungen betrug 400 MHz.

Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte rechnerunterstützt durch das Computerprogramm X-Win-NMR (Version 2.6; Bruker, Rheinstetten).

### Doppelquantengefilterte H,H-Verschiebungskorrelation (COSY)

Durch eine Reihe von Messungen, bei denen zwei  $90^\circ$ -Pulse durch jeweils inkrementell veränderte Wartezeit getrennt waren, wurden  $1\text{H}, 1\text{H}$  korrelierte 2D-Spektren erhalten. Die Signale auf der Diagonalen des 2D-Konturdiagramms stellten hierbei das eigentliche  $1\text{H}$ -Spektrum dar.

## 4 Zusammenfassung

Der Begriff Tee ist definiert als der aus den Teeblättern der Gattung *Thea* bereitete wässrige Abguss. Tee ist nach Wasser das meistkonsumierte Getränk der Welt, und wie bei vielen Lebensmitteln hat das Aroma einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität. Trotzdem wurde bisher keine systematische sensorische Untersuchung des Teearomas durchgeführt.

Über eine Aromaextraktverdünnungsanalyse wurden die bestimmenden Aromastoffe des Schwarztees Darjeeling Gold-Auslese bestimmt und diese nach Identifizierung anschließend über Isoptenverdünnungsanalysen quantifiziert. Zur Bestimmung der Aromarelevanz wurden mit Hilfe der Geruchsschwellenwerte die Aromawerte berechnet. Als Schlüsselaromastoffe des Schwarzteegetränks aus der Sorte Darjeeling Gold-Auslese wurden Linalool, Geraniol, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal, (E)- $\beta$ -Damascenon, 2-Methylpropanal, 2- und 3-Methylbutanal und 3-Methyl-2,4-nonandion bestimmt. Das Schwarzteearoma konnte durch Verwenden der 18 aromaaktivsten Verbindungen erfolgreich simuliert werden.

Der potente, nach Haferflocken riechende Aromastoff (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal wurde neben dem (E,E,E)- und (E,Z,Z)-Isomer erstmals im Tee identifiziert. Ein Versuch mit einem Teilrekombinat ohne (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal zeigte, dass der Aromastoff essentiell für das Schwarzteearoma ist. Für die drei Isomere wurden Syntheserouten entwickelt und nach Synthese wurden die Isomere über NMR identifiziert und anschließend charakterisiert. Über Experimente wurde eine Bildung der 2,4,6-Nonatrienalisomere ausgehend von der Linolensäure bewiesen und ein hypothetischer Bildungsweg über das 9,16-Dihydroperoxid der Linolensäure wurde formuliert.

Weiterhin wurde nach Anwendung der Aromaextraktverdünnungsanalyse das (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal als Schlüsselaromastoff in Haferflocken identifiziert.

Durch Anwenden einer Aromaextraktverdünnungsanalyse wurden die potentesten Aromastoffe im Teepulver der Sorte Darjeeling Gold-Auslese als Linalool, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal,  $\beta$ -Ionon, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon, Phenyllessigsäure und Vanillin identifiziert.

Ein Vergleich der quantifizierten Daten der Aromastoffe aus dem Teepulver und Teegetränk des Darjeeling Gold-Auslese zeigte eine teilweise sehr starke Konzentrationszunahme im Teegetränk. Eine Freisetzung aus glykosidischen Vorstufen konnte ausgeschlossen werden, die Vorstufen bleiben aber weiterhin unklar.

Analog zum Schwarztee wurde das Grünteegetränk aus der Sorte Grüner Darjeeling mit Hilfe der Aromaextraktverdünnungsanalyse und der Isotopenverdünnungsanalyse untersucht. Nur für sieben Aromastoffe wurden ein Aromawert  $\geq 1$  gefunden: 3-Methyl-2,4-nonandion, (E)- $\beta$ -Damascenon, Linalool, (Z)-4-Heptenal, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal, (E,Z)-2,6-Nonadienal und 2- und 3-Methylbutanal. Durch Verwenden dieser Aromastoffe wurde das Grünteeearoma erfolgreich simuliert.

Für das Grünteepulver der Sorte Grüner Darjeeling wurden die Aromastoffe (Z)-4-Heptenal, 3-Methyl-2,4-nonandion, (E,E,Z)-2,4,6-Nonatrienal und Vanillin an Hand einer Aromaextraktverdünnungsanalyse als die potentesten identifiziert. Auch hier wurden teilweise starke Zunahmen der Aromastoffkonzentrationen im Teegetränk im Vergleich zum Teepulver gemessen. Die Ursache konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Im Schwarztee wurden im Vergleich zum Grüntee fast ausschließlich höhere Aromastoffkonzentrationen gemessen, was eindeutig auf die Fermentation zurückzuführen ist. Lediglich das 3-Methyl-2,4-nonandion hatte sowohl im Schwarz- als auch im Grüntee die gleiche Konzentration.

Insgesamt fünf Schwarzteegetränke unterschiedlicher Herkunft wurden mit Hilfe von Aromaextraktverdünnungsanalysen und Isotopenverdünnungsanalysen untersucht und verglichen. Es wurden keine Unterschiede in der Aromastoffzusammensetzung detektiert, sondern lediglich Differenzen in den Aromastoffkonzentrationen. Die auffälligsten Konzentrationsunterschiede wurden bei Linalool, Geraniol und (E)- $\beta$ -Damascenon gefunden. Alle Schwarzteegetränke wurden erfolgreich durch Verwendung der 18 potentesten Aromastoffe simuliert.

Mit den hier erzielten Identifizierungen der aromarelevanten Verbindungen von Schwarz- und Grüntee wurde die Grundlage für weitere Untersuchungen im Bereich Tee geschaffen. Nun besteht die Möglichkeit gezielte Forschungen im Bereich der Teeherstellung durchzuführen, um die Bildung der wertgebenden Aromastoffe zu optimieren.

## Literatur

- Acree, T. E., Barnard, J., Cunningham, D. G.;** A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents; *Food Chem.*; 1984; 14; 273-286
- Aisaka, H., Kosuge, M., Yamanishi, T.;** Comparison of the flavors of Chinese "Keemun" black tea and Ceylon black tea; *Agric. Biol. Chem.*; 1978; 42; 2157-2159
- Baruah, S., Hazarika, M., Mahanta, P. K., Horita, H., Murai, T.;** Effect of plucking intervals on the chemical constituents of CTC black teas; *Agric. Biol. Chem.*; 1986; 50; 1039-1041
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P.;** *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage; Springer Verlag; 2001
- Blank, I., Grosch, W.;** Evaluation of potent odorants in dill seed and dill herb (*Anethum graveolens* L.) by aroma extract dilution analysis; *J. Food Sci.*; 1991; 56; 63-67
- Blank, I., Sen, A., Grosch, W.;** Sensory study on the character-impact flavour compounds of dill herb (*Anethum graveolens* L.); *Food Chem.*; 1992; 43; 337-343
- Blank, I., Schieberle, P., Grosch, W.;** Quantification of the flavour compounds 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone and 5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone by a stable isotope dilution assay; *Progress in Flavor Precursor Studies*, Schreier, P., Winterhalter, P., Allured Publishing Corporation, Carol Stream; 1993; 103-109
- Bondarovich, H., Giammarino, A. S., Renner, J. A., Shephard, F. W., Shingler, A. J. Gianturco, M. A.;** Some aspects of the chemistry of tea. A contribution to the knowledge of the volatile constituents; *J. Agric. Food Chem.*; 1967; 15; 36-47
- Buettner, A., Schieberle, P.;** Evaluation of aroma differences between hand-squeezed juices from Valencia Late and Navel oranges by quantitation of key odorants and flavor reconstitution experiments; *J. Agric. Food Chem.*; 2001b; 49; 2387-2394
- Buettner, A., Schieberle, P.;** Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi* Macfayden) by quantitation and flavor reconstitution experiments; *J. Agric. Food Chem.*; 2001a; 49; 1358-1363
- Bundesgesundheitsamt;** *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG*, Band I/1, Allgemeiner Teil, Lebensmittel (L), Teil 1, Methoden 00.90-7 und 00.90-9; Beuth Verlag, Berlin; 1996
- Buttery, R. G.;** Nona-2,4,6-trienal, an unusual component of blended dry beans; *J. Agric. Food Chem.*; 1975; 23; 1003-1004

- Buttery, R. G., Teranishi, R., Ling, L. C., Turnbaugh, J. G.;** Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles; *J. Agric. Food Chem.*; 1990; 38; 336-340
- Cazenave, P., Hormon, I.; Viani, R.;** Composition of black tea aroma IV; *Helvetica Chimica Acta*; 1974; 57; 206-209
- Cazenave, P., Hormon, I.;** Composition of black tea aroma V; *Helvetica Chimica Acta*; 1974; 57; 209-211
- Co, H., Sanderson, G. W.;** Biochemistry of tea fermentation: conversion of amino acids to black tea aroma constituents; *J. Food Sci.*; 1970; 35; 160-164
- Coggon, P., Romanczyk, L. J., Sanderson, G. W.;** Extraction, purification and partial characterization of a tea metalloprotein and its role in the formation of black tea aroma constituents; *J. Agric. Food Chem.*; 1977; 25; 278-283
- Constantinides, S. M.; Hoover, R.; Karakoltsidis, P. A.; Kelly, T. C.; Lu, Y. C.; Namiki, M.; Schreier, P.; Winterhalter, P.;** *Food Reviews International*; 1995; 11; 371-542
- Czerny, M., Mayer, F., Grosch, W.;** Sensory study on the character impact odorants of roasted arabica coffee; *J. Agric. Food Chem.*; 1999; 47; 695-699
- Daubresse, N., Francesch, C.;** A Mild Synthesis of Coumaryl, Coniferyl, Sinapyl Aldehydes and Alcohols; *Synthesis*; 1994; 369-371
- Day, E. A., Forss, D.A., Patton, S.;** Flavor and odor defects of gamma-irradiated skim milk. II. Identification of volatile components by gas chromatography and mass spectrometry; *J. Dairy Sci.*; 1957; 40; 932-941
- Deutscher Teeverband e.V.;** Anbauregionen des Tees in Sri Lanka und Indien; *Mitteilungsblatt*
- Dick, U.;** Die Teefibel; Naumann & Göbel (Hrsg.); 1999
- Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P.;** Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices; *Eur. Food Res. Technol.*; 1999; 209; 237-241
- Esterbauer, H.;** Über die Autoxydation von Linolsäure-methylester in Wasser III: Chromatographische Auftrennung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte; *Fette, Seifen, Anstrichmittel*; 1968; 70; 1-4
- Fernando, V., Roberts, G. R.;** The effect of process parameters on seasonal development of flavour in black tea; *J. Sci. Food Agric.*; 1984; 35; 71-76
- Fielder, S., Rowan, D. D.;** The synthesis of 3,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>-3-Z-hexenal and 666-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>-Z-hexenal.; *J. Labelled Comp. Radiopharm*; 1995; 36; 465-470

- Fischer, N., Nitz, S., Drawert, F.;** Über gebundene Aromastoffe in Pflanzen; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1987; 185; 195-201
- Fritsch, H.;** Einfluß des Hopfens auf wertgebende Aromastoffe in Pilsener-Bieren sowie in Zwischenstufen des Brauprozesses; Dissertation, TU München; 2001
- Fröhlich, O., Duque, C., Schreier, P.;** Volatile constituents of Curuba (*Passiflora mollissima*) fruit; J. Agric. Food Chem.; 1989; 37; 195-201
- Fuller, G. H., Steltenkamp, R., Tisserand, G.A.;** The gas chromatograph with human sensor: perfumer model.; Ann. NY Acad. Sci.: 1964; 116; 711-724
- Götz-Schmidt, E., Schreier, P.;** Neutral volatiles from blended endive (*Cichorium endivia*, L.); J. Agric. Food Chem.; 1986; 34; 212-215
- Götz-Schmidt, E., Schreier, P.;** Volatile constituents of *Valerianella Locusta*; Phytochemistry; 1988; 27; 845-848
- Grechkin, A. N.; Kuramshin, R.A., Safonova, E.Y., Yefremov, Y.J., Latypov, S.K., Ilyasov, A.V., Tarchevsky, I.A.;** Double hydroperoxidation of  $\alpha$ -linolenic acid by potato tuber lipoxygenase; Biochimica and Biophysica Acta; 1991; 1081; 79-84
- Grosch, W.;** Abbau von Linol- und Linolensäurehydroperoxiden in Gegenwart von Ascorbinsäure; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1977; 163; 4-7
- Grosch, W.;** Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis; Trends in Food Science and Technology; 1993a; 68-73
- Grosch, W.;** Neuere Entwicklungen in der Aromaforschung; Lebensmittelchemie; 1993b; 47; 129-134
- Grosch, W.;** Determination of potent odorants on foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs); Flavour Fragr. J.; 1994; 9; 147-158
- Grosch, W., Laskawy, G.;** Differences in the amount and range of volatile carbonyl compounds formed by lipoxygenase isoenzymes from soybeans; J. Agric. Food Chem.; 1975; 23; 791-794
- Grosch, W., Laskawy, G, Weber, F.;** Formation of volatile carbonyl compounds and cooxidation of  $\beta$ -carotene by lipoxygenase from wheat, potato, flax and beans; J. Agric. Food Chem.; 1976; 24; 456-459
- Guadagni, D.G., Buttery, R.G., Harris, J.;** Odour intensities of hop oil components; J. Sci. Fd. Agric.; 1966; 17; 142-144

- Guo, W., Sakata, K., Watanabe, N., Nakajima, R., Yagi, A., Ina, K., Luo, S.;** Geranyl 6-O-b-D-xylopyranosyl-b-D-glucopyranoside isolated as an aroma precursor from tea leaves for oolong tea; *Biochemistry*; 1993; 33; 1373-1375
- Guo, W., Hosoi, R., Sakata, K. Watanabe, N., Yagi, A., Ina, K., Luo, S.;** (S)-linalyl, 2-phenethyl, and benzyl disaccharide glycosides isolated as aroma precursors from oolong tea leaves; *Biosci. Biotech. Biochem.*; 1994; 58; 1532-1534
- Guo, W., Ogawa, K., Yamauchi, N., Watanabe, N., Usui, T., Luo, S., Sakata, K.;** Isolation and characterization of a  $\beta$ -primeverosidase concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves; *Biosci. Biotechn. Biochem.*; 1996; 60; 1810-1814
- Guth, H., Grosch, W.;** 3-Methylnonane-2,4-dione - an intense odour compound formed during flavour reversion of soya-bean oil; *Fat, Science, Technology*; 1989; 91; 225-230
- Guth, H., Grosch, W.;** Deterioration of soy-bean oil: Quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay; *Lebensm. Wiss. Techn.*; 1990a; 23; 513-522
- Guth, H., Grosch, W.;** Comparison of stored soya-bean and rapeseed oils by aroma extract dilution analysis; *Lebensm. Wiss. Techn.*; 1990b; 23; 59-65
- Guth, H.; Grosch, W.;** Detection of furanoid fatty acids in soy-bean oil – cause for the light-induced off-flavour; *Fat. Sci. Techn.*; 1991; 93; 249-255
- Guth, H., Grosch, W.;** Furan fatty acids in butter and butter oil; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*; 1992; 194; 360-362
- Guth, H., Grosch, W.;** Identification of potent odourants in static headspace samples of green and black tea powders on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA); *Flavour Fragr. J.*; 1993a; 8; 173-178
- Guth, H., Grosch, W.;** Furanoid Fatty Acids as Precursors of a Key Aroma Compound of Green Tea; *Progress in Flavour Precursor Studies*, Schreier, P., Winterhalter, P. (ed.); 1993b; 401-407
- Guth, H., Grosch, W.;** Quantification of potent odorants of virgin olive oil by stable-isotope dilution assay; *JAOCS*; 1993c; 70; 513-518
- Guth, H., Grosch, W.;** Odorants of extrusion products of oat meal-changes during storage; *Z. Lebens. Unters. Forsch.*; 1993d; 196; 22-28
- Guth, H., Grosch, W.;** Geruchsstoffe von extrudiertem Hafermehl, Veränderungen bei der Lagerung; *Z. Lebens. Unters. Forsch.*; 1993e; 196; 22-28

- Halder, J., Bhaduri, A.;** Glycosidases from tea-leaf (*Camellia sinensis*) and characterization of  $\beta$ -galactosidase; *Journal of Nutritional Biochemistry*; 1997; 8; 378-384
- Hatanaka, A., Harada, T.;** Formation of cis-3-hexenal, trans-2-hexenal and cis-3-hexenol in macerated *thea sinensis* leaves; *Phytochemistry*; 1973; 12; 2341-2346
- Hazarika, M., Mahanta, P. K.;** Some studies on carotenoids and their degradation in black tea manufacture; *J. Sc. Food. Agric.*; 1983; 34; 1390-1396
- Hazarika, M., Mahanta, P. K., Takeo, T.;** Studies on some volatile flavour constituents on orthodox black tea of various clones and flushes in north-east India; *J. Sci. Food Agric.*; 1984; 35; 1201-1207
- Howard, G. E.;** The volatile constituents of tea; *Food Chem.*; 1978; 4; 97-106
- Ho, C., Zhu, N.;** The chemistry of tea; *ACS Symposium Series*; 2000; 745; 316-326
- Ijima, Y., Ogawa, K., Watanabe, K., Usui, T., Ohnishi-Kameyama, M., Nagata, T., Sakata, K.;** Characterization of  $\beta$ -primeverosidase, being concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves to be processed into black tea and preliminary observations on its substrate specificity; *J. Agric. Food Chem.*; 1998; 46; 1712-1718
- Jagella, T.;** Untersuchungen über das Aroma und Fehl aroma von schwarzem und weißem Pfeffer; Dissertation, TU München; 1999
- Jagella, T.; Grosch, W.;** Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) III. Desirable and undesirable odorants of white pepper.; *Eur. Food. Res. Technol.*; 1999; 209; 27-31
- Jellinek, G.;** Sensory evaluation of food; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim; 1985
- Kato, M., Omori, M.;** Characterization of flavor of tea produced in different tea areas; *Developments in Food Science*; 1998;40; 423-430
- Kawakami, M., Ganguly, S.N., Banerjee, J., Kobayashi, A.;** Aroma composition of Oolong tea and black tea by brewed extraction method and characterizing compounds of darjeeling tea aroma; *J. Agric. Food Chem.*; 1995; 43; 200-207
- Kerler, J., Grosch, W.;** Odorants contributing to warmed-over flavor (WOF) of refrigerated cooked beef; *J. Food Sci.*; 1996; 61; 1271-1274
- Kobayashi, M., Kubota, K., Joki, Y.;** (Z)-3-Hexenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside in fresh tea leaves as a precursor of green odor; *Biosc. Biotechn. Biochem.*; 1994; 58; 592-593

- Kobayashi, M., Kubota, K., Wang, D.;** Qualitative and quantitative analyses of glycosides as aroma precursors during the tea manufacturing process; *Frontiers of flavour science*; Ed. Schieberle, P., Engel, K.-H.; 2000; 452-456
- Kumazawa, K., Masuda, H.;** Identification of potent odorants in Japanese green tea (Sen-cha); *J. Agric. Food Chem.*; 1999; 47; 5169-5172
- Kumazawa, K., Masuda, H.;** Change in the Flavor of Black Tea Drink during Heat Processing; *J. Agric. Food Chem.*; 2001; 49; 3304-3309
- Kumazawa, K., Masuda, H.;** Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique; *J. Agric. Food Chem.*; 2002; 50; 5660-5663
- Likens, S. T., Nickerson, G. B.;** Detection of certain hop oil constituents in brewing products; *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*; 1964; 5-13
- Maga, J. A.;** Taste threshold values for phenolic acids which can influence flavor properties of certain flours, grains and oilseeds; *Cereal Science Today*; 1973; 18; 326-330
- Mahanta, P. K., Baruah, S.;** Relationship between process of withering and aroma characteristics of black tea; *J. Sci. Food Agric.*; 1989; 46; 461-468
- Mahanta, P. K., Baruah, S., Owuor, P. O., Murai, T.;** Flavour volatiles of Assam CTC black teas manufactured from different plucking standards and orthodox teas manufactured from different altitudes of Darjeeling; *J. Sc. Food Agric.*; 1988; 45; 317-324
- Masuda, H., Kumazawa, K.;** The change in the flavor of green and black tea drinks by the retorting process; *ACS Symposium Series*; 2000; 745; 337-346
- Meilgaard, M. C.;** Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition; *J. Agric. Food Chem.*; 1982; 30; 1009-1017
- Mick, W., Schreier, P.;** Additional volatiles of black tea aroma; *J. Agric. Food Chem.*; 1984; 32; 924-929
- Mick, W., Goetz, E., Schreier, P.;** Volatile acids of black tea aroma; *Lebens. Wiss. Techno.*; 1984; 17; 104-106
- Milo, C., Grosch, W.;** Changes in the odorants of boiled salmon and cod as affected by the storage of the raw material; *J. Agric. Food Chem.*; 1996; 44; 2366-2371
- Mulders, J.;** The odour of white bread. IV. Quantitative determination of constituents in the vapour and their odour values; *Z. Lebens. Unters. Forsch.*; 1973; 151; 310-317
- Näf, R., Velluz, A.;** Volatile constituents of blood and blond orange juices: a comparison; *The Journal of essential oil research*; 1996; 8; 587-595

- Näf, R., Velluz, A.;** The volatile constituents of extracts of cooked spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.); *Flavour Fragr. J.*; 2000; 15; 329-334
- Neff, W. E., Frankel, E.N., Weisleder, D.;** Photosensitized oxidation of methyl linolenate. Secondary products; *Lipids*; 1982; 17; 780-790
- Nishikitani, M., Kubota, K., Kobayashi, A., Sugawara, F.;** Geranyl 6-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated as an aroma precursor from leaves of a green tea cultivar; *Biosc. Biotechn. Biochem.*; 1996; 60; 929-931
- Nose, M., Nakatani, Y., Yamanishi, T.;** Studies on the flavor of green tea : Part IX : Identification and composition of intermediate and high boiling constituents in green tea flavor ; *Agric. Biol. Chem.*; 1971; 35; 261-271
- Owuor, P. O.;** Comparison of gas chromatographic volatile profiling methods for assessing the flavour quality of Kenyan black teas; *J. Sc. Food Chem.*; 1992a; 59; 189-197
- Owuor, P. O.;** Changes in quality parameters of commercial black seedling tea due to the time of the year in the eastern highland of Kenya; *Food Chem.*; 1992; 45; 119-124
- Owuor, P. O., Horita, H., Tsushida, T., Murai, T.;** Comparison of the chemical composition of black tea from main black tea producing parts of the world; *Tea*; 1986; 21; 195-203
- Owuor, P. O., Ngètich, W. K., Obanda, M.;** Quality response of clonal black tea to nitrogen fertilizer, plucking interval and lucking standard; *J. Sci. Food Agric.*; 2000; 80; 439-446
- Owuor, P. O., Obaga, S.O., Othieno, C.O.;** The effects of altitude in the chemical composition of black tea; *J. Sci. Food Agric.*; 1990; 50; 9-17
- Owuor, P. O.; Obanda, M.;** The impact of withering temperature on black tea quality; *J. Sci. Food Agric.*; 1996; 70; 288-292
- Owuor, P. O., Obanda, M.;** The changes in black tea quality due to variations of plucking standard and fermentation time; *Food Chem.*; 1998; 61; 435-441
- Owuor, P. O., Obanda, M., Othieno, C.O., Horita, H., Tsushida, T., Murai, T.;** Changes in the chemical composition and quality of black tea due to plucking standards; *Agric. Biol. Chem.*; 1987; 51; 3383-3384
- Owuor, P. O., Odhiambo, O. H.;** Variations in the leaf standard, chemical composition and quality of black tea (*Camellia sinensis*) due to plucking intervals; *J. Sci. Food Agric.*; 1990; 52; 63-69

- Owour, P. O., Odhiambo, O. H.;** The response of quality and yield of black tea of two *Camellia sinensis* varieties to method and intervals of harvesting; *J. Sci. Food Agric.*; 1993; 62; 337-343
- Owuor, P. O., Odhiambo, O. H.;** Response of some black tea quality parameters to nitrogen fertiliser rates and plucking frequencies; *J. Sci. Food Agric.*; 1994; 66; 555-561
- Owuor, P. O.; Orchard, J. E.;** Effects of storage time in a two stage withering process on the quality of seedling black tea; *Food Chem.*; 1992; 45; 45-49
- Owuor, P. O., Orchard, J. E., McDowell, I. J.;** Changes in the quality parameters of clonal black tea due to fermentation time; *J. Sci. Food Agric.*; 1994; 64; 319-326
- Owuor, P. O., Orchard, J. E., Robinson, J. M., Taylor, S. J.;** Variations of the chemical composition of clonal black tea (*Camellia sinensis*) due to delayed withering; *J. Sci. Food Agric.*; 1990; 52; 55-61
- Owuor, P. O., Othieno, C.O.;** Response of tea quality parameters to time of year and nitrogen fertilizer; *J. Sci. Food Agric.*; 1991; 55; 1-11
- Owuor, P. O., Othieno, C. O.; Horita, H., Tsushida, T., Murai, T.;** Effects of nitrogenous fertilizers on the chemical composition of CTC black tea; *Agric. Biol. Chem.*; 1987; 51; 2665-2670
- Owuor, P. O., Othienno, C. O., Robinson, J. M., Baker, D. M.;** Changes in the quality parameters of seedling tea due to height and frequency of mechanical harvesting; *J. Sci. Food Agric.*; 1991; 55; 241-249
- Owuor, P. O., Reeves, S. G.;** Optimising fermentation time in black tea manufacture; *Food Chem.*; 1986; 21; 195-203
- Owuor, P. O., Tsushida, T., Horita, H., Murai, T.;** Effects of artificial withering on the chemical composition and quality of black tea; *Tropical Science*; 1987; 27; 159-166
- Ravichandran, R.;** Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on tea quality and aroma; *Food Chem.*; 2002; 78; 23-28
- Ravichandran, R., Parthiban, R.;** The impact of processing techniques on tea volatiles; *Food Chem.*; 1998a; 62; 347-353
- Ravichandran, R., Parthiban, R.;** The impact of mechanization of tea harvesting on the quality of south Indian CTC tea; *Food Chem.*; 1998b; 63; 61-64
- Renold, W., Näf-Müller, R., Keller, U., Willhalm, B., Ohloff, G.;** An investigation of the tea aroma part I. New volatile black tea constituents; *Helvetica Chimica Acta*; 1974; 57; 1301-1308

- Robinson, J. M., Owuor, P. O.;** Tea; Tea: Cultivation to Consumption, Willison, K. C., Clifford, M. N. (ed.); 1992
- Rothe, M., Thomas, B.;** Aromastoffe des Brotes. Versuch einer Auswertung chemischer Geschmacksanalysen mit Hilfe des Schwellenwertes; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1963; 119; 302-310
- Rychlik, M.; Schieberle, P., Grosch, W.;** Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München (Hrsg.); 1998
- Saijo, R.;** Study on black tea aroma in special reference to the formation mechanism of volatile carbonyl compounds; JARQ; 1973; 7; 202-207
- Saijo, R., Kuwabara, Y.;** Volatile flavor of black tea; Agric. Biol. Chem.; 1967; 31; 389-396
- Saijo, R., Takeo, T.;** The formation of aldehyds from amino acids by tea leaves extracts; Agric. Biol. Chem.; 1970; 34; 227-233
- Saikja, P., Mahanta, P. K.;** Specific fluctuations in the composition of lipoxygenase- and glycosidase-generated flavors in some cultivated teas of Assam; J. Agric. Food Chem.; 2002; 50; 7691-7699
- Sanderson, G. W.;** Black tea aroma and ist formation; Geruch- und Geschmacksstoffe, Drawert, F. (Hrsg.), Verlag Hans Carl Nürnberg; 1975; 65-97
- Sanderson, G. W., Gonzales, J.G.;** Biochemistry of tea fermentation: the role of carotenes in black tea aroma formation; J. Food Science; 1971; 36; 231-236
- Sanderson, G. W., Graham, H. N.;** On the formation of black tea aroma; J. Agric. Food Chem.; 1973; 21; 576-585
- Schieberle, P.;** Primary odorants of pale lager beer. Differences to other beers and changes during storage; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1991; 193; 558-565
- Schieberle, P.;** Recent developements in method for analysis of flavor compounds and their precursors; Characterization of food: emerging methods; Goankar, A. (Hrsg.); Elviesier, Amsterdam; 1995; 403-431
- Schieberle, P., Grosch, W.;** Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis.; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1987a; 185; 111-113
- Schieberle, P., Grosch, W.;** Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts using a stable dilution assay.; J. Agric. Food Chem.; 1987b; 35; 252-257

- Schieberle, P., Grosch, W.;** Potent odorants of the wheat bread crumb.; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1991; 192; 130-135
- Schieberle, P., Grosch, W.;** Changes in the concentration of potent crust odourants during storage of white bread; Flavour Fragr. J.; 1992; 7; 213-218
- Schmid, W., Grosch, W.;** Identifizierung flüchtiger Aromastoffe mit hohen Aromawerten in Sauerkirschen (*Prunus cerasus* L.); Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1986; 182; 407-412
- Semmelroch, P., Laskawy, G., Blank, I., Grosch, W.;** Determination of potent odorants on roasted coffee by stable isotope dilution assays; Flavour Fragr. J.; 1995; 10; 1-7
- Sen, A., Laskawy, G., Schieberle, P., Grosch, W.;** Quantitative determination of  $\beta$ -damascenone in foods using a stable isotope dilution assay; J. Agric. Food Chem.; 1991; 39; 757-759
- Sen, A., Schieberle, P., Grosch, W.;** Quantitative determination of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and its methyl ether using a stable isotope dilution assay; Lebensm. Wiss. Techn.; 1991; 24; 364-369
- Sevcik, J.;** Detectors in gas chromatography; Journal of Chromatography; 1967; 4; 87-99
- Skouroumounis, G. K., Massy-Westropp, R. A., Sefton, M.A., Williams, P.J.;**  $\beta$ -Damascenone formation in juices and wines; Progress in Flavor and Precursor Studies, Schreier, P., Winterhalter, P. (Hrsg.) Allured Publishing Corporation, IL, USA, 275-278; 1993
- Sweeley, C. C., Elliot, W. H., Fries, J., Ryhage, R.;** Mass spectrometric determination of unresolved components in gas chromatographic effluents; Anal. Chem.; 1966; 38; 1549-1553
- Takeo, T.;** Black tea aroma and its formation. Part 1. Production of linalol and geraniol by hydrolytic breakdown of bound forms in disrupted tea shoots; Phytochemistry; 1981; 20; 2145-2147
- Takeo, T.;** Effect of clonal specificity of the monoterpene alcohol composition of tea shoots on black tea aroma profile; JARQ; 1983; 17; 120-124
- Takeo, T.;** Effect of the withering process on volatile compound formation during black tea manufacture; J. Sc. Food Agric.; 1984; 35; 84-87
- Takeo, T.; Mahanta, P. K.;** Comparison of black tea aromas of orthodox and CTC tea and of black tea made from different varieties; J. Sci. Food Agric.; 1983; 34; 307-310

- Teranishi, R., Buttery, R. G., Guadagni, D. G.;** Odor quality and chemical structure in fruit and vegetable flavors.; Ann. NY Acad. Sci.; 1974; 237; 209-216
- TNO;** Volatile compounds in Food; TNO; 1996; 73A, B, E
- Tomlins, K. I.; Mashingaidze, A.;** Influence of withering, including leaf handling, on the manufacturing and quality of black teas – review; Food Chem.; 1997; 60; 573-580
- Triqui, R., Guth, H.;** Determination of Potent Odorants in Ripened Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) by Aroma Extract Dilution Analysis and by Gas Chromatography-Olfactometry of Headspace Samples; American Chemical Society; 1997; 4; 31-38
- Ullrich, F., Grosch, W.;** Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linolenic acid; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1987; 184; 277-282
- Ullrich, F. Grosch, W.;** Identification of the most intense odor compounds formed during autoxidation of methyl linolenate at room temperature.; JAOCS.; 1988; 65; 1313-1317
- Van den Dool, H., Kratz, P. D.;** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography; J. Chrom.; 1963; 11; 463-471
- Vitzthum, O. G., Werkhoff, P., Hubert, P.;** New volatile constituents of black tea aroma; J. Agric. Food Chem.; 1975; 23; 999-1003
- Wang, D., Ando, K., Morita, K., Kubota, K., Kobayashi, A.;** Optical isomers of linalool and linalool oxides in tea aroma; Biosc. Biotechn. Biochem.; 1994; 58; 2050-2053
- Widder, S., Grosch, W.;** Study on the cardboard off-flavour formed in butter oil; Z. Lebens. Unters. Forsch.; 1994; 198; 297-301
- Wickremasinghe, K. I., Wick, E.L., Yamanishi, T.;** Gas chromatographic-mass spectrometric analyses of flavory and non-flavory Ceylon black tea aroma concentrates prepared by two different methods; Chromatographie; 1973; 75-80
- Yamaguchi, K., Shibamoto, T.;** Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinesis* L. var Yabukita); J. Agric. Food Chem.; 1981; 29; 366-370
- Yamanishi, T., Kiribuchi, Y., Mikumu, Y., Sato, H., Ohmura, A., Mine, A., Kurata, T.;** Studies on the flavor of green tea: Part VI: Neutral fraction of the essential oil of tea-leaves; Agric. Biol. Chem.; 1965; 29; 300-306
- Yamanishi, T., Kiribuchi, Y., Sakai, M., Fujita, N., Ikeda, Y., Sasa, K.;** Studies on the flavor of green tea: Part V: Examination of the essential oil of the tea-leaves by gas-liquid chromatography; Agric. Biol. Chem.; 1963; 27; 193-198

**Yamanishi, T., Kobayashi, A.;** Progress of tea aroma chemistry; Flavor Chemistry: 30 Years of Progress; Teranishi (ed.); 1999; 135-145

**Yamanishi, T., Wickremasinghe, R.L., Perera, K.P.C.W.;** Studies on the flavour and quality of tea. 3-Gas chromatographic analysis of aroma complex; Tea Quart.; 1978; 39; 81-86

**Yano, M., Okada, K., Kubota, K., Kobayashi, A.;** Studies on the precursors of monoterpene alcohols in tea leaves; Agric. Biol. Chem.; 1990; 4; 1023-1028

### **Internetadressen**

[www.benjowskitea.de](http://www.benjowskitea.de)

[www.darjeelingtea.com](http://www.darjeelingtea.com)

[www.fao.org](http://www.fao.org)

[www.tea.org.au](http://www.tea.org.au)

[www.teekontor-net.de](http://www.teekontor-net.de)

[www.teeverband.de](http://www.teeverband.de)