

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie

**Untersuchungen flüchtiger Verbindungen in Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* L.)**

Márta Dregus

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 28.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.09.2004 angenommen.

MEINER FAMILIE  
GEWIDMET

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“  
(Goethe; zur Iphigenie, aus der Italienischen Reise 1787)*

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K.-H. Engel für die Überlassung des interessanten Themas, die ausserordentliche wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Unterstützung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen ehemaligen und derzeitigen Arbeitskollegen, insbesondere Frau Dr. A. Schellenberg, Frau T. Feuerbach, Frau. M. Wakabayashi, Herrn Dr. H. Wakabayashi und Frau J. Cioranu für die Hilfsbereitschaft sowie das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima.

Herrn Dr. L. Ziegler und Herrn Dr. B. Meier danke ich für die wertvollen Ratschläge in technischen und technologischen Angelegenheiten.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. H.-G. Schmarr und Herrn E. Takahisa für ihre Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung sowie für die Herstellung von chiralen Kapillarsäulen.

Herrn Prof. Dr. K. Guthy und Frau H. Guthy danke ich herzlich für das besondere Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre verständnisvolle Unterstützung.

Mein Dank richtet sich außerdem an die Technische Universität München und das Bayerische Staatsministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst, die mich durch ein Stipendium teilweise finanziell unterstützt haben.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b>	1
<b>2. GRUNDLAGEN</b>	3
<b>2.1 Rhabarber und seine Verwendung</b>	3
<b>2.2 Aromastoffe</b>	8
<b>2.3 Aromaanalytik</b>	12
2.3.1 Isolierung und Anreicherung flüchtiger Verbindungen	12
2.3.2 Identifizierung und Quantifizierung flüchtiger Verbindungen	13
2.3.3 Sensorische Bewertung flüchtiger Verbindungen	14
2.3.3.1 <i>Gaschromatographie/Olfaktometrie</i>	14
2.3.3.2 <i>Aromawert</i>	15
2.3.4 Analyse chiraler Aromastoffe	16
2.3.4.1 <i>Bedeutung chiraler Aromastoffe</i>	16
2.3.4.2 <i>Enantioselektive Analyse mittels Kapillargaschromatographie</i>	18
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	21
<b>3.1 Material</b>	21
3.1.1 Untersuchungsmaterial	21
3.1.1.1 <i>Rhabarber</i>	21
3.1.1.2 <i>Rhabarber-Konzentrat</i>	21
3.1.1.3 <i>Kommerzielle Rhabarber-Aromen</i>	21
3.1.2 Chemikalien	21
3.1.2.1 <i>Referenzsubstanzen</i>	21
3.1.2.2 <i>Reagenzien</i>	22
3.1.2.3 <i>Synthese von Referenzsubstanzen</i>	23
3.1.2.3.1 <i>4-Methylhexanol</i>	23
3.1.2.3.2 <i>4-Methylhexansäure/(S)-4-Methylhexansäure</i>	23
<b>3.2 Methoden</b>	24
3.2.1 Isolierung und Anreicherung flüchtiger Verbindungen	24
3.2.1.1 <i>Vakuum Headspace Technik (VHS)</i>	24
3.2.1.2 <i>Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE)</i>	25

---

3.2.1.3	<i>Simultane Destillation-Extraktion (SDE)</i>	26
3.2.1.4	<i>Isolierung unter enzyminhibierenden Bedingungen</i>	27
3.2.2	Identifizierung flüchtiger Verbindungen	27
3.2.2.1	<i>Bestimmung des Retentionsindex</i>	27
3.2.3	Quantifizierung flüchtiger Verbindungen	27
3.2.3.1	<i>Bestimmung der FID Response-Faktoren</i>	28
3.2.4	Wiederfindungsversuche	29
3.2.4.1	<i>Na-citrat/HCl Pufferlösung</i>	30
3.2.4.2	<i>Methylierung von Fettsäuren</i>	30
3.2.4.3	<i>Wiederfindung von Fruchtsäuren</i>	30
3.2.5	Untersuchung flüchtiger Verbindungen kommerzieller Rhabarber-Aromen	31
3.2.6	Kapillargaschromatographie (HRGC)	31
3.2.7	Massenspektrometrie (HRGC/MS)	31
3.2.8	Sensorische Bewertung flüchtiger Verbindungen	32
3.2.8.1	<i>Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)</i>	32
3.2.8.2	<i>Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (HRGC/O)</i>	32
3.2.8.3	<i>Bestimmung der Geruchsschwellenwerte von Aromastoffen in Wasser</i>	33
3.2.8.4	<i>Sensorische Bewertung ausgewählter Rhabarberaromastoffe in wässrigen Lösungen</i>	34
3.2.9	Untersuchung chiraler Aromastoffe	34
3.2.9.1	<i>Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC)</i>	34
3.2.9.2	<i>Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen</i>	36
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolierung flüchtiger Verbindungen von Rhabarberstielen mittels VHS</b>	<b>37</b>
4.1.1	Einleitung	37
4.1.2	Isolierung flüchtiger Verbindungen mittels Vakuum Headspace Technik	37
4.1.3	Sensorische Bewertung des Vakuum Headspace Extraktes	47
4.1.4	Einfluss der enzymkatalysierten Reaktionen auf das Spektrum von C <sub>6</sub> -Verbindungen	51

---

4.1.5	Sensorische Bewertungen ausgewählter Verbindungen in wässrigen Lösungen	56
4.1.6	Zusammenfassung	58
<b>4.2</b>	<b>Einfluss anderer Isolierungsverfahren auf das Spektrum flüchtiger Verbindungen</b>	<b>60</b>
4.2.1	Einleitung	60
4.2.2	Isolierung flüchtiger Verbindungen mittels Flüssig-Flüssig Extraktion und Simultaner Destillation-Extraktion	61
4.2.3	Einfluss des Isolierungsverfahrens auf das Spektrum von C <sub>6</sub> -Verbindungen	67
4.2.4	Isolierung flüchtiger Verbindungen mittels Flüssig-Flüssig Extraktion nach Erhitzen unter Rückfluss	69
4.2.5	Zusammenfassung	74
<b>4.3</b>	<b>Flüchtige Verbindungen von Rhabarber-Konzentrat</b>	<b>75</b>
4.3.1	Einleitung	75
4.3.2	Ergebnisse und Diskussion	76
4.3.3	Zusammenfassung	83
<b>4.4</b>	<b>Flüchtige Verbindungen kommerzieller Rhabarber-Aromen</b>	<b>84</b>
4.4.1	Einleitung	84
4.4.2	Ergebnisse und Diskussion	84
<b>4.5</b>	<b>Chirale Aromastoffe in Rhabarber</b>	<b>88</b>
4.5.1	Einleitung	88
4.5.2	Kapillargaschromatographische Enantiomerentrennung methylverzweigter Verbindungen	89
4.5.3	Enantiomerenverteilung von 2- und 4-methylverzweigter Alkoholen und Säuren in den Rhabarber-Extrakten	92
4.5.4	Biogenetische Aspekte	98
4.5.5	Sensorische Aspekte	101
4.5.6	Zusammenfassung	102
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>104</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>106</b>

<b>7. ANHANG</b>	126
<b>7.1 Abkürzungverzeichnis</b>	126
<b>7.2 Wiederfindungen</b>	128
<b>LEBENS LAUF</b>	



## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Rhabarber ist eine Pflanze aus der Familie der Polygonaceae, die sowohl als Rohstoff in der Arzneimittelindustrie als auch als Lebensmittel Verwendung findet. Die getrockneten Rhizome von Medizinalrhabarber (z.B. *Rheum palmatum* L., *Rheum officinale* Baillon) werden wegen ihrer antimikrobiellen, abführenden, magenstärkenden und krampflösenden Wirkungen geschätzt [Chevallier, 1998; WHO Monographs, 1999; Rimpler, 1999]. Andere Arten (z.B. *Rheum rhabarbarum* (syn. *undulatum*) L.) werden als Gemüserhabarber gezüchtet. Die Blattstiele werden zu Marmelade, Gelee, Kompott, Saft (Konzentrat) und Wein verarbeitet und dienen als Zutaten zur Herstellung von Eis, Joghurt, Bonbons und anderen Spezialitäten [Bozsik, 1981; Treptow, 1985; Prior, 1993; Anonym, 1996 b; Wanzek, 1997; Aeppli, 1998].

Im Zuge der Synthese und sensorischen Bewertung schwefelhaltiger Aromastoffe war aufgefallen, dass bestimmte Mercaptoalkanole an den typischen Geruch frisch geschälter Rhabarberstiele erinnern [Schellenberg, 2002]. Eine Literaturrecherche zeigte, dass über die flüchtigen Verbindungen von Rhabarberstielen keine Informationen vorlagen. Es standen ausschließlich Daten über die flüchtigen Inhaltsstoffe von Rhabarberrhizomen (*Rheum palmatum* L., *Rhei sinensis radix*, *Rheum tanguticum* Maxim. ex. Balf) zur Verfügung [Frattini et al, 1974, 1976; Wang et al, 1995; Miyazawa et al, 1996]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, flüchtige Inhaltsstoffe von Rhabarberstielen zu identifizieren und zu quantifizieren.

Im Vordergrund des Interesses stand zunächst die Untersuchung sensorisch wirksamer Komponenten in frisch geschälten, ungekochten Rhabarberstielen. Zur Isolierung sollte daher eine schonende Methode eingesetzt werden, die nicht zu einer thermischen Belastung des Ausgangsmaterials führt. Die Bestimmung geruchsaktiver Inhaltsstoffe sollte mittels Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie in Verbindung mit einer Aromaextraktverdünnungsanalyse erfolgen.

Durch Einsatz der Vakuum Headspace Technik (VHS) gelang es, Extrakte zu gewinnen, die den typischen Geruch geschälter Rhabarberstiele aufwiesen. C<sub>6</sub>-Komponenten (ungesättigte Aldehyde, Alkohole und Säuren) erwiesen sich als die quantitativ und

sensorisch wichtigsten Komponenten. Es ist bekannt, dass diese Verbindungen bei der Zerstörung pflanzlichen Gewebes durch enzymkatalysierte Fragmentierung ungesättigter Fettsäuren sehr schnell gebildet werden, das originäre Spektrum jedoch durch nachfolgende Reduktionen und Isomerisierungen rasch verändert werden kann [Hatanaka, 1999; Schwab und Schreier, 2002]. Der Einfluss solcher Reaktionen auf eine "Alterung" des Aromas frisch geschälter Rhabarberstiele sollte daher untersucht werden.

Neben den C<sub>6</sub>-Komponenten wurden 2- und 4-methylverzweigte Alkohole und Säuren erstmals als charakteristische flüchtige Inhaltsstoffe von Rhabarberstielen nachgewiesen. Für die rechtliche Bewertung chiraler Aromastoffe sind umfassende Kenntnisse über die natürlich vorkommenden Enantiomerenverteilungen von entscheidender Bedeutung. Diese Wissenslücke sollte für den bisher nicht als Quelle für methylverzweigte Aromastoffe bekannten Rhabarber geschlossen werden.

Neben der VHS wurden die Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) sowie die Simultane Destillation-Extraktion (SDE) zur Isolierung flüchtiger Bestandteile von Rhabarberstielen eingesetzt. Die Anreicherung mittels SDE unter Atmosphärendruck und die Extraktion flüchtiger Verbindungen nach Kochen eines Rhabarberhomogenats unter Rückfluss sollten als Modelle zur Isolierung flüchtiger Komponenten gekochten Rhabarbers dienen.

Die Rhabarberstiele werden zu verschiedenen Produkten verarbeitet. Industriell sind die Gewinnung von Saft bzw. Konzentrat von besonderer Bedeutung. Durch Untersuchung kommerzieller Rhabarber-Konzentrate sollte der Einfluss thermischer Konzentrierungsverfahren auf das Spektrum flüchtiger Rhabarberkomponenten aufgezeigt werden.

## 2. GRUNDLAGEN

### 2.1 Rhabarber und seine Verwendung

#### *Rheum-Arten*

Rhabarber ist ein mehrjähriges Gewächs aus der Familie Polygonaceae (Knöterichgewächse). Die Pflanze nimmt eine gewisse Ausnahmestellung im Gemüsesortiment ein, da einige Arten (z.B. *Rheum palmatum* L. [Chinesischer Rhabarber], *Rheum officinale* Baill., *Rheum sinensis radix* und *Rheum tanguticum*) als Medizinalrhabarber, andere [*Rheum rhabarbarum* (syn. *undulatum*) L. (Gartenrhabarber bzw. Krauser oder Wellblattrhabarber)] als Gemüserhabarber verwendet werden. *Rheum rhaponticum* L. (Rhapontik, Sibirischer Rhabarber) wird sowohl als Lebensmittel als auch als Rohstoff in der Arzneimittelindustrie eingesetzt.

Die getrockneten Rhizome von Medizinalrhabarber dienen in Form von Extrakten, Tinkturen, Tabletten oder Pulvern als Arzneimittel [Treptow, 1985; Chevallier, 1998; Tschümperlin, 1998]. Die wirksamen Inhaltsstoffe des Wurzelstocks sind freie oder an  $\beta$ -D-Glucose gebundene Antrachinon-Derivate (z.B. Rheum-emodin, Aloe-emodin, Rhein, Crysophanol, Reocrysidin, Physcion), Gerbstoffe (Rhatannin) sowie Phenylbutanon-Derivate (Lyndein, Isolyndein). Sie besitzen antimikrobielle, abführende, magenstärkende und krampflösende Wirkungen [Chevallier, 1998; WHO Monographs, 1999; Rimpler, 1999; Paneitz und Westendorf, 1999; Agarwal et al, 2001; Bown, 2002; Shang und Yuan, 2003]. Bestimmte Inhaltsstoffe der Rhizome, z.B. Emodin, Stilbene oder Galloylester weisen enzyminhibierende Effekte auf [Yim et al, 1999; Aburjai, 2000; Abe et al, 2000]. Die Inhaltsstoffe des Wurzelstocks haben einen bitteren, herben Geschmack sowie einen aromatischen Geruch. Sie werden in der Aromaindustrie zu Herstellung alkoholischer Getränke, Sirupe oder Liköre verwendet [Burdock, 1995]. Die Antrachinon-Inhaltsstoffe des Wurzelstocks sind auch zum Färben von Textilien (gelbe und orange Farbtöne) geeignet [Schweppe, 1994].

Als Gemüse wird Rhabarber in Europa erst seit dem 18. Jahrhundert verwendet [Krug, 1991; Vogel, 1996]. Die Blattstiele, die einen frischen, obstähnlichen Geschmack besitzen, werden überwiegend in blanchiertem oder gekochtem Zustand verzehrt. Die Blätter sollten wegen ihres hohen Gehalts an Oxalsäure und Antrachinonen nicht gegessen werden; ihr

Verzehr kann zu schweren Vergiftungen führen [Askar und Morad, 1980; Füllgraf, 1989, Gloxhuber, 1994; Paneizt und Westendorf, 1999; Noonan und Savage, 1999].

#### *Inhaltsstoffe von Gemüserhabarber*

Die Blattstiele enthalten in 100 g eßbarer Substanz durchschnittlich 92.7 g Wasser, 0.6 g Proteine, 0.14 g Fett, 1.36 g Kohlenhydrate, 3.2 g Ballaststoffe, 0.64 g Mineralstoffe, einige Vitamine und Spurenelemente [Souci et al, 2000]. Einen ausführlichen Überblick über die Inhaltsstoffe von Rhabarber findet man in den Arbeiten von Hermann (1996, 2001).

In wesentlichen Mengen in Rhabarberstielen vorkommende Mineralstoffe sind K, Ca, P, Mg und Fe. Der Calcium-Gehalt ist hoch, durch die Anwesenheit von Oxalsäure (Bildung von wasserunlöslichem Ca-oxalat) ist die Verwertbarkeit jedoch schlecht. Untersuchungen bei 22-45-jährigen Frauen zeigten, dass die Ca-Absorption aus Gemüsepflanzen (z.B. Rhabarber, Spinat, Süßkartoffel) invers korreliert ist mit dem Oxalsäure-Gehalt der Pflanzen [Weaver et al, 1997]. Im Vergleich zur Milch lag die Ca-Absorption aus Rhabarber bei 24 %.

Die Gehalte an Vitaminen liegen in den gleichen Größenordnungen wie sie in anderen Gemüsearten zu beobachten sind. In größerer Menge kommt Vitamin C vor; daneben sind die Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, E und K enthalten. Aus der Klasse der Carotinoide konnten Lutein, Violaxanthin,  $\beta$ -Carotin, Antheraxanthin,  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxantin und  $\alpha$ -Cryptoxanthin nachgewiesen werden [Müller, 1997].

Im Rhabarber bilden Äpfelsäure und Oxalsäure die Hauptsäuren; daneben sind Zitronensäure, Essigsäure, Kaffesäure und p-Cumarsäure enthalten [Souci et al, 2000]. Im Spurenbereich wurden in drei Sorten Isocitronensäure, Bernsteinsäure sowie Fumarsäure und Malonsäure gefunden [Tarrach und Hermann, 1985]. Rotfleischige Sorten enthalten weniger Fruchtsäuren als die grünlischigen [Vogel, 1996]. Der fruchtige-saure Geschmack von Rhabarber wird auf die Fruchtsäuren in Verbindung mit dem Zuckergehalt zurückgeführt. Derndorfer und Elmadfa (2000) berichteten über den Einfluss von Oxalsäure auf sensorische Merkmale von Rhabarber. Rhabarberstiele wurden mit einem Zusatz von 8,33 g Zucker/100 g Rhabarber in gekochtem Zustand sensorisch bewertet. Sensorische Merkmale, wie adstringierend, unangenehm-herb, scharf-aufreizend (Mundgefühl-Merkmale) und sauer (Nachgeschmack-Merkmal) zeigten eine signifikante Abhängigkeit vom Oxalatgehalt.

Rhabarber besitzt einen hohen Gehalt an Oxalsäure. Nach *Souci et al (2000)* sind von 460 (290-640) mg Oxalsäure, die in 100g essbarem Anteil von Rhabarber enthalten sind, 270 mg (180-350) wasserlöslich. *Rumpunen und Henriksen (1999)* haben 71 Gemüserhabarbersorten miteinander verglichen. Der Gehalt an Oxalsäure (gesamt) lag zwischen 3,2 und 9,2 %, wobei der Gehalt an wasserlöslicher Oxalsäure 1,6-6,0 % betrug (die Trockenmasse variierte zwischen 4,6 und 9,4 %). Der Gehalt an Oxalsäure steigt von der Spitze der Blattstiele zur Basis und variiert in Abhängigkeit von der Sorte sowie vom Alter. Er liegt deshalb im Spätsommer, wenn ältere Stiele geerntet werden, im oberen Bereich der durchschnittlichen Spanne [*Krug, 1991*].

Oxalsäure ist ein normales Stoffwechselprodukt und wird im Harn täglich in Mengen von 10-40 mg ausgeschieden [*Gloxhuber, 1994; Noonan und Savage, 1999*]. Erhöhte Aufnahme an Oxalsäure kann zu unerwünschten Wirkungen führen. Die zweibasige Säure bildet mit Calciumionen ein schwerlösliches Salz, was zu einer Störung des Calciumstoffwechsels führen kann. Bei Aufnahme grösserer Mengen kommt es zur Kristallisation von Calciumoxalat in den Nierentubuli und deren Zerstörung [*Füllgraf, 1989; Gloxhuber, 1994; Marquardt, 1994; Noonan und Savage, 1999*]. In Rhabarber liegt mehr als die Hälfte der Oxalsäure in gebundener Form vor [*Blundstone und Dickinson, 1964*]. Physiologisch wirksam ist nur die lösliche Oxalsäure, die calciumzehrend ist. Bei starkem Rhabarberverzehr sollte deshalb die Calciumzufuhr durch Kombination mit calciumreichen Lebensmitteln (Milch, Joghurt, Quark, Vollkornbrot) erhöht werden. Die Menge an Oxalsäure kann durch Einweichen, Blanchieren oder Kochen reduziert werden, wenn das Wasser weggegossen wird, da etwa 70 % der wasserlöslichen Oxalsäure und 20 % der als Oxalat gebundenen Oxalsäure durch Erhitzen ins Kochwasser übergehen [*Savage et al, 2000*].

Oxalsäure spielt eine Rolle bei der Hemmung der enzymatischen Bräunung, wie von *Oszmianski et al (1995)* und *Son et al (2000)* für Apfelprodukte gezeigt. Entsprechend konnten durch Zugabe von Rhabarbersaft zu Apfelmark oder zu Apfelscheiben die enzymatische Oxidation blockiert und die Phenole sowie die Farbe vor Degeneration und Bräunung geschützt werden. Eine Zugabe von 5 % Rhabarbersaft zu Karottensaft führte zu einer intensiveren und besseren Farbe als bei den Kontrollproben [*Oszmianski und Górski, 2002*].

Der Zuckergehalt von Rhabarber ist gering; er liegt bei etwa 1 % des eßbaren Anteils. Glucose, Saccharose und Fructose sind die Hauptvertreter dieser Stoffklasse. Neben den

Hydroxymizsäure- und Hydroxybenzoesäure-Verbindungen wurden Flavonolglykoside (Quercetin-3-glucosid, Quercetin-3-rhamnosid, Quercetin-3-rutinosid sowie Anthocyanine (Cyanidin-3-glucosid, Cyanidin-3-rutinosid) als Farbstoffe in Rhabarberstielen nachgewiesen [Mazza und Miniati, 1993; Hermann, 1996]. Bei den Ballaststoffen sind Pektine, Cellulose, Hemicellulose und Lignin erwähnenswert [Vollendorf und Marlett, 1993; Hermann, 1996]. Nach Goel et al (1997) reduzieren die Ballaststoffe der Stiele den Gehalt an Cholesterol in Blut. Bei Hypercholesterin-Patienten, die täglich 27 g eines Pulvers getrockneten Rhabarbers verzehrten, wurde eine Senkung des Gesamtgehaltes an Cholesterol und insbesondere des LDL-Cholesterolspiegels beobachtet.

#### *Wirtschaftliche Bedeutung*

Rhabarber ist in vielen Ländern (USA, England, Holland, Frankreich, Belgien, Deutschland, Österreich, Australien, Neuseeland und Kanada) von wirtschaftlicher Bedeutung [Snowdon, 1991; Foust und Marshall, 1991]. In Deutschland betrug die Anbaufläche 1996 über 350 ha; die gesamte Jahresproduktion lag bei etwa 8000 t [Anonym, 1996 a]. Etwa 30-40 % der Ernte werden verarbeitet [Behr, 1991]. Exportorientierter Rhabarbererwerb findet in Holland, Frankreich, Belgien und Deutschland statt [Krug, 1991; Vogel, 1996].

Die Rhabarbersorten unterscheiden sich in der Tiefe und Dauer der Knospenruhe und damit in der Frühzeitigkeit des Austriebs, in der Form und Dicke sowie in der Farbe von Stiel und Fleisch. Je nachdem, ob die Sorten für die Marktbelieferung während der Saison, für die industrielle Verarbeitung oder für die Treiberei vorgesehen sind, werden unterschiedliche Sorteneigenschaften verlangt. Bevorzugte Sorteneigenschaften sind: langer, möglichst runder, wenig faseriger Stiel; guter Geschmack; kräftige rote Farbe; hoher Flächenertrag; Virusfreiheit [Diener, 1997]. Es werden drei Sortentypen unterschieden: grünstielig-rotfleischig, rotstielig-grünfleischig und rotstielig-rotfleischig. Der grünstielig-grünfleischige Rhabarber liefert den größeren Ertrag, hat aber den höchsten Säuregehalt. Rotstielige Pflanzen mit grünlichem Fleisch sind weniger herb. Der rotstielig-rotfleischige Typ, der oft Erdbeerrhabarber genannt wird, hat einen milden Geschmack mit einer Erdbeer-Himbeeraromanote [Anonym, 1996 b].

Für die industrielle Verarbeitung, bei der eine kräftige Stielausbildung erwünscht ist, eignen sich besonders die Goliath-Typen. Für die Freilandernnte eignen sich die Frambozen-Rood-Typen. Diese Typen liefern zwar geringere Erträge als die Goliath-

Typen, sie besitzen jedoch einen besseren Geschmack und eine kräftigere rote Farbe [Diener, 1997]. Für Konserven sind die Sorten Champagne, Sutton, Albert und Timperly am besten geeignet [Burrows, 2001].

#### *Verwendung von Gemüserhabarber*

Rhabarber kann eine Woche (Treibrhabarber) bzw. 2-4 Wochen (Freilandernte) gelagert werden, wofür eine schnelle Vorkühlung (innerhalb eines Tages auf  $<1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sowie  $0-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  Lagertemperatur und 95-100 % Luftfeuchtigkeit erforderlich sind [Snowdon, 1991; Böttcher, 1996].

Die Blattstiele werden zu Marmelade, Gelee, Kompott, Saft und Wein verarbeitet. Sie dienen als Zutaten zur Herstellung von Eis, Joghurt, Bonbons und anderen Spezialitäten [Bozsik, 1981; Treptow, 1985; Prior, 1993; Anonym, 1996 b; Wanzek, 1997; Aepli, 1998]. Industriell sind die Gewinnung von Saft bzw. Konzentrat von besonderer Bedeutung, gefolgt von der Herstellung von Marmelade und Kompott als Konservenerzeugnis. Rhabarber ist auch tiefgefroren sowie als Instantprodukt (z.B. Rhabarber-Instantgetränk) erhältlich.

Als Konservenerzeugnis wird er gesüsst und im Einmachglas oder Blechdosen verpackt. Bei der Konservierung von Rhabarber werden wegen seiner korrosiven Eigenschaften innen lackierte Blechdosen verwendet. Bei der Verarbeitung zu Kompott werden die Stiele in etwa 25 mm Stücke geschnitten, gewaschen und ausgelesen. Nach kurzem Vorkochen werden die Stücke mit Zuckerlösung aufgefüllt, (eventuell nach Zusatz von Farbstoffen) abgepackt und pasteurisiert. Die Haltbarkeit solcher Produkte beträgt 6-9 Monate [Burrows, 2001].

Tiefkühlung von Rhabarber verlangt keine spezielle Aufarbeitung. Er kann in roher oder in blanchierter Form mit oder ohne Verwendung von Zucker eingefroren werden. Die Lagertemperatur liegt bei  $-18^{\circ}\text{C}$ . Bei Lagerung über 6 Monaten wird immer ein Blanchierschritt vorgeschaltet [Stoll, 1970; Treptow, 1985; Reid, 1999].

Zur Herstellung von Rhabarbersaft werden die Stiele nach dem Waschen zerkleinert und gepresst. Der Saft wird entpektinisiert und die Oxalsäure nach Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  als Calciumoxalat entfernt. Konzentrat wird auf ähnliche Weise hergestellt, wobei der Saft nach der Entpektinisierung und Entfernung der Oxalsäure konzentriert wird [Treptow, 1985].

## 2.2 Aromastoffe

Unter dem Begriff "Aroma" (englische Bezeichnung "Flavour") versteht man den Gesamtsinnesindruck aus Geruchs- und Geschmacksempfindungen, der beim Verzehr eines Lebensmittels entsteht [Schreier und Mosandl, 1985].

Dieser Eindruck ist das Ergebnis einer direkten Wechselwirkung chemischer Verbindungen mit den peripheren Rezeptorsystemen. Aufgrund der biomolekularen Reizauslösung, die zwischen Stimulus und Rezeptormolekül stattfindet, werden Geruch und Geschmack als chemischer Sinn bezeichnet. Sie sind die wichtigsten Sinnesmodalitäten des komplexen Oro-nasofazial Sinns (mit Sensoren in Mund, Nase und Gesichtshaut bzw. Mundschleimhaut), die man zur Beurteilung eines Lebensmittels benutzt. Geruch und Geschmack sind miteinander verknüpft, da man in den Mund gebrachte Nahrung nicht nur hinsichtlich ihres Geschmacks, sondern vor allem auch hinsichtlich ihres Geruchs als angenehm oder unangenehm empfindet [Plattig, 1995]. Die retronasale Wahrnehmung spielt hierbei eine entscheidende Rolle, wenn die freigesetzten Riechstoffmoleküle des Mundinhalts beim Verzehr (Kauen, Schlucken) die Riechzellen der Riechregion ("Regio olfactoria") in der Nasenhöhle über den Rachen durch die Choanen erreichen. Heutzutage ist man in der Lage, die Aromafreisetzung während des Verzehrs des Lebensmittels mittels massenspektrometrischer Methoden *in vivo* zu untersuchen, wobei zur Analyse der Atemluft durch die Nase indirekte (Anreicherung durch Verwendung von Adsorbentien oder Membranen; z. B. EXOM-Technik) und direkte (z.B. API-MS, PTR-MS) Techniken eingesetzt werden [Taylor und Linforth, 2000; Büttner und Schieberle, 2000]. Mit Hilfe einer dynamischen Röntgentechnik (Videofluoroskopie) ist es neuerdings möglich, den Ablauf des Aromatransfers vom Mundraum in den Nasenraum beim Verzehrsvorgang zu beobachten. Es wurde gezeigt, dass die retronasale Wahrnehmung von physiologischen Barrieren beeinflusst wird, die nur zu bestimmten Zeiten einen ungehinderten Zugang von Aromastoffen aus der Mundhöhle in den Nasenraum erlauben und deren Bildung von der Lebensmittelkonzistenz sowie von der Menge des Lebensmittels im Mund abhängt [Büttner et al, 2001]. Außerdem wiesen Untersuchungen darauf hin, dass während des Verzehrprozesses eine Adsorption von Aromastoffen an die Mundschleimhaut stattfindet, die ebenfalls einen Einfluss auf die retronasale Wahrnehmung hat [Büttner und Schieberle, 2000; Büttner et al, 2002; Büttner, 2003]. Geruchsempfindungen von Aromastoffen werden auch beim Einatmen (normale



Ruheatmung) und beim Schnüffeln (beschleunigte Ein- und Ausatemstöße) durch die Nase vor dem Verzehr eines Lebensmittel ausgelöst. In diesem Fall spricht man von orthonasaler Wahrnehmung [Plattig, 1987; Ohloff, 1990; Plattig, 1995].

Nach heutigen Erkenntnissen findet bei der Wahrnehmung die Reizauslösung durch direkten Kontakt eines Geruchsstoffes (Stimulus) mit dem 7-TM (Transportmembran)-G-Rezeptorprotein der Rezeptormembran statt. Der reversible Komplex (vermutlich durch Bindungsproteine) bewirkt eine Aktivierung des GTP (Guanidin-Triphosphat)-Bindungsproteins ( $G_0$ ) [first Messenger] und löst eine Kaskade von Enzymreaktionen aus. Es wird ATP (Adenosin-5'-triphosphat) in cAMP (cyclisches Adenosin 3',5'-monophosphat) umgesetzt [second Messenger]. Durch cAMP wird die Permeabilität der olfaktometrischen Zellmembran verändert, die zu einem veränderten  $Na^+K^+$ -Ionentausch und dadurch zur Potentialdifferenz zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum der Membran (Sensor- bzw. Reizfolgepotential) führt. Dieses Potenzial trägt die Riechinformation zum Gehirn und wird in der Erregungstransformation an die höheren Zentren des Nervensystems übermittelt, entschlüsselt und schließlich in Geruchsempfindungen transformiert. Bei der Verarbeitung der Geruchsinformationen wird den zwei Organen des limbischen Systems, Amigdal (Affekten und Emotionen) und Hippokampus (Gedächtnis), Bedeutung zugesprochen [Herman, 2002].

Die am "Aroma" beteiligten Verbindungen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Geschmacksstoffe und Geruchsstoffe (Aromastoffe). Es gibt auch Verbindungen, die sowohl auf den Geschmacks- als auch auf den Geruchssinn wirken. Klassische Beispiele sind (-)-Menthol in Pfefferminze ("kühlend"), Allicin in Knoblauch ("brennend") oder Piperin und seine Isomere in Pfeffer ("scharf") [Ney, 1987; Lawless und Lee, 1993]. Van Beek et al (1990) haben in Wurzeln von Chicorée bitterschmeckende Sesquiterpen-Lactone nachgewiesen. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch Maillard-Verbindungen, wie die in Biermalz identifizierten 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on, 5-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on und 2,5-Dimethyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3(2H)-furanon einen intensiven Kühleffekt hervorrufen können [Ottinger et al, 2001].

Aromastoffe sind flüchtige Verbindungen, die aus verschiedenen Stoffklassen stammen; sie liegen in Lebensmitteln in einem weiten Konzentrationbereich (ppm-ppt) vor. Man weiss aus zahlreichen Studien, dass für das Aroma eines Naturstoffes ein komplexes Vielstoffgemisch verantwortlich ist. Ein Aroma besteht durchschnittlich aus 200 bis 400 Einzelkomponenten, in Ausnahmefällen sind es über 700 [Matheis, 1991]. Von den

beteiligten Komponenten tragen aber nur einige entscheidend zum Aroma eines Lebensmittels bei. Beispielsweise wurden in Yoghurt 91 Verbindungen identifiziert, von denen 21 als wesentliche Aromastoffe festgestellt wurden [Ott et al, 1997]. Unter den im Reiskuchen nachgewiesenen 65 flüchtigen Verbindungen zeigten sich 10 Komponenten als wichtig für das Aroma [Buttery et al, 1999 a]. In frisch destillierten Calvados-Proben verschiedener Qualität wurden insgesamt 120 Verbindungen identifiziert. Die sensorische Analyse dieser Produkte zeigte die Anwesenheit von 71 aromaaktiven Verbindungen, von denen 19 als typische Calvados-Marker festgestellt wurden [Guichard et al, 2003; Ledauphin et al, 2003]. Als Schlüsselaromastoffe (“character impact compounds”) werden diejenigen Aromastoffe bezeichnet, die das charakteristische Aroma eines Lebensmittel prägen. Beispiele sind (Z)-3-Hexenal in Tomaten [Buttery, 1993], 2-sec-Butyl-3-Methoxypyrazin in rohen Karotten [Cronin und Stanton, 1976] oder 1-p-Menthen-8-thiol in Grapefruit [Demole et al, 1982]. Eine ausführliche Zusammenstellung von Schlüsselaromastoffen findet sich in der Übersicht von McGorin (2002).

Bei den Aromastoffen unterscheidet man zwischen natürlichen, naturidentischen und künstlichen Aromastoffen. Die “natürlichen” Aromastoffe, die nur in beschränkter Menge zur Verfügung stehen, dürfen ausschließlich durch physikalische (z.B. Extraktion oder Destillation), mikrobiologische (z. B. Fermentation) oder enzymatische Verfahren aus geeigneten natürlichen Ausgangsmaterialien pflanzlichen oder tierischen Ursprungs gewonnen werden [EG-Aromen-Richtlinie, 1988]. Aromastoffe können auch synthetisch hergestellt und als sogenannte “naturidentische” bzw. “künstliche” Aromastoffe in der Lebensmittelproduktion eingesetzt werden. Gegenwärtig sind etwa 6400 natürliche und ca. 10000 synthetische Aromastoffe bekannt [Krings und Berger, 1998].

Zwischen natürlichen und synthetischen Aromastoffen bestehen beachtliche Preisunterschiede. Manley (2000) zeigte, dass natürliches Ethylacetat 7 \$/kg, dagegen synthetisch hergestelltes nur 1,60 \$/kg kostet. Einen noch größeren Unterschied gibt es z.B. bei (Z)-3-Hexenol (67 \$/kg synthetischer Herkunft und 1325 \$/kg natürlicher Herkunft) und bei 1-Octen-3-ol (102 \$/kg gegenüber 8250 \$/kg). Der zunehmende Bedarf an natürlichen Aromastoffen und ihre begrenzte Verfügbarkeit haben das Interesse an der Aromastoffbildung (biogenetisch und nicht-enzymatisch) und an biotechnologischen Produktionsverfahren (mikrobiologisch und enzymatisch) weiter gesteigert [Krings und Berger, 1994; Krings und Berger, 1998; Manley, 2000].

Nach Art der Bildung können Bestandteile pflanzlicher Aromen in “primäre” und “sekundäre” Aromastoffe unterteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet die Substanzen, die im Rahmen des Stoffwechsels der lebenden Pflanze im intakten Gewebe vorliegen. Besonders reichlich finden sie sich in Früchten und Gewürzen. Im Gegensatz dazu entstehen sekundäre Aromastoffe aus nicht-flüchtigen Vorstufen, wobei enzymatische, oxidative und thermische Reaktionen beteiligt sein können [Drawert, 1975; Matheis, 1991]. So führt die enzymatisch-oxidative Spaltung ungesättigter Fettsäuren nach Zerstörung des Gewebes (z.B. durch Zerkleinerung) zu aromaintensiven C<sub>6</sub>-, C<sub>8</sub>-, C<sub>9</sub>-Aldehyden und -Alkoholen in vielen Lebensmitteln, wie z. B. in Tomaten, Weintrauben, Pilzen und Äpfeln [Tressl et al, 1981; Hsieh, 1994; Hatanaka, 1999]. Für die enzymatische Spaltung von Glucosinolaten, die praktisch in allen Brassicaceen vorkommen, sind die Myrosinasen (Thioglucosidasen) verantwortlich. Beim Zerkleinern des Gewebes werden die Glucosinolate enzymatisch zu Isothiocyanaten, Thiocyanaten und Nitrilen abgebaut [Chase, 1974; Takeoka, 1999; Mitchen, 2001]. Glykoside stellen eine wichtige Gruppe nichtflüchtiger Vorstufen von Aromastoffen dar, deren Vorkommen ausführlich von Williams et al (1993) und Winterhalter und Skoroumounis (1997) zusammengefasst wurde. Bekannte Beispiele für Aromastoffe, die durch enzymatische Hydrolyse aus Glycosiden freigesetzt werden, sind 2-Methylbutanol, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Geraniol, Linalool und Linalooloxid [Leahy et al, 1999]. Typische Vertreter für den Kochgeruch eines Lebensmittel sind Furan- und Pyrandervative, die ebenfalls als sekundäre Aromastoffe anzusehen sind. Sie gehen aus der Maillard-Reaktion von Kohlenhydraten und Aminosäuren bei Anwendung höherer Temperaturen im Zuge der Lebensmittelherstellung (Backen, Braten, Rösten) hervor [Ho, 1996; Kerler und Winkel, 2001].

Die Bildung sekundärer Aromastoffe führt dazu, dass sich das originäre Aromaspektrum eines Rohmaterials und das Spektrum des verarbeiteten Produktes aufgrund technologischer Behandlungen deutlich unterscheiden können [Takeoka et al, 1990; Karmas et al, 1994; Chen et al, 1998; Cremer und Eichner, 2000; Wang et al, 2000, 2001].

## 2.3 Aromaanalytik

Die Untersuchung des Aromas eines Lebensmittels erfolgt schrittweise mit Hilfe analytischer und sensorischer Methoden. Am Anfang steht die Probenaufarbeitung, d.h. die Isolierung und Abtrennung der Aromakomponenten von weiteren Lebensmittelbestandteilen (z.B. Fetten, Kohlenhydraten, Proteinen). In der Regel schließen sich eine Anreicherung der Aromastoffe durch Konzentrieren und eine Vortrennung der erhaltenen Aromaextrakte an. Nach der Identifizierung und Quantifizierung der Komponenten können Untersuchungen zur Erkennung sensorisch aktiver Aromastoffe eingesetzt werden.

### 2.3.1 Isolierung und Anreicherung flüchtiger Verbindungen

Zur Isolierung flüchtiger Verbindungen aus Naturprodukten stehen eine Reihe unterschiedlicher Verfahren und apparativer Systeme zur Verfügung. Vorteile und Nachteile der verschiedenen Techniken sind in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst worden [Teranishi und Kint, 1993; Buttery und Ling, 1996; Werkhoff et al, 1998; Peppard, 1999; Sides et al, 2000]. Diese Arbeiten zeigen, dass es kein universelles Isolierungsverfahren gibt, das für alle Lebensmittel anwendbar ist. Eine wichtige Forderung ist, dass der erhaltene Extrakt die typischen Geruchs- und Geschmacksmerkmale der untersuchten Probe wiedergeben sollte. Darüberhinaus sollte die Isolierungsmethode eine quantitative Erfassung flüchtiger Verbindungen erlauben, möglichst keine Veränderungen in der originären Zusammensetzung des Naturproduktes verursachen und reproduzierbare Aufarbeitungen ermöglichen. Die Wahl einer optimalen und zuverlässigen Probenaufarbeitung ist abhängig vom Untersuchungsmaterial (Matrix der Probe, Typ und Eigenschaften der flüchtigen Verbindungen der Probe) sowie vom Ziel der Untersuchung (qualitative oder quantitative Bestimmung). In zahlreichen Studien sind bei unterschiedlichen Matrices angewandte Isolierungsmethoden verglichen worden, z. B. bei Dill [Huopalahti et al, 1981], Kiwi-Blüte [Tatsuka et al, 1990], Parmesan-Käse [Careri et al, 1994], Propolis [Bracho et al, 1996], Cola-Getränk [Elmore et al, 1997] und Austern [Pennarun et al, 2002]. Diese Beispiele demonstrieren, dass die eingesetzte Technik sowohl die qualitative als auch die quantitative Zusammensetzung der erhaltenen Extrakte beeinflusst. Oft ist es nötig, unterschiedliche Aufarbeitungstechniken parallel einzusetzen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Viele Arbeitsgruppen haben die

unterschiedlichen Techniken anhand von Modell-Lösungen hinsichtlich Genauigkeit, Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit bewertet [Jennings und Filsoof, 1977; Schultz et al, 1977; Leahy und Reineccius, 1984; Prost et al, 1993; Siegmund et al, 1996; Buchgraber und Ulberth, 1999].

Die Simultane Destillation-Extraktion, die Festphasen-(mikro)extraktion, die Headspace-Techniken (dynamisch, Vakuum) und die Hochdruckextraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub> haben sich als wichtigste Methoden bewährt [Werkhoff, 1999; Peppard, 1999; Sides et al, 2000]. Eine neuere Entwicklung, die sich ebenfalls als vorteilhaft zur schonenden Isolierung flüchtiger Verbindungen erwiesen hat, ist die SAFE (Solvent Assisted Flavour Evaporation)-Methode [Engel et al, 1999]. Sie basiert auf der Destillation im Hochvakuum bei niedriger Temperatur. Die Verdampfung findet in einer speziellen Apparatur (BÆNG) statt.

Nach der Abtrennung flüchtiger Komponenten von der Lebensmittelmatrix kann der Extrakt durch Einengen oder Fraktionierung weiter angereichert werden. Adsorptionschromatographie oder präparative Kapillargaschromatographie sind dabei die wichtigsten Verfahren [Guth, 1997; Werkhoff et al, 1998; Tairu et al, 1999; Kumazawa und Masuda, 2001].

### 2.3.2 Identifizierung und Quantifizierung flüchtiger Verbindungen

Nach der Herstellung eines repräsentativen Extraktes werden die Bestandteile mit instrumentellen Techniken analysiert. Die wichtigsten Methoden wurden u.a. von Mussinan (1993), Werkhoff (1999), Peppard (1999), Sides et al (2000) und Reineccius (2001) zusammengefasst. Das bedeutendste und leistungsfähigste Trennverfahren stellt die Gaschromatographie dar. Der Vorteil der Kapillargaschromatographie liegt einerseits in der hohen Empfindlichkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit sowie in der einfachen Detektion, die unselektiv (FID) oder selektiv (ECD) sein kann. Zum anderen ermöglicht diese Methode eine schnelle Analyse (durchschnittlich 20-50 Min), den Aufbau multidimensionaler Chromatographiesysteme sowie Kopplungen zu spektroskopischen und spektrometrischen Techniken [Lehotay und Hajslová, 2002; Schurig, 2002]. Analytisch wichtige Kopplungen der Kapillargaschromatographie bestehen in der Anwendung der Massenspektrometrie (GC-MS) und Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (GC-FTIR) bzw. in der Kombination dieser Techniken (GC-FTIR-MS) [Sasaki und Wilkins,

1999; Ragunathan et al, 1999; Careri und Mangia, 2001], die strukturspezifische Aussagen über die einzelnen Verbindungen liefern. Zur Identifizierung einer Substanz dienen chromatographische (Retentionsindex) und strukturspezifische Informationen (MS/IR-Spektren). Um sichere Ergebnisse zu erhalten, ist dabei ein Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen notwendig. Bei völlig unbekanntem Aromastoffen ist eine Strukturaufklärung erforderlich; hierbei erwies sich die Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Technik) als die Methode der Wahl [Martin et al, 1999]. Die Kopplung Kapillargaschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie (GC-IRMS) hat sich in der herkunftsspezifischen Aromaanalytik bewährt [Meier-Augenstein, 1999; Mosandl, 1999]. Bei der Untersuchung flüchtiger Bestandteile eines Lebensmittels ist nicht nur die Identifizierung, sondern auch die Quantifizierung der Komponenten von Bedeutung. Wichtige Parameter bei der Quantifizierung sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Analysenverfahrens [Hädlich und Vogelsang, 1999 a,b]. Quantitative Analysen können bei optimaler gaschromatographischer Trennung der Substanzen mit Hilfe von unselektiven oder selektiven Detektoren (z.B. Flammenionisationsdetektor (FID) bzw. Flammenphotometrischen Detektor (FPD)), durchgeführt werden. Bei der Quantifizierung mit Hilfe des internen Standards ist die Wahl der Substanz von großer Bedeutung, die von der Lebensmittelmatrix und der Isolierungstechnik abhängig ist [Gottwald, 1995; Peppard, 1999; Sides et al, 2000]. Für die exakte quantitative Analyse von labilen und in Spuren vorkommenden Aromastoffen in Lebensmitteln ist die Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) die beste Methode. In mehreren Übersichtsartikeln [Schieberle, 1995; Milo und Blank, 1998; Blank et al, 1999] werden die Möglichkeiten und Grenzen dieser Technik diskutiert, wobei als interne Standards isotope markierte Substanzen (stabil oder radioaktiv) eingesetzt werden. Obwohl immer mehr isotope markierte Verbindungen kommerziell erhältlich sind, ist die langsame Verbreitung in der Aromaanalytik u.a. auf die zeit- und kostenaufwendige Synthese solcher Standardsubstanzen zurückzuführen.

### 2.3.3 Sensorische Bewertung flüchtiger Verbindungen

#### 2.3.3.1 Gaschromatographie/Olfaktometrie

Durch Kombination einer instrumentell-analytischen und sensorischen Methode, der Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O), ist man heute in der Lage, aromarelevante Verbindungen aus einer Vielzahl flüchtiger Inhaltsstoffe herauszufinden. Bei diesem

Verfahren werden die einzelnen Aromakomponenten nach ihrer kapillargaschromatographischen Auftrennung am Ende der Trennkapillare (Sniffing-Port) sensorisch beurteilt. Dabei wird der Aromaextrakt schrittweise mit Lösungsmittel verdünnt und auf den jeweiligen Verdünnungsstufen analysiert. Durch die fortschreitende Verdünnung werden einzelne Aromastoffe in ihrer Konzentration bis unter ihre Geruchsschwelle abgesenkt, so dass sie nicht mehr wahrgenommen werden können. Zwei Methoden wurden auf diesen Prinzip beruhend entwickelt: die Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) und die CHARM-Analyse. Bei der von *Ullrich und Grosch (1987)* entwickelten AEVA werden die Lösungen des schrittweise verdünnten Aromaextraktes abgerochen und die Geruchseindrücke beschrieben. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch eine Substanz wahrgenommen werden kann, gibt ihren FD-Faktor (Flavour Dilution Factor) an. Bei der von *Acree et al (1984)* entwickelten CHARM-Analyse (Combined Hedonic Response Measurement) werden die Lösungen des schrittweise verdünnten Aromaextraktes analog zur AEVA abgerochen, jedoch nicht nur die Qualität, sondern auch die Dauer jedes Geruchseindrucks berücksichtigt. Die Ergebnisse der AEVA-Analyse und CHARM-Analyse können als Diagramm (FD- oder CHARM-Chromatogramm) dargestellt werden, wobei die Werte (FD-Faktor oder CHARM-Werte) gegen die Retentionszeiten bzw. die Retentionsindices aufgetragen werden.

### 2.3.3.2 Aromawert

Auf der Basis des Aromawertes (Quotient aus der Konzentration einer Verbindung im vorliegenden Lebensmittel und ihrer Geruchsschwelle [*Rothe und Thomas, 1963; Guadagni et al, 1966*]) ist eine Abgrenzung aromarelevanter Substanzen von den zahlreichen flüchtigen Verbindungen eines Lebensmittels möglich. Von der Vielzahl der Verbindungen werden diejenigen als für das Aroma bedeutsam erachtet, deren Konzentration im Lebensmittel höher liegt als die Geruchsschwelle (d.h. Aromawert  $> 1$ ). Als Geruchsschwelle wird die Konzentration einer Verbindung bezeichnet, die gerade noch zur Erkennung ihres Geruches ausreicht. Die Geruchsschwelle eines Aromastoffs wird von vielen Faktoren beeinflusst, z.B. durch das verwendete Medium, in dem seine Bestimmung erfolgt, durch die Bedingungen des Bestimmungsverfahrens (z.B. Temperatur, Lichtverhältnis, Belüftung von Sensorikraum), durch die Empfindlichkeit der Prüfperson sowie durch die Bestimmungsmethode [*Ohloff, 1990; Molnár, 1991; Van*

*Toller, 1993; Buttery, 1999 b*]. Deshalb ist es nachvollziehbar, dass die für eine Substanz in der Literatur angegebenen Geruchsschwellenwerte eine breite Spanne umfassen können. Dies wird in der Zusammenstellung von *Rychlik et al (1998)* deutlich. Die Bedeutung und die Problematik der Geruchsschwellenwerte in der Aromaanalytik wurden von *Buttery (1999 b)* ausführlich diskutiert.

Zum Aroma eines Lebensmittels können auch Verbindungen mit einem Aromawert  $< 1$  einen Beitrag leisten. Der Grund dafür sind synergistische oder antagonistische Effekte in der Lebensmittelmatrix, die beim Aromawertkonzept nicht berücksichtigt werden [*Grosch, 1990*]. Um solche Phänomene zu erkennen und den Beitrag aromaaktiver Substanzen zu prüfen, werden Modellversuche zur Rekombination des Aromas mit den beteiligten Aromastoffen (Zusatz- bzw. Weglassversuche) durchgeführt [*Grosch, 2001; Büttner und Schieberle, 2001; Hofmann et al, 2001*].

Durch die Anwendung des Aromawertkonzeptes wurden sensorisch aktive Komponenten einer ganzen Reihe von Lebensmitteln aufgeklärt [*Grosch, 1994; Grosch, 2001; Münch und Schieberle, 1998; Büttner und Schieberle, 2001*].

### 2.3.4 Analyse chiraler Aromastoffe

#### 2.3.4.1 Bedeutung chiraler Aromastoffe

Unter den Aromastoffen finden sich chirale Moleküle aus verschiedenen Substanzklassen [*Mosandl, 1992; Werkhoff et al, 1993; Bernreuther et al, 1997; Mariaca et al, 2000; Brenna et al, 2003*]. Bei chiralen Molekülen handelt es sich um die Verbindungen, bei denen sich Bild und Spiegelbild nicht zur Deckung bringen lassen. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Struktur wie die bekanntesten Beispiele der Natur, linke und rechte Hand. Auch der Begriff "Chiralität" wird von dem griechischen Wort "Chiralität" (cheir) abgeleitet und bedeutet "Hand" oder "Händigkeit" [*Römpp Lexikon Chemie, 1996*]. Die spiegelbildisomeren Formen, die sich in keiner anderen physikalischen Eigenschaft als in der Drehung der Schwingungsebene linear polarisierten Lichtes unterscheiden, nennt man optische Antipoden bzw. Enantiomere.

Die Forschung auf dem Gebiet chiraler Verbindungen ist nicht nur von großer Bedeutung für die chemische Industrie und Pharmakologie sondern auch für die Lebensmittelindustrie [*Crosby, 1992; Koskinen, 1993; Brenna et al, 2003*]. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen ist bekannt, dass sich Enantiomere hinsichtlich ihrer pharmakologischen



Wirkung (Drogen) und der Wirkung im Pflanzenschutz (Fungizide, Herbizide, Pestizide) unterscheiden können. (R,R)-Chloramphenicol zeigt eine antimikrobielle Wirkung, das (S,S)-Enantiomer ist dagegen inaktiv. Die Wirkung von (S)-Warfarin (Antigerinnungsmittel) ist 5-6 mal größer als die der (R)-Form. (2S,3S)-Paclobutrazol wirkt als Wachstumsregulator bei Pflanzen, im Gegensatz dazu hat das (2R,3R)-Enantiomer eine pilztötende Wirkung. Der pharmakologische Effekt von (R)-(-)-Albuterol ist positiv (eingesetzt bei herzkranken Patienten), während die racemische Mischung von Albuterol einen negativen Einfluss (Verschlechterung bei asthmatischen Krankheiten) ausübt [Crosby, 1992; Maier et al, 2001].

Für viele Verbindungen wurde auch demonstriert, dass die Enantiomere von Aromastoffen sich in ihren Geruchsqualitäten unterscheiden können. Ausführliche Zusammenstellungen der sensorischen Eigenschaften optischer Isomere findet man in den Übersichten von Boelens et al (1993), Koppenhoefer et al (1994) und Brenna et al (2003). Klassische Beispiele für die unterschiedlichen Geruchseindrücke von Enantiomeren sind Nootkaton [Haring et al, 1972] und Carvon [Leitereg et al, 1971]. (+)-Nootkaton weist eine fruchtige (Citrusfrüchte, Grapefruit) Note auf, während sich das (-)-Enantiomer durch einen holzigen, würzigen Geruchseindruck auszeichnet. Das in Kümmelöl vorkommende (S)-(+)-Carvon ist für die typische Kümmel-Note entscheidend, während das (R)-(-)-Enantiomer den Geruch grüner Minze besitzt.

Ebenfalls sind Beispiele in der Literatur beschrieben, die deutlich zeigen, dass sich die Enantiomere einer Verbindung nicht nur in der Geruchsqualität sondern auch in der Geruchsschwelle unterscheiden können. Polak und Provasi (1992) bestimmten für das erdig riechende Geosmin Geruchsschwellen in Wasser von 0.078 µg/l für das (+)-Enantiomer und 0.0095 µg/l für das (-)-Enantiomer. Jagella und Grosch (1992 a,b) demonstrierten Unterschiede in den Geruchsschwellen von Terpen-Enantiomeren; z.B. für β-Pinen Geruchsschwellen in Stärke von 2.1 mg/kg für das (+)-Enantiomer und 32.9 mg/kg für das (-)-Enantiomer.

Im Mittelpunkt von Forschungsaktivitäten stehen nicht nur die sensorische Differenzierung der Stereoisomere und der Zusammenhang zwischen Struktur und Geruch, sondern auch die Biogenese chiraler Verbindungen und die Bestimmung der natürlich vorliegenden Enantiomerenverteilungen von Naturstoffen (pflanzenspezifisch, sortenabhängig usw.). Letztere spielen eine große Rolle bei der Authentizitäts- und Echtheitskontrolle von Aromen und etherischen Ölen [Mosandl und Juchelka, 1997; König et al, 1997; Mosandl,

1999; Ruiz del Castillo et al, 2003]. Erkenntnisse über die Enantiomerenverteilungen und die Biogenese chiraler Komponenten ermöglichen, die Verwendung "naturidentischer" racemischer Substanzen nachzuweisen. Klassische Beispiele in hohen Enantiomerüberschüssen vorkommender Substanzen sind (R)-(-)-1-Octen-3-ol in Pilzen, (S)-(+)-Carbonsäurealkan-2-ylester in Bananen [Gessner et al, 1988], (R)-(+)-Limonen in vielen Citrusölen [Dugo et al, 2001], und (S)-(+)-2-Methylbuttersäure in Früchten [Mosandl et al, 1990]. Die Natur produziert aber nicht immer hohe Enantiomerenreinheiten; ebenso sind racemische Zusammensetzungen für Aromastoffe bekannt, wie z. B. Theaspiran in Stachelbeere [Werkhoff et al, 1991] oder Dihydroactinidiolid in Aprikosen [Guichard et al, 1991]. Homologe Reihen chiraler Verbindungen (in definierter Enantiomerenzusammensetzung) kommen natürlich vor, wie  $\gamma$ -/ $\delta$ -Lactone in Molkereiprodukten, in Margarine [Lehmann et al, 1995] und in Früchten, z.B. Ananas [Kollmannsberger et al, 1991], Kokosnuß [Gessner et al, 1988], Aprikosen, Pfirsich [Lehmann et al, 1991, Guichard, 1995] oder 2-/3-methylverzweigte Verbindungen in Äpfeln und in aus Äpfeln hergestellten Produkten [Schumacher et al, 1998].

#### 2.3.4.2 Enantioselektive Analyse mittels Kapillargaschromatographie

Für die Untersuchung und Charakterisierung chiraler Verbindungen werden eine Reihe unterschiedlicher Techniken eingesetzt. Applikationen sowie die Vorteile und Nachteile der einzelnen Methoden wurden ausführlich beschrieben [Schreier et al, 1995]. Neben chiroptischen Methoden [Polarimetrie, Circular dichroismus, optische Rotationsdispersion] kommen chromatographische [Gaschromatographie (GC), Flüssigkeitschromatographie (LC), Superkritische Fluid-Chromatographie, Gegenstromchromatographie (CCC), Dünnschichtchromatographie (TLC)] und spektroskopische Methoden [z.B. Kernresonanzspektroskopie (NMR)] zum Einsatz. Chromatographische Methoden sowie Kapillarelektrophorese stellen die wichtigsten Methoden dar [Ward, 2000]. Maier et al (2002) haben analytische und präparative Aspekte von Enantiomerentrennungen diskutiert. In den letzten Jahren hat die Kapillargaschromatographie für die Analytik chiraler Komponenten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Mehr als 18000 Enantiomerendifferenzierungen von etwa 6500 chiralen Verbindungen wurden mittels GC durchgeführt [<http://chirbase.u-3mrs.fr>]. Analysen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), zweidimensionaler Systeme [LC-GC, GC-GC

(Multidimensionale Gaschromatographie /MDGC/) sowie MDGC gekoppelt mit Isotopenmassenspektrometrie haben sich als entscheidende Techniken bei der Untersuchung chiraler Komponenten bewährt [Schurig, 2002].

Bei den kapillarchromatographischen Verfahren können indirekte und direkte Methoden eingesetzt werden [Mosandl, 1988; Werkhoff et al, 1993]. Die Analyse derivatisierter Substanzen (indirekte Methode) stellt das älteste Verfahren dar, das durch die direkten Methoden (Verwendung optisch aktiver chiraler stationärer Phasen) in den Hintergrund getreten ist. Von den drei zur Verfügung stehenden chiralen Phasen (Amid-, Metallkomplex- und Cyclodextrin-Phasen) hat die Kapillargaschromatographie an Cyclodextrinen in jüngster Zeit die größten Erfolge erzielt [Juwanz und Szejtli, 1999; Schurig 2002]. Besonders die modifizierten Cyclodextrin-Phasen (peralkylierte bzw. alkylierte/acylierte Derivate von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cyclodextrinen) spielen aufgrund ihrer hohenantioselektiven Trenneigenschaften und der ausgeprägten Selektivität eine große Rolle in der Naturstoffanalytik und ermöglichen eine derivatisierungsfreie Enantiomertrennung unterschiedlicher Substanzen [Bicchi et al, 1999].

Zahlreiche Studien und Untersuchungen beweisen die vielseitige und erfolgreiche Verwendung der Cyclodextrine bei der Analyse von Aromen und etherischen Ölen. Beispiele dafür sind u.a. in den Arbeiten von Werkhoff et al (1991, 1993), Wüst und Mosandl (1999) und Bicchi et al (1999) zusammengestellt.

Ein wesentlicher Fortschritt auf dem Gebiet der kapillargaschromatographischen Analyse chiraler Aromastoffe war die Einführung der Multidimensionalen Gaschromatographie (MDGC) bzw. der Säulenschalttechnik [Schomburg, 1995]. Die Methode der Trennsäulenschaltung war schon in den 60er Jahren bekannt, aber sie wurde nahezu ausschließlich in der Prozeß-Gaschromatographie angewendet [Straub und Ecker, 1975]. Die dort gemachten Erfahrungen führten später in der Labor-Gaschromatographie zu einer effektiven Nutzung dieser Technik. In der Literatur sind verschiedene technische Lösungen zur Trennsäulenschaltung beschrieben [Schaller, 1987; Schulzbach, 1996; Wright, 1997], von denen zwei Varianten allgemein verbreitet sind. Diese sind die sogenannte "Live-T"-Schaltung (Siemens) und die "Moving Column Stream Switching (MCSS)"-Schaltung (CE Instruments) [Mosandl, 1996]. Bei der Technik der Trennsäulenschaltung erfolgt die erste Trennung der Komponenten an einer "Vorsäule". Die interessierenden Substanzen werden herausgeschnitten und anschließend auf eine zweite Säule ("Hauptsäule") anderer Polarität transferiert, wo die endgültige Trennung erreicht wird. Ein besonderer Vorteil der

MDGC ist darin zu sehen, dass chirale Substanzen unterschiedlicher Substanzklassen direkt, d.h. ohne Derivatisierung in ihre Enantiomere getrennt werden können. Entscheidende Parameter zum erfolgreichen Einsatz sind die richtige Auswahl und Kombination der Trennkapillaren (achirale Vorsäule/chirale Hauptsäule) und das verwendete Temperaturprogramm [Werkhoff *et al*, 1991/92; Schomburg, 1995, Wright, 1997]. Mit Hilfe der Multidimensionalen Gaschromatographie konnten bisher zahlreiche chirale Bestandteile von Aromaextrakten und etherischen Ölen untersucht werden [Werkhoff *et al*, 1993; Kim, 1996; Mosandl und Juchelka, 1997; Schumacher *et al*, 1998; Dugo *et al*, 2002].

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Untersuchungsmaterial

###### 3.1.1.1 Rhabarber

Rhabarber [*Rheum rhabarbarum* (syn. *undulatum*) L.] wurde von unterschiedlichen örtlichen Gemüsehändlern und Supermärkten bezogen. Die Stiele wurden bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagert (max. 5 Tage).

###### 3.1.1.2 Rhabarber-Konzentrat

Industriell hergestellte Rhabarber-Konzentrate (entoxalisiert) wurden von den Firmen Alfru Industriefrucht Vertriebs GmbH, Prisdorf, Deutschland (I) und SVZ International B.V. Etten-Leur, Holland (II) bezogen.

###### Produktbeschreibungen laut Hersteller:

Trockensubstanz: 60 °Brix; pH-Wert: 3,2-3,8; Farbe: rot, bernstein-violett; Konsistenz: homogen flüssig, dickflüssig; Rückverdünnungsangaben (berechnet auf Saft TS-Wert in ° Brix): 12,0 kg Saft ergibt ca. 1,0 kg Konzentrat; 13,3-20,0 kg Stiele ergeben 1 kg Konzentrat.

###### 3.1.1.3 Kommerzielle Rhabarber-Aromen

Rhabarber-Aromen wurden von *Frey+Lau GmbH*, Henstedt-Ulzburg und *Melchers Aroma GmbH*, Bremen zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.2 Chemikalien

##### 3.1.2.1 Referenzsubstanzen

Die zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Identifizierung verwendeten Referenzsubstanzen wurden von *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, (Steinheim), Tokyo Chemical Industry Company Co., Ltd., (Tokyo, Japan) und *Merck* (Darmstadt) bezogen bzw. von der Firma *Frey+Lau GmbH* (Henstedt-Ulzburg) zur Verfügung gestellt.

##### 3.1.2.2 Reagenzien

Acetonitril

Merck 1.00030

---

Aliquat 336 (Trioctylmethylammoniumchlorid)	Aldrich 20,561-3
Äpfelsäure	Fluka 02308
Boran-Dimethylsulfid-Komplex-Lösung [~2M in Tetrahydrofuran]	Fluka 15574
Boron Trifluorid [~10% (1.3 M) in Methanol]	Fluka 15176
Calciumchlorid-6-hydrat	Riedel-de Häen 12074
Citronensäure Monohydrat	Fluka 27490
Dichlormethan	Riedel de Haën 24102
Diethylether	Sasol 33/1155
Ethanol	Riedel de Häen 24102
<i>n</i> -Hexan	Fluka 52780
Kaliumpermanganat	Merck 5082
Magnesiumsulfat	Fluka 63136
(S)-2-Methylbutanol	Fluka 65979
4-Methyl-1-hexen	Fluka 67500
(S)-4-Methyl-hexanol	TCI M0964
Natriumchlorid	Merck 1.06404
Natriumhydroxid	Fluka 71691
Natriumsulfat	Merck 1.06649
Natriumsulfit	Merck 6657
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid	Merck 8.41102
Oxalsäure Dihydrat	Fluka 75702
<i>n</i> -Pentan	Th.Geyer 8685
Salzsäure	Acrös Organics 124620025
Schwefelsäure	Merck 1.00748
Stickstoff (flüssig)	Linde
Wasserstoffperoxid	Fluka 95300

Die zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel (Diethylether und *n*-Pentan) wurden vor Gebrauch über Füllkörperkolonnen destilliert.

### 3.1.2.3 Synthese von Referenzsubstanzen

#### 3.1.2.3.1 4-Methylhexanol

Racemisches 4-Methylhexanol wurde in Anlehnung an Lane (1974) durch Hydroborierung aus 4-Methyl-1-hexen erhalten. In einem trockenen 100 ml Kolben mit Tropftrichter wurden unter N<sub>2</sub>-Einleitung 2,5 ml 4-Methyl-1-hexen (17,95 mmol) unter Rühren in 10 ml Diethylether gelöst. Unter Kühlung in Eis-Wasserbad wurden 0,6 ml Boran-dimethylsulfid-Komplex-Lösung in Tetrahydrofuran (6,58 mmol) tropfenweise dazugegeben. Nach beendetem Zutropfen wurde das Eis-Wasserbad entfernt und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur eine Stunde weitergerührt. Dann wurden 2,2 ml einer 3 N NaOH-Lösung (6,58 mmol) unter Eiskühlung zugetropft. Anschließend wurden 0,6 ml einer 30 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung (19,74 mmol) dazugegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde weitergerührt. Nach der Zugabe von Eiswasser (50 ml) und Diethylether (50 ml) sowie nach weiterem Rühren (15 min) wurde die wässrige Phase abgetrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 50 ml) ausgeschüttelt und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach der Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

#### 3.1.2.3.2 4-Methylhexansäure / (S)-4-Methylhexansäure

Die Synthese von 4-Methylhexansäure erfolgte durch Oxidation von 4-Methylhexanol mit KMnO<sub>4</sub> [Organikum, 1996]. (S)-4-Methylhexansäure wurde entsprechend aus (S)-4-Methyl-1-hexanol erhalten.

In einem 100 ml Rundkolben mit Rührer wurden zu einem Gemisch aus 0,5 ml (S)-4-Methylhexanol (3,54 mmol), 15 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 5 ml destilliertem Wasser 0,14 ml Aliquat 336 portionsweise hinzugegeben. Anschließend wurde eine Lösung von 7,1 mmol KMnO<sub>4</sub> (1,12 g) gelöst in destilliertem Wasser (15 ml) und unter kräftigem Rühren zugetropft. Die Temperatur wurde durch Kühlung mit Eiswasser 3 Stunden unter 10 °C gehalten. Danach wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, bis die Permanganatfarbe verschwunden war. Der gebildete Braunstein wurde mit wässriger Natriumsulfit-Lösung aufgelöst und die Mischung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert. Die abgetrennte organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

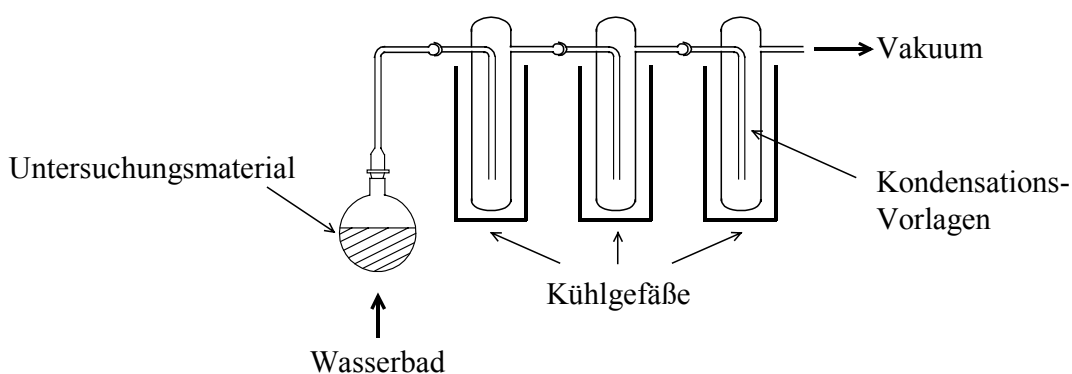
## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung und Anreicherung flüchtiger Verbindungen

Zur Isolierung flüchtiger Inhaltsstoffe des Untersuchungsmaterials wurde als Lösungsmittel eine Mischung aus *n*-Pentan-Diethylether (1:1, v/v) benutzt. Die gewonnenen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, schonend an einer Vigreux Kolonne (300 mm x ID 19 mm) eingengt und anschließend für die kapillargaschromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen verwendet.

#### 3.2.1.1 Vakuum Headspace Technik (VHS)

Die Analyse wurde in der in *Abbildung 3.2.1* dargestellten Anlage durchgeführt. 500 g Rhabarberstiele wurden in Stücke (2 cm) geschnitten und 1 Min. in einem Mixer zerkleinert. Das Homogenat wurde in einen 2 L Rundkolben eingefüllt, der während der Isolierung mit Hilfe eines Wasserbads (Gerhardt, Typ SV 24) bei etwa 35°C temperiert wurde. Nach Zugabe des Standards (75 µg 1-Octanol; in Ethanol gelöst, 0.15 ml) erfolgte die Isolierung unter einem Vakuum von 1-10 mbar (Leybold-Heraus Vakuumpumpe, Typ D4A) für 3 Stunden. Das wässrige Destillat wurde in 3 gekühlten Fallen aufgefangen. Zwei Kühlfallen wurden mit Wasser-Eis und die dritte mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach dem Abtauen und Erwärmen der Kühlfallen wurden die Destillate gesammelt und mit der Lösungsmittelmischung (3 x 50 ml) ausgeschüttelt.

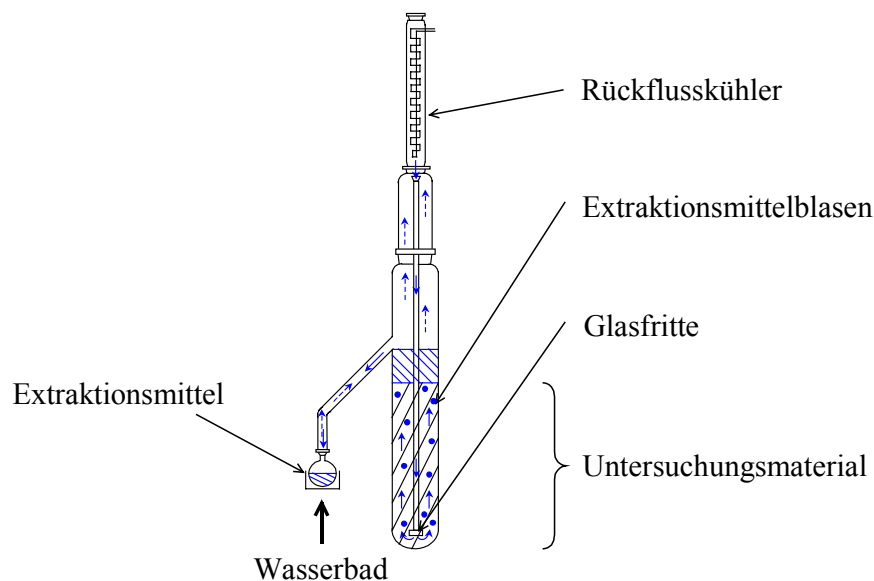


*Abbildung 3.2.1* Vakuum Headspace Technik



### 3.2.1.2 Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE)

Die Flüssig-Flüssig Extraktion erfolgte in dem in *Abbildung 3.2.2* dargestellten Kutscher-Steudel Extraktor (*Gattermann und Wieland, 1972*). Der Extrakt wurde in einem bei etwa 40°C siedenden Rundkolben gesammelt, der 150 ml der Lösungsmittelmischung enthielt. Dieser Vorgang wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt.



*Abbildung 3.2.2.* Flüssig-Flüssig Extraktion

#### Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

*Frischer Rhabarber:* Die Stiele (jeweils 500 g) wurden in Stücke (2 cm) geschnitten und 2 Min. in einem Mixer mit 800 ml Wasser zerkleinert. Das erhaltene Homogenat wurde zentrifugiert (8000 g, 15 min) und der Überstand nach Zugabe des Standards (15 µg 1-Decanol; in Ethanol gelöst, 0.15 ml) der Flüssig-Flüssig Extraktion unterworfen.

*Extraktion nach Erhitzen unter Rückfluss:* Der Überstand des zentrifugierten Homogenats aus 300 g zerkleinerten Stiele und 600 ml Wasser wurden nach Zugabe des Standards am Rückflusskühler für 15 Min erhitzt, anschließend gekühlt und der Flüssig-Flüssig Extraktion unterworfen.

*Rhabarber-Konzentrat*: 25 g Konzentrat wurde mit 600 ml Wasser verdünnt und nach Zugabe des Standards (15 µg 1-Decanol, in Ethanol gelöst, 0.15 ml) der Flüssig-Flüssig Extraktion unterworfen.

### 3.2.1.3 Simultane Destillation-Extraktion (SDE)

Die Simultane Destillation-Extraktion wurde in der von *Schultz et al.*, (1977) entwickelten Apparatur durchgeführt (Abb. 3.2.3). Das vorbereitete Untersuchungsmaterial wurde in den 2 L Rundkolben eingefüllt und in einem Heizpilz (Heraeus Wittman, Typ GSB) erhitzt. 150 ml der Lösungsmittelmischung *n*-Pentan-Diethylether (1:1) wurden in einem 250 ml Rundkolben vorgelegt und bei etwa 40 °C im Wasserbad (Gerhardt, Typ SV 24) erhitzt. Die SDE wurde für 2 Stunden durchgeführt.

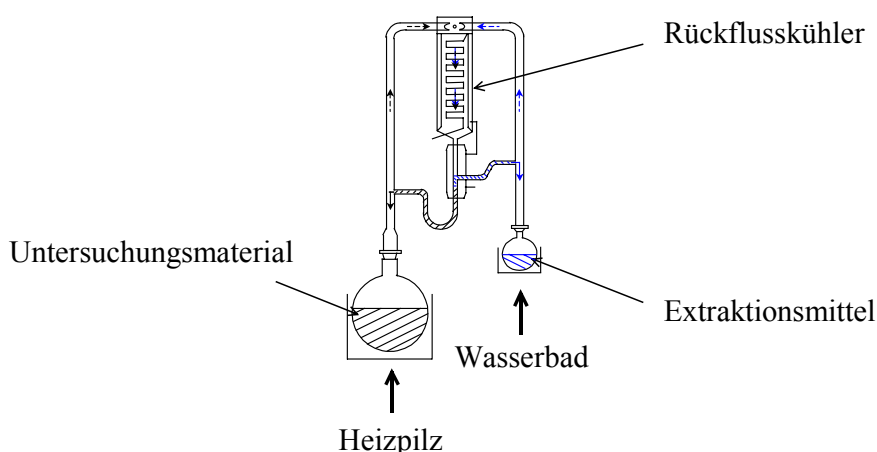


Abbildung 3.2.3 Simultane Destillation-Extraktion

### Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

*Frischer Rhabarber*: Die Stiele (jeweils 500g) wurden in Stücke (2 cm) geschnitten und 2 Min. in einem Mixer mit 800 ml Wasser zerkleinert (gemischt). Das erhaltene Homogenat wurde zentrifugiert (8000 g, 15 min) und der Überstand nach Zugabe des Standards (15 µg 1-Decanol, in Ethanol gelöst, 0.15 ml) der Simultanen Destillation-Extraktion unterworfen.

### 3.2.1.4 Isolierung unter enzyminhibierenden Bedingungen

Die Stiele (jeweils 300 g) wurden in Stücke (2 cm) geschnitten (1 Min.) und 1 Min. in einem Mixer zerkleinert. Nach Stehenlassen (1 Min.) wurden die zerkleinerten Stiele zur Inhibierung der Enzyme 10 Sek. mit gesättigter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (300 ml) gemischt. Das erhaltene Homogenat wurde zentrifugiert (8000 g, 15 min) und der Überstand der SDE und LLE unterworfen. Zur VHS wurde das gesamte Homogenat (ohne Zentrifugieren) eingesetzt.

Als Kontrolle (ohne Enzyminhibierung) wurden die zerkleinerte Stiele 10 Sek. mit 300 ml H<sub>2</sub>O gemischt. Bei der Isolierung der flüchtigen Verbindungen mittels VHS wurde zusätzlich ein Experiment ohne Zugabe von H<sub>2</sub>O durchgeführt.

## 3.2.2 Identifizierung flüchtiger Verbindungen

Die Identifizierung flüchtiger Verbindungen erfolgte mit Hilfe von Referenzsubstanzen sowie durch Vergleich der kapillargaschromatographischen (Retentionszeit–Kovats-Index) und massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben.

### 3.2.2.1 Bestimmung des Retentionsindex

Zur Bestimmung der Retentionsindices wurden n-Alkane als Standards [Kovats, 1958] verwendet, wobei die Retentionszeit der unbekanntem Verbindung auf die Retentionszeiten der Serie der n-Kohlenwasserstoffe bezogen wird.

$$RI = 100 \cdot \left[ C + \frac{RT - RT_m}{RT_n - RT_m} \right] \quad [1]$$

RT	Retentionszeit der unbekanntem Verbindung
RT <sub>m</sub>	Retentionszeit des n-Alkans
RT <sub>n</sub>	Retentionszeit des n+1 Alkans
C	Anzahl der Kohlenstoffatome des n-Alkans

### 3.2.3 Quantifizierung flüchtiger Verbindungen

Die quantitative Bestimmung der Komponenten beruhte auf der vor der Probenaufarbeitung zugesetzten Standardverbindung. Die Peakflächen der gaschromatographisch getrennten Komponenten wurden mit der Peakfläche des Standards verglichen und nach folgender Formel ausgewertet:

$$\text{Gehalt an Komponente (x)} = \frac{P_x \cdot Rf_x \cdot M_s \cdot Wf_s}{P_s \cdot Rf_s \cdot M \cdot Wf_{rx}} \quad [2]$$

$P_x$	Peakfläche der zu quantifizierenden Verbindung
$P_s$	Peakfläche des Standards
$M_s$	Zugesetzte Menge an Standard
$M$	Eingesetzte Menge an Rhabarber
$Rf_s$	Korrekturfaktor für gaschromatographisches Verhalten des Standards
$Rf_x$	Korrekturfaktor für gaschromatographisches Verhalten der Verbindung
$Wf_s$	Wiederfindungsfaktor des Standards
$Wf_{rx}$	Relativer Wiederfindungsfaktor der zu quantifizierenden Verbindung

Als Standardverbindungen wurden 1-Octanol bzw. 1-Decanol verwendet. Vorversuche hatten gezeigt, dass diese Verbindungen keine Bestandteile von Rhabarber und Rhabarber-Konzentrat sind.

#### 3.2.3.1 Bestimmung der FID Response-Faktoren

Die FID Response-Faktoren wurden mit Lösungen der Referenzsubstanzen (0.1 µg/µL in Diethylether) im Vergleich zu 2-Heptanol (0.1 µg/µL in Diethylether) bestimmt.

$$Rf_x = \frac{P_s}{P_x} \quad [3]$$

$Rf_x$	Response-Faktor der Verbindung
$P_x$	Peakfläche der Verbindung
$P_s$	Peakfläche von 2-Heptanol

### 3.2.4 Wiederfindungsversuche

Die Wiederfindungsfaktoren ausgewählter Komponenten wurden in Modellversuchen bestimmt. Aus Referenzsubstanzen wurden Modell-Lösungen hergestellt: jeweils 10 µl oder 10 mg der Substanzen wurden in 2 ml Hexan gelöst und mit Ethanol auf 10 ml aufgefüllt (Stammlösung: 1 µg/µl). Im Fall von polaren Substanzen wie Maltol, 5-Methylfurfural, Vanillin und 1,2 Ethandiol wurden die Konzentrationen auf 2 µg/µl erhöht. Die Lösung der Säuren wurde nach Methylierung zur kapillargaschromatographischen Untersuchung verwendet.

Für jede Verbindung wurden 7 Analysen durchgeführt. Die Substanzen wurden auf mehrere Lösungen verteilt, um Überlappungen bei der gaschromatographischen Analyse zu vermeiden. Zu den Lösungen, die in frischem Rhabarber mittels VHS nachgewiesene Verbindungen enthalten, wurde 1-Octanol zugesetzt. Zu den Lösungen der mittels SDE und LLE nachgewiesenen Verbindungen wurden 1-Decanol zugesetzt.

Die Wiederfindungen der Standardverbindungen wurden bei Berechnung der relativen Wiederfindungen der Substanzen berücksichtigt. Bei den Wiederfindungsversuchen wurde eine bestimmte Menge der Referenzlösung (100 µl bei der SDE und KS; 250 µl bei der VHS) in die Pufferlösung (600 ml Na-citrat/HCl Puffersysteme, pH=3,5) eingesetzt.

Die Wf-Werte der untersuchten Verbindungen wurden mit Wf-Werten des Standards korrigiert und nach folgender Formel ausgewertet:

$$Wf_{rx} = \frac{P_{xi} \cdot P_{s0}}{P_{x0} \cdot P_{si}} \quad [4]$$

$Wf_{rx}$	Relativer Wiederfindungsfaktor der Verbindung
$P_{xi}$	Peakfläche der Verbindung nach der Isolierung
$P_{x0}$	Peakfläche der Verbindung in der Originallösung
$P_{si}$	Peakfläche des Standards nach der Isolierung
$P_{s0}$	Peakfläche des Standards in der Originallösung

### 3.2.4.1 *Na-citrat / HCl Pufferlösung*

Die Modell-Versuche erfolgten in Na-citrat/ HCl Pufferlösung (pH 3.5): 0,1 N Na-citrat Lösung (46,8 ml) und 0,1 N HCl (53,2 ml) [Rauen, 1965].

### 3.2.4.2 *Methylierung von Fettsäuren*

Für die Säuren wurden die Wiederfindungen nach Methylierung mit  $\text{BF}_3$ -Methanol Lösung (~10 %) bestimmt [Metcalf *et al.*, 1966; Blau und Halket, 1993]. Der nach der Isolierung erhaltene Extrakt wurde an einer Vigreux Kolonne auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Das verbleibende Lösungsmittel wurde anschließend mit  $\text{N}_2$  entfernt. Zur Methylierung wurde 1 ml  $\text{BF}_3$ -Methanol Lösung dazugegeben, 2 Min. geschüttelt und für 30 Min. ins Wasserbad bei 60 °C gestellt. Nach dem Abkühlen wurden die Fettsäuremethylester mit 1 ml Hexan extrahiert und die Hexanschicht abgetrennt. 1  $\mu\text{l}$  aus der Hexanphase wurde gaschromatographisch analysiert.

### 3.2.4.3 *Wiederfindung von Fruchtsäuren*

Aus Referenzsubstanzen (Apfelsäure, Oxalsäure und Zitronensäure) wurde eine wässrige Lösung mit Konzentrationen von jeweils 1mg/ml hergestellt. 6 ml dieser Stammlösung wurden mit Na-citrat/HCl Puffer (pH 3.5) verdünnt und die Lösungen zur Isolierung eingesetzt. Bei der VHS-Technik wurde auch die Extraktionsausbeute der Fruchtsäuren aus dem wässrigen Kondensat untersucht. 4 ml der Stammlösung wurden zum Kondensat zugegeben, ausgeschüttelt und konzentriert. Nach der Konzentrierung (etwa 300  $\mu\text{l}$ ) wurden die Extrakte silyliert. Das Lösungsmittel wurde mit  $\text{N}_2$  entfernt und der verbliebene Rückstand in 100  $\mu\text{l}$  Acetonitril gelöst. Anschließend wurde nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid unter Argonbegasung für 60 Min im Ölbad bei 70 °C silyliert. 1  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Lösung wurde zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt.

Zur Berechnung wurden die Peakflächen der gaschromatographisch getrennten Komponenten auf die Peakflächen der Komponenten der Originallösung bezogen.

### 3.2.5 Untersuchung flüchtiger Verbindungen kommerzieller Rhabarber-Aromen

Die kommerziellen Rhabarber-Aromen wurden mit Lösungsmittel (Diethylether oder Ethanol) 1:10 verdünnt. Jeweils 1 µl der hergestellten Lösungen wurden zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung verwendet.

### 3.2.6 Kapillargaschromatographie (HRGC)

#### GC-System 1

Gerät:	Carlo Erba Mega II 8575 (C.E. Instruments)
Kapillarsäule:	DBWAX (60 m, 0.32 mm I.D., 0.25 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramm:	40 °C /5 min//4 °C/min//230 °C/25min
Trägergas:	H <sub>2</sub> 105 kPa
Injektor:	215 °C; Splitinjektion; Splitfluss 30 ml/min; Splitverhältnis ~ 1:10
Detektoren:	FID (230 °C) und FPD (140 °C); Effluentsplit via press-fit T-Stück ca.1:1

Die gaschromatographische Trennung der silylierten Fruchtsäuren wurden an einem Carlo Erba HRGC 5160 Mega (ThermoFinnigan, C.E. Instruments, Egelsbach) durchgeführt.

#### GC-System 2

Gerät:	Carlo Erba Mega II 8575 (C.E. Instruments)
Kapillarsäule:	DB-1 (60 m, 0.32 mm I.D., 0.25 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramme:	100 °C //4 °C/min//320 °C/30 min
Trägergas:	H <sub>2</sub> 100 kPa
Injektor:	280 °C; Splitinjektion; Splitfluss 30ml/min; Splitverhältnis ~ 1:10
Detektor:	FID (320 °C)

### 3.2.7 Massenspektrometrie (HRGC/MS)

Gerät:	GC 8000 <sup>Top</sup> -Voyager (ThermoFinnigan)
--------	--

Kapillarsäule:	DB-WAXETR (30 m, 0.25 mm I.D., 0.5 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramm:	40 °C /5 min//4 °C/min//240 °C/25 min
Trägergas:	He 75 kPa
Injektor:	220 °C; Splitinjektion; Splitfluss 30ml/min; Splitverhältnis ~1:10
Quadrupol-Massenfilter in EI-Modus	
Ionisationsenergie:	70 eV
MS-Source Temperatur:	200 °C
MS-Interface Temperatur:	240 °C

### 3.2.8 Sensorische Bewertung flüchtiger Verbindungen

#### 3.2.8.1 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Zur kapillargaschromatographisch-olfaktometrischen Bewertung wurde eine Aromaextraktverdünnungsanalyse [Ullrich und Grosch, 1987; Schieberle, 1995] mit einem vereinigten VHS-Extrakt durchgeführt. Diese Probe wurde aus 15 VHS-Extrakten hergestellt. Nach dem Vereinigen der Extrakte wurde der Gesamtextrakt mit Hilfe von N<sub>2</sub> auf 150 µl konzentriert. Der Aromaextrakt wurde schrittweise im Verhältnis 1:1 (v/v) mit einer Mischung aus Pentan-Diethylether (1:1, v/v) verdünnt. Die hergestellten Verdünnungsstufen wurden analysiert (abgerochen), bis am Sniffing-Port kein Aromastoff mehr sensorisch wahrgenommen werden konnte.

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

##### GC-System 3

Gerät:	Carlo Erba Fractovap 4200 (C.E. Instruments)
Kapillarsäule:	DBWAX (55 m, 0.32 mm I.D., 0.25 µm F.); J&W Scientific
Temperaturprogramm:	60 °C /5 min//4 °C/min//230 °C/25 min
Trägergas:	H <sub>2</sub> 100 kPa
Injektor:	215 °C; Splitinjektion, Splitfluss 30ml/min; Splitverhältnis ~ 1:10
Detektor:	FID und Sniffingport (220 °C-220 °C)



Sniffing-Port: passiv geheizte Verlängerung der Detektorbasis, zusätzliche Einspeisung von N<sub>2</sub> als Make up-Gas (50 kPa)

#### GC-System 4

Gerät: Carlo Erba Fractovap 4200 (C.E. Instruments)

Kapillarsäule: 33% Heptakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)- $\beta$ -Cyclodextrin in OV-1701-vi  
30 m x 0.25 mm I.D., 0,25  $\mu$ m F.

Temperaturprogramm: 60 °C/2 min//1 °C/min//160 °C

Trägergas: 75 kPa

Injektor: 200 °C; Splitinjektion,  
Splitfluss 30ml/min; Splitverhältnis ~ 1:10

Detektor: FID und Sniffingport (200 °C - 200 °C)

Sniffing-Port: passiv geheizte Verlängerung der Detektorbasis, zusätzliche Einspeisung von N<sub>2</sub> als Make up-Gas (50 kPa)

Das Cyclodextrinderivat wurde nach *Schmarr (1992)* synthetisiert und charakterisiert. Die verwendete Kapillarsäule wurde in Analogie zu den von *Grob (1986)* beschriebenen Verfahren hergestellt.

#### 3.2.8.3 *Bestimmung der Geruchsschwellenwerte von Aromastoffen in Wasser*

Die Bestimmung der Geruchsschwellenwerte erfolgte mit einer Prüfgruppe bestehend aus 12 Teilnehmern (7 männlichen und 5 weiblichen im Alter 23-60 Jahren) nach der von *Guadagni et al (1963)* beschriebenen Methode. Wässrige Lösungen der Referenzsubstanzen (250 ml) wurden in geruchlosem Wasser gelöst und die hergestellten Lösungen (250 ml) in eine Sensorikflasche aus Teflon (500 ml) eingefüllt. Die Geruchsschwelle wurde in abnehmender Konzentration durch Vergleich mit einer Nullprobe (Wasser) bestimmt.

### 3.2.8.4 Sensorische Bewertung ausgewählter Rhabarberaromastoffe in wässrigen Lösungen

Zur sensorischen Bewertung wurden Stammlösungen der Aromastoffe in Triacetin hergestellt (Tabelle 3.2.1). Aliquote dieser Stammlösungen wurden zu 1 L Wasser bzw. Fruchtsäurelösung gegeben, so dass die resultierenden Konzentrationen der Aromastoffe den unter inhibierenden Bedingungen in Rhabarber ermittelten Gehalten entsprachen. 200 ml der hergestellten Lösungen wurden in die Sensorikflaschen aus Teflon (500 ml) gefüllt und zur Sensorik verwendet.

Die Fruchtsäurelösung wurde aus verschiedenen Säuren des Rhabarbers [Souci et al, 2000] hergestellt: (g/L), Äpfelsäure 12.5, Oxalsäure 4.6, Zitronensäure 1.3, Essigsäure 0.59, Gallussäure 0.03, Protocatechussäure 0.01, Kaffesäure 0.001, p-Cumarsäure 0.005.

Tabelle 3.2.1 Zusammensetzung der zur sensorischen Bewertung eingesetzten Stammlösungen

Verbindung	1	2	3
		mg/ml	
Hexanal	4.0	2.3	2.5
(Z)-3-Hexenal	32.7	40.6	58.7
(Z)-2-Hexenal	0.3	0.2	0.2
(E)-2-Hexenal	27.2	17.8	10.3
Hexanol	0.1	0.2	0.2
(Z)-3-Hexenol	0.4	2.2	2.7
(E)-2-Hexenol	4.0	3.8	2.4
2-Methylbutanol	8.8	5.6	3.4
Hexansäure	0.7	0.7	0.5
(E)-3-Hexensäure	4.1	15.6	12.6
(E)-2-Hexensäure	8.6	7.5	3.2
2-Methylbuttersäure	9.1	3.5	3.3

## 3.2.9 Untersuchung chiraler Aromastoffe

### 3.2.9.1 Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC)

Das für die Analyse verwendete „multidimensionale“ Gaschromatographiesystem bestand aus zwei gekoppelten GC 8000 Series Gaschromatographen und war mit einem *Moving Column Stream Switching System* (MCSS) ausgestattet (Abb. 3.2.4). Der Hauptteil des

Säulenschaltssystem MCSS [Sulzbach, 1991; 1996], ist der Glasdom, in den verschiedene Kapillaren (Kapillare zum ersten Detektor [Monitordetektor] sowie Restriktionskapillare) und Säulen (achirale Vorsäule und chirale Hauptsäule) eingebaut sind. Die Umschaltung des Eluatstroms der Vorsäule auf die Hauptsäule erfolgt durch eine Verschiebeeinrichtung (Bewegungsmechanismus). Wenn die Hauptsäule in der Phase der Entkopplung ist, fließt der Trägergasstrom des Injektors größtenteils zum Monitordetektor (Vorsäulendetektor) ab und der Eluat der Vorsäule wird auf den Monitordetektor geleitet. In der Kopplung (wenn die Vorsäule in der Nähe des Hauptsäuleneinganges eingeschoben ist →“Cut“-Zeit) gelangt das Eluat der Vorsäule auf die Hauptsäule.

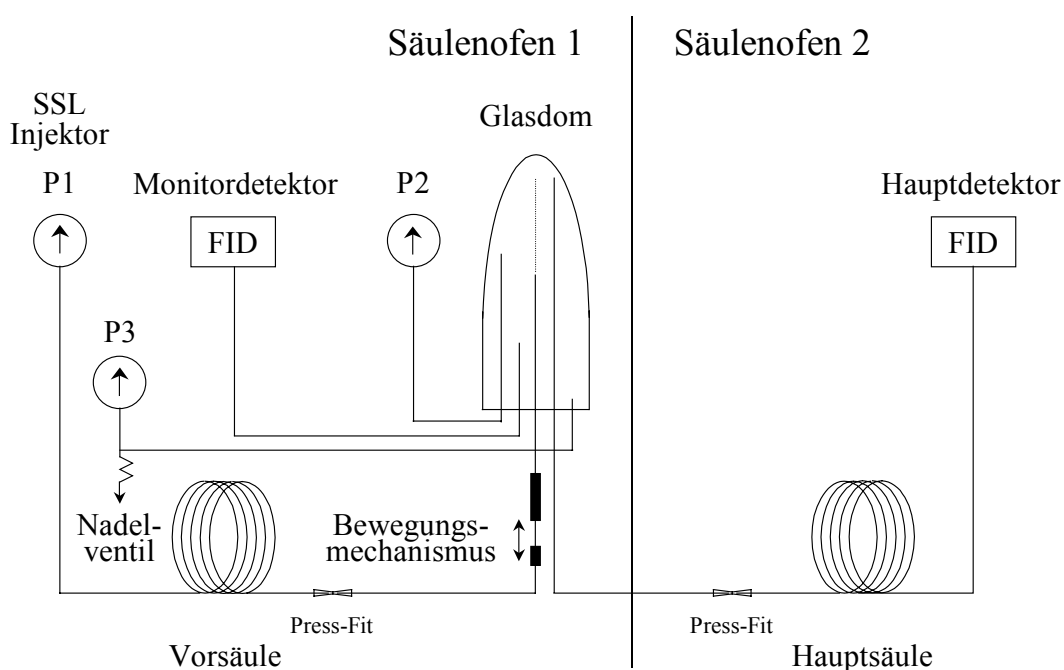


Abbildung 3.2.4. Schematischer Aufbau des gekoppelten GC 8000 Series Gaschromatographen mit MCSS System als Multidimensionaler Gaschromatograph

### Säulenofen 1

Vorsäulen:

a, DB-5 (27 m x 0.25 mm I. D., 0.25  $\mu$ m F.; J&W Scientific) b, DB-5 (30 m x 0.25 mm I. D., 0.25  $\mu$ m F.; J&W Scientific) c, DBWAX (30 m x 0.32 mm I. D., 0.25  $\mu$ m F.; J&W Scientific)

Trägergas: H<sub>2</sub> 165 kPa

Injektor: 215 °C; Splitinjektion,  
Splitfluss 30ml/min; Splitverhältnis ca. 1:15  
 Monitordetektor: FID 260 °C (a und b) bzw. 230°C (c)  
 Temperaturprogramm: 40 °C /5 min//4 °C/min//230 °C min

Cut-Fenster (Min):

Vorsäule	2-Methylbutanol	2-Methylbuttersäure	4-Methylhexanol	4-Methylhexansäure
a	2.9-3.1	7.3-7.8	10.4-10.8	15.3-15.9
b	3.5-3.7	8.2-8.7	11.6-12.0	16.5-17.0
c	8.4-8.55	23.8-23.95	16.4-16.55	30.85-31.0

### Säulenofen 2

Hauptsäule: 33% Heptakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)- $\beta$ -Cyclodextrin in OV-1701-vi  
30 m x 0.25 mm I.D., 0,25  $\mu$ m F.  
 Trägergas: H<sub>2</sub> 98 kPa  
 Hauptdetektor: FID (150 °C)  
 Temperaturprogramm: 37 °C /10 min//2 °C/min//160 °C (a und b)  
47 °C /10 min//2 °C/min//160 °C (c)

Das Cyclodextrinderivat wurde nach *Schmarr (1992)* synthetisiert und charakterisiert. Die verwendete Kapillarsäule wurde in Analogie zu den von *Grob (1986)* beschriebenen Verfahren hergestellt.

#### 3.2.9.2 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des MDGC-Transfers von 2-Methylbutanol, 2-Methylbuttersäure, 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure wurden in Analogie zu der von *Hädrich und Vogelgesang (1999 a, b)* beschriebenen Methode bestimmt und berechnet. Die Regressionsgeraden wurden durch Analytik von Referenzsubstanzen (8 Gehaltsstufen im Bereich von 0.5 bis 100  $\mu$ g/kg) erstellt.

## 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Isolierung flüchtiger Verbindungen von Rhabarberstielen mittels VHS

#### 4.1.1 Einleitung

Erste Untersuchungen der flüchtigen Komponenten von Rhabarber wurden von *Frattini et al* (1974, 1976) durchgeführt. Im Wurzelstock chinesischen Rhabarbers (*Rheum sinensis radix*) konnten sie 43 Verbindungen identifizieren. Unter den Komponenten waren  $\alpha$ -Terpineol, verschiedene Naphthaline (Methyl-/Dimethylnaphtalin), Ester (Fettsäuremethylester, Zimtsäuremethylester, Phthalate) sowie Fettsäuren. Eine umfassende Zusammenstellung flüchtiger Verbindungen des Wurzelstocks von *Rheum palmatum* L. gaben *Miyazawa et al* (1996). Von den 108 isolierten Komponenten konnten 98 Verbindungen gaschromatographisch und massenspektrometrisch identifiziert werden, wobei Terpene und Benzol-Derivate dominierten. Die quantitativ wichtigsten flüchtigen Bestandteile waren Hexadecansäure, Paenol,  $\alpha$ -Copaen, Methyloctadecanoat,  $\delta$ -Cadinen und Methyleugenol. Ein ähnliches Spektrum an flüchtigen Inhaltsstoffen wurde im Extrakt des Wurzelstocks von *Rheum tanguticum* Maxim. ex. Balf nachgewiesen [*Wang et al*, 1995].

Daten über die Aromastoffe der Blattstiele von Gemüserhabarber lagen bisher nicht vor. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, flüchtige Inhaltsstoffe der Stiele zu identifizieren und zu quantifizieren.

Zur Isolierung flüchtiger Verbindungen ungekochter Rhabarberstiele wurde die Vakuum Headspace Technik angewandt. Die gewonnenen Extrakte wurden mit Hilfe von Kapillargaschromatographie (HRGC) und Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) untersucht. Die aromawirksamen Komponenten wurden mittels Gaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O) charakterisiert.

#### 4.1.2 Isolierung flüchtiger Verbindungen mittels Vakuum Headspace Technik

Flüchtige Verbindungen ungekochter Rhabarberstiele wurden mittels Vakuum Headspace Technik (VHS) isoliert. Vom Prinzip her ist die VHS eine Wasserdampfdestillation im Vakuum; sie wurde in verschiedenen Variationen erfolgreich zur Isolierung von Aromastoffen aus Blüten [*Surburg et al*, 1993; *Joulain*, 1986], aus Früchten, wie z. B. Papaya [*Idstein und Schreier*, 1985 a], Guava [*Idstein und Schreier*, 1985 b], Kiwi

[Takeoka et al, 1986] und Quitten [Winterhalter et al, 1987] sowie aus Vanille [Werkhoff und Güntert, 1997] und Saffran [Tarantillis und Polissiou, 1997] eingesetzt. Es handelt sich um ein schonendes Isolierverfahren, da das Untersuchungsmaterial thermisch nicht belastet wird und dadurch keine Kochnoten auftreten. Bei dem von Güntert et al (1998) durchgeführten Methodenvergleich zeigte sich, dass die Vakuum Headspace Technik bei Erdbeere, Maracuja, Pfirsich, Aprikose, Kirsche zu Extrakten mit typischen und ausgeprägten Aromanoten der reifen Früchte führte. Pennarun et al (2002) stellten bei der Untersuchung flüchtiger Verbindungen von Austern auch fest, dass die Vakuum Headspace Methode sensorisch typischere Extrakte lieferte als das ebenfalls als schonende Technik beschriebene Dynamische Headspace Verfahren.

Die Isolierung und Anreicherung der flüchtigen Inhaltsstoffe von Rhabarberstielen erfolgte in Analogie zu dem von Werkhoff et al (1998) beschriebenen Verfahren. Die quantitative Bestimmung der Komponenten beruhte auf der vor der Probenaufarbeitung zugesetzten Standardverbindung (1-Octanol) unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren des gaschromatographischen Verhaltens (FID Response) und der Wiederfindung der Komponenten. Die FID Response-Faktoren wurden mit Lösungen der Referenzsubstanzen (0.1 µg/µl Diethylether) im Vergleich zu 2-Heptanol bestimmt. Die Wiederfindungen wurden aus wässriger Lösung (pH 3.5) der Referenzsubstanzen ermittelt.

Die erhaltenen Extrakte wurden kapillargaschromatographisch (HRGC) und kapillargaschromatographisch-massenspektrometrisch (HRGC-MS) untersucht. Ein typisches HRGC-Chromatogramm ist in *Abbildung 4.1.1* dargestellt. In *Tabelle 4.1.1* sind die identifizierten Komponenten nach Stoffklassen geordnet.

Die Zusammenstellung in *Tabelle 4.1.1* umfasst quantitative Daten von zwei Chargen (I, II), die in der Saison 2001 untersucht wurden. Das Material wurde aus örtlichen Supermärkten bezogen, Informationen zu Sortenreinheit lagen nicht vor. Spalte III zeigt die Daten eines Extraktes, welcher durch Vereinigen aliquoter Anteile von 15 Extrakten verschiedener Chargen gewonnen wurde.

Insgesamt 78 Komponenten wurden identifiziert, von denen 59 Substanzen erstmals in Rhabarber beschrieben wurden. 23 Alkohole, 8 Aldehyde, 15 Ester, 4 Ketone, 16 Säuren, und 12 Verbindungen aus anderen Stoffklassen wurden erfasst. Die Gesamtmenge der isolierten flüchtigen Verbindungen betrug etwa 5 mg/kg.

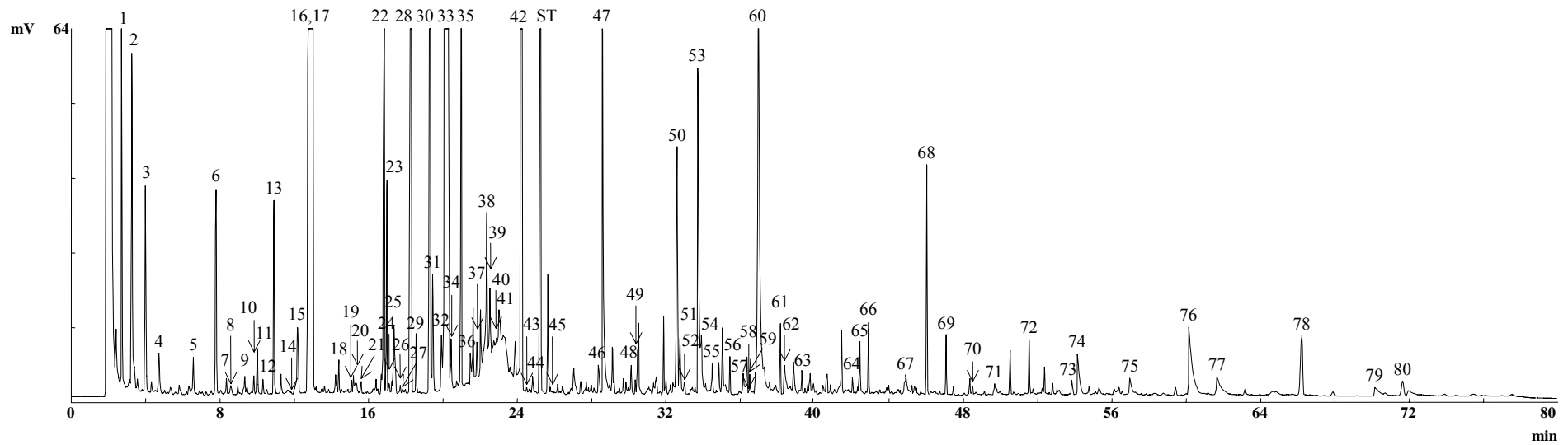


Abbildung 4.1.1

Kapillargaschromatographische Trennung (DBWAX) der mittels Vakuum Headspace Technik aus Rhabarberstielen isolierten flüchtigen Komponenten

(Die angegebenen Nummern entsprechen den Verbindungen in Tabelle 4.1.1; Bedingungen siehe Material und Methoden; ST: Interner Standard, 1-Octanol)

Tabelle 4.1.1 Quantitative Verteilung der mittels VHS aus Rhabarberstielen isolierten flüchtigen Komponenten

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a</sup>			
			I	Charge <sup>c</sup> II	III	
<i>Alkohole</i>						
5	1-Propanol	1040	319 $\pm$ 48	214 $\pm$ 10	137	d
7	2-Methylpropanol	1093	5 $\pm$ 1	5.0 $\pm$ 0.4	4	d
12	1-Butanol	1145	9 $\pm$ 2	5 $\pm$ 0.1	4	d,g
16	2-Methylbutanol	1213	358 $\pm$ 52	328 $\pm$ 53	304	d
18	1-Pentanol	1253	2.9 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ <0.1	3	d
9	2-Pentanol	1121	2.7 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.3	3	d
8	3-Pentanol	1101	1.0 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2	1	d
13	1-Penten-3-ol	1162	35 $\pm$ 4	23 $\pm$ 1	24	d
23	(Z)-2-Pentenol	1322	12 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	9	e
24	3-Methylpentanol	1325	<1	<1	<1	d
22	4-Methylpentanol	1317	30 $\pm$ 3	21 $\pm$ 2	32	d
31	4-Methyl-3-penten-1-ol	1390	9 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	7	f
28	Hexanol	1358	89 $\pm$ 14	63 $\pm$ 7	74	d,g
33	(E)-2-Hexenol	1414	1711 $\pm$ 170	1194 $\pm$ 180	1241	d
34	(Z)-2-Hexenol	1418	3.2 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.2	3	d
29	(E)-3-Hexenol	1365	10 $\pm$ 1	6.4 $\pm$ 0.4	10	d
30	(Z)-3-Hexenol	1385	79 $\pm$ 12	61 $\pm$ 6	139	d
32	Cyclohexanol	1403	70 $\pm$ 21	3.1 $\pm$ 0.2	22	d
35	4-Methylhexanol	1434	24 $\pm$ 5	18 $\pm$ 2	30	d
40	2-Ethylhexanol	1490	1.1 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	<1	d
69	Hexadecanol	2383	11 $\pm$ 2	20 $\pm$ 4	11	d
55	Benzylalkohol	1874	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	9	d,g
56	2-Phenylethanol	1910	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	11	d,g
<i>Aldehyde</i>						
10	(E)-2-Pentenal	1134	2.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.2	2	d
6	Hexanal	1077	132 $\pm$ 25	122 $\pm$ 36	6	d,g
17	(E)-2-Hexenal	1216	1077 $\pm$ 158	989 $\pm$ 160	916	d
15	(Z)-2-Hexenal	1196	7 $\pm$ 2	4.3 $\pm$ 0.3	6	e
11	(Z)-3-Hexenal	1138	27 $\pm$ 8	29 $\pm$ 11	11	d
43	(E)-2-Nonenal	1533	<1	<1	<1	d
45	(E,Z)-2,6-Nonadienal	1592	<1	<1	<1	e
41	Decanal	1496	17.2 $\pm$ 0.4	11 $\pm$ 1	6	d,g



Tabelle 4.1.1 (Fortsetzung)

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a</sup>			
			I	Charge <sup>c</sup>		III
				II		
<b>Ester</b>						
1	Ethylformiat	814	18 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	19	d
2	Ethylacetat	856	20 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2	22	d,g
19	Hexylacetat	1271	1 $\pm$ 0.1	<1	<1	d
20	2-Methylbutyl- 2-methylbutanoat	1276	<1	<1	<1	e
21	Methyl-(E)-2-hexenoat	1284	1.8 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	<1	d
27	Ethyl-(E)-2-hexenoat	1345	<1	<1	<1	d
25	(E)-2-Hexenylacetat	1333	4 $\pm$ 1	3.2 $\pm$ 0.4	8	d
38	(E)-2-Hexenylbutanoat	1475	17 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3	12	d
46	(E)-2-Hexenylhexanoat	1663	2.7 $\pm$ 0.2	3 $\pm$ 1	5	d
37	(E)-3-Hexenylbutanoat	1452	1.8 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.1	2	e
50	(E)-2-Hexenyl- (E)-2-hexenoat	1805	9 $\pm$ 5	4 $\pm$ 2	14	e
62	Isopropylmyristat	2040	<1	<1	2	d
72	Diisobutylphthalat	2592	3.9 $\pm$ 0.4	3 $\pm$ 1	3	f,h
73	Dibutylphthalat	2693	4.4 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.2	2	d,h
80	Di(2-ethylhexyl)phthalat	3160	56 $\pm$ 5	119 $\pm$ 5	73	d
<b>Ketone</b>						
4	3-Pentanon	956	6 $\pm$ 1	3.5 $\pm$ 0.4	3	e
26	6-Methyl-5-hepten-2-on	1341	<1	<1	<1	e
54	(E)-Geranylaceton	1853	1.2 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ <0.1	4	d
39	2,6,6-Trimethyl-2-vinyl- tetrahydropyran-3-on	1478	4.2 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.1	4	f
<b>Säuren</b>						
36	Essigsäure	1449	14 $\pm$ 3	9 $\pm$ 1	4	d
47	2-Methylbuttersäure	1670	43 $\pm$ 19	96 $\pm$ 26	187	d
51	4-Methylpentansäure	1813	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	56	d
53	Hexansäure	1846	33 $\pm$ 13	54 $\pm$ 1	18	d,g
57	4-Methylhexansäure	1936	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	2	d
60	(E)-2-Hexensäure	1967	142 $\pm$ 69	351 $\pm$ 48	516	d
59	(E)-3-Hexensäure	1948	29 $\pm$ 4	17 $\pm$ 2	27	d
63	Octansäure	2056	3.1 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.3	3	d,g
64	Nonansäure	2165	2.4 $\pm$ 0.2	2 $\pm$ 1	2	d,g,h
67	Decansäure	2286	2.4 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.4	3	d,g,h
71	Dodecansäure	2480	2.2 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1	3	d,g
74	Tetradecansäure	2706	19 $\pm$ 5	38 $\pm$ 9	33	d,g
75	Pentadecansäure	2819	38 $\pm$ 8	52 $\pm$ 7	54	d,g

Tabelle 4.1.1 (Fortsetzung)

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration (µg/kg) <sup>a</sup>				
			I	Charge <sup>c</sup> II		III	
76	Hexadecansäure	2913	196 ± 41	340 ± 62		359	d,g
77	9-Hexadecensäure	2957	1.1 ± 0.2	3 ± 1		4	f
79	Octadecansäure	3132	2.4 ± 0.3	3 ± 1		2	d
<i>Sonstige</i>							
14	Limonen	1192	2.2 ± 0.4	1.5 ± 0.4		5	d
44	Linalool	1548	<1	<1		<1	d
65	Sesquiterpen (MW:204)	2180	3 ± 1	5 ± 1		3	f
68	Sesquiterpen (MW:204)	2201	1.9 ± 0.4	7 ± 3		4	f
78	Squalen	3058	136 ± 28	276 ± 128		127	d
58	β-Ionon	1943	<1	<1		<1	d
52	Anethol	1820	1.3 ± <0.1	1.1 ± 0.1		<1	d,g
68	p-Allylphenol	2338	14 ± 0.2	12 ± 1		10	e
61	Methyleugenol	2013	7 ± 1	3 ± 1		4	d,g
48	1,2-Dimethoxybenzol	1721	1.1 ± <0.1	1.7 ± 0.1		3	d
49	1,4-Dimethoxybenzol	1728	2.1 ± 0.2	1.4 ± <0.1		1	d
70	Indol	2336	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.3		<1	d

<sup>a</sup> Mittelwerte aus 3 Bestimmungen pro Charge ± Standard Fehler. <sup>b</sup> Die Nummern entsprechen den Verbindungen in Abbildung 4.1.1. Nummer 42 (ein nicht-identifiziertes und nicht-reproduzierbares Artefakt) und Nummer 3 Ethanol (Lösungsmittel für den internen Standard), sind nicht aufgeführt. <sup>c</sup> Untersuchungsmaterial aus 2001, III Vereinigter Extrakt (hergestellt aus Aliquoten von 15 Extrakten). Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte <sup>d</sup> mit Hilfe von Referenzsubstanzen; <sup>e</sup> durch Vergleich der kapillargaschromatographischen (Retentionszeit-Kovats-Index) und massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben; <sup>f</sup> durch Vergleich der massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben. Verbindungen identifiziert im Wurzelstock von Rhabarber von <sup>g</sup> Miyazawa *et al* (1996). <sup>h</sup> Frattini *et al* (1974). KI: Kovats Indices.

### *C<sub>6</sub>-Komponenten*

Im Gegensatz zu den Rhizomen (*Rheum palmatum* L. und *Rhei sinensis radix*), in denen Sesquiterpene, Terpene und Benzol-Derivate die wichtigsten flüchtigen Verbindungen darstellen [Frattini et al, 1974, 1976; Miyazawa et al, 1996], gehören ca. 65% der mittels VHS aus Rhabarberstielen isolierten flüchtigen Inhaltsstoffe zu den C<sub>6</sub>-Komponenten.

Die Stoffgruppe umfasst überwiegend ungesättigte Komponenten, wobei Aldehyde wie (E)-2-Hexenal, (Z)-2-Hexenal und (Z)-3-Hexenal sowie die entsprechenden Alkohole (E)-2-Hexenol, (E)-3-Hexenol und (Z)-3-Hexenol dominieren. Darüberhinaus wurden die in pflanzlichen Systemen seltener vorkommenden C<sub>6</sub>-Säuren ((E)-2- und (E)-3-Hexensäure) als relativ konzentrationsstarke Komponenten nachgewiesen.

Bei den C<sub>6</sub>-Verbindungen handelt es sich um Produkte der enzymatisch-oxidativen Spaltung ungesättigter Fettsäuren. Vorstufen sind Linol- und Linolensäure, die durch Hydrolasen aus den Triglyceriden freigesetzt und unter Einwirkung von Lipoxygenase mit Sauerstoff in Hydroperoxide überführt werden. Aus den Fettsäure-Hydroperoxiden werden durch Hydroperoxid-Lyasen Aldehyde gebildet, die durch nachfolgende Reduktionen zum Teil in Alkohole überführt werden [Hatanaka, 1999; Shahidi, 2000; Schwab und Schreier, 2002]. Diese enzymatisch-hydrolytischen und -oxidativen Vorgänge laufen mit hoher Geschwindigkeit nach der Zerstörung des Gewebes ab, wobei aromaintensive Komponenten in wesentlichen Mengen gebildet werden [Drawert et al, 1973; Hatanaka und Harada, 1973; Buttery et al, 1987; Bartley und Schwede, 1989; Takeoka et al, 1990].

Diese "sekundären Aromastoffe" sind in pflanzlichen Systemen weit verbreitet und tragen mit ihrem frischen, grünen und teilweise fruchtigen Geruch [Hatanaka et al, 1992] zum typischen Charakter vieler Obst- und Gemüsearten bei. Außerdem sind die C<sub>6</sub>-Verbindungen nicht nur als Aromakomponenten von Bedeutung sondern zeigen auch andere Effekte, wie z.B. antimikrobielle Wirkung [Deng et al, 1993; Andersen et al, 1994; Hamilton-Kemp et al, 1995] oder Inhibierung der Pollen-Keimung [Gardner et al, 1990; Hamilton-Kemp et al, 1991; Hamilton-Kemp et al, 1995]. Die Aldehyde und Alkohole spielen eine besondere Rolle als Abwehr- und Lockmittel verwundeter Pflanzen für Insekten sowie als Bestandteile von Pheromonen [Hansson et al, 1999; Reddy und Guerro, 2000].

Die in Stielen nachgewiesenen ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren kommen in pflanzlichen Systemen selten vor. (E)-2-Hexensäure wurde unter anderem in der Rambai Frucht [Wong et al, 1994], in einer weißen Weintraubensorte [Rocha et al, 2000], in Kieferspinnen-Tee [Kim und Chung, 2000], in gekochtem Darjeeling-Schwarztee [Kawakami et al, 1995], in Orangensaft

[Näf et al, 1996] und in dem Öl grüner Minze [Tsuneya et al, 1998] identifiziert. Berichte über das Vorkommen der (E)-3-Hexensäure sind in der Literatur noch seltener. Sie wurde in schwarzem Tee [Mick et al, 1984], in Brotfrüchten [Iwaoka et al, 1994] und in Fisch-Soße [Peralta et al, 1996] nachgewiesen.

Neben den C<sub>6</sub>-Alkoholen und Säuren wurden auch entsprechende Ester (Hexylacetat, (E)-2-Hexenylacetat, (E)-2-Hexenylbutanoat, (E)-2-Hexenylhexanoat, (E)-2-Hexenyl-2-hexenoat und (E)-3-Hexenylbutanoat) nachgewiesen. Mit Ausnahme von (E)-2-Hexenylbutanoat und (E)-2-Hexenyl-2-hexenoat liegen die Ester in Konzentrationen <5 ppb vor. Dieser geringe Gehalt an Estern paßt zu der Tatsache, dass Rhabarber von botanischen Standpunkt in die Gruppe der Gemüse gehört, obwohl er aufgrund seines Geschmacks eher als Obst verwendet wird.

Die C<sub>6</sub>-Komponenten, besonders die ungesättigten Aldehyde, sind als reaktionsfreudige Verbindungen bekannt, die auf verschiedenen Wegen (Autoxidation, Isomerisierung, Retro-Aldol Kondensation) in zahlreiche Verbindungen überführt werden [Schieberle und Grosch, 1981; Fischer und Grosch, 1988 und 1991; Grein et al, 1993]. Takeoka et al (1986) konnten zeigen, dass eine rasche Veränderung (überwiegend durch Oxidation) in der Zusammensetzung eines Kiwi-Extraktes während der dreimonatigen Lagerung bei -10°C stattfindet. Die Rhabarber-Extrakte wurden deshalb nach der Konzentrierung möglichst schnell, innerhalb von 6 Stunden untersucht und bis zur gaschromatographischen (GC) Analyse bei -18°C gelagert.

Um die chemische Bildung von (E)-2- und (E)-3-Hexensäure während der Isolierung auszuschließen, wurden Modellversuche mit wässriger Lösung (pH 3.5) von (E)-2-Hexenal unter den gleichen VHS-Bedingungen durchgeführt. In den Extrakten wurden keine der typischen Abbau-Produkte von (E)-2-Hexenal detektiert, weder die ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren noch Hydroxy-Aldehyde [Grain et al, 1993].

### *C<sub>9</sub>-Komponenten*

Neben den C<sub>6</sub>-Verbindungen wurden mit den ungesättigten C<sub>9</sub>-Aldehyden (E)-2-Nonenal und (E,Z)-2,6-Nonadienal zwei Vertreter einer anderen Gruppe von Lipidoxidationsprodukten gefunden. Sie sind als aromaintensive Komponenten zerkleinerter Gurken bekannt und weisen einen grünen, ölartigen, talgigen ((E)-2-Nonenal) bzw. einen grünen, frischen, typischen Gurkengeruch ((E,Z)-2,6-Nonadienal) auf [Forss et al, 1962; Schieberle et al, 1990]. Sie wurden im Spurenbereich (<1 µg/kg) detektiert. Eine aussagekräftige Quantifizierung dieser

Minorkomponenten ist mit der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Methodik nicht zu erzielen. Hier wäre es notwendig, andere Methoden, wie z.B. die Isotopenverdünnungsanalyse einzusetzen [Schieberle, 1995; Blank und Milo, 1999]. Diese Methode stellt ein ideales Verfahren zur Quantifizierung labiler Verbindungen im Spurenbereich dar [Schieberle und Grosch, 1987; Münch und Schieberle, 1998; Majcenovic et al, 2002].

#### *Methylverzweigte Komponenten*

Eine weitere wichtige Gruppe flüchtiger Inhaltsstoffe von Rhabarberstielen stellen methylverzweigte Verbindungen dar. 2-Methylbutanol und 2-Methylbuttersäure sind die konzentrationsstärksten Vertreter. Sie gehen aus der Aminosäure Isoleucin hervor [Rowan et al, 1996; Perez et al, 2002] und wurden oft zusammen mit anderen 2- oder 4-methylverzweigten Verbindungen in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln nachgewiesen [Kimland et al, 1973; Idstein et al, 1985; Brennand und Lindsay, 1992; Molimard und Spinnler 1996; Shimoda et al, 1996; Young et al, 1996; Schumacher et al, 1998].

4-Methylhexanol ist seltener als flüchtiger Inhaltsstoff von Pflanzen und Lebensmitteln zu finden. Bisher wurde diese Verbindung in der Tabak-Pflanze [Kandra und Wagner, 1998; Loughrin et al, 1990], in Fisch-Soße [Shimoda et al, 1996], in Schalen von Zedratzitrone [Fleischer und Fleischer, 1991] sowie in Annatto [Galindo-Cuspinera et al, 2002] beschrieben. Die entsprechende Säure (4-Methylhexansäure) wurde ebenfalls im Extrakt identifiziert. Sie ist bisher nur in Tabak [Chuman und Noguchi, 1977; Kimland et al, 1973; Ha und Lindsay, 1991] nachgewiesen worden. Sie kommt hingegen in vielen Lebensmitteln tierischer Herkunft vor, z.B. in Hammelfleisch [Wong et al, 1975], in Kuhmilch [Ha und Lindsay, 1990] oder in Ziegenkäse [Le Quere et al, 1998]. Zusammen mit 4-Methylpentansäure wurde sie in Fischsoße [Sanceda et al, 1999], in italienischer Provolone und in Romano Käse [Ha und Lindsay, 1991] nachgewiesen. Die methylverzweigten Säuren sind oft für unangenehme und negative Gerüche von Lebensmitteln verantwortlich. Sie verursachen zusammen mit anderen kurzkettigen Fettsäuren z.B. den käseartigen Geruch von Fischsoße [Sanceda et al, 1999] oder von gelagertem Hopfen [Tressl et al, 1978].

#### *Säuren*

Neben den erwähnten ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren und den methylverzweigten Säuren wurde die homologe Reihe geradzahlicher (Ausnahmen: Nonansäure und Pentadecansäure) Fettsäuren isoliert.

Wie im Kapitel *Grundlagen* diskutiert, spielen die Fruchtsäuren eine wichtige Rolle für den Geschmack von Rhabarber [Vogel, 1996; Derndorfer und Elmadfa, 2000]. Die wichtigsten Vertreter Äpfelsäure, Oxalsäure und Zitronensäure konnten in den mittels VHS gewonnenen Extrakten auch nach Silylierung und kapillargaschromatographischer Untersuchung an einer DB-1 Trennsäule nicht detektiert werden. Modellversuche mit Referenzsubstanzen zeigten, dass Äpfelsäure, Oxalsäure und Zitronensäure aus wässriger Lösung (pH 3.5) weder während des Destillationsschritts (Wiederfindung <0,01 %) noch durch Extraktion (Wiederfindung <0,1%) erfasst werden.

### *Sonstige Komponenten*

6-Methyl-5-hepten-2-on, (E)-Geranylaceton sowie  $\beta$ -Ionon wurden im Spurenbereich (<1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) nachgewiesen. Sie sind bekannt als Abbau-Produkte von Carotinoiden [Weeks, 1986; Buttery und Ling, 1993], die in Rhabarber in kleiner Menge (z.B.  $\alpha$ -Carotin 0.001mg,  $\beta$ -Carotin 0.031 mg und Lutein 0,131 mg/100 g) vorhanden sind [Müller, 1997].

Squalen wurde u.a. in der flüchtigen Fraktion von Süßkartoffeln [Wang und Kays, 2000], in Orangensaft [Näf et al, 1996], in Apfeln [Lu und Foo, 1998] und in Pekea Fruchtpulpe [Marx et al, 1997] beschrieben. Besonders reich an dieser Verbindung sind bestimmte Seetieröle, Amaranthöl sowie Oliven- und Reisöle [He et al, 2002; Jahaniaval et al, 2000].

Von den im Wurzelstock beschriebenen Benzol-Derivaten [Miyazawa et al, 1996] wurden Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Anethol und Methyleugenol gefunden.

Die identifizierten Phthalsäureester (Diisobutylphthalat, Dibutylphthalat und Di(2)-Ethylhexylphthalat) wurden in Extrakten verschiedener pflanzlicher und tierischer Materialien nachgewiesen [Ramarathnam et al, 1993; Umamo et al, 1999; Chung et al, 2001; Lamikanra und Richard 2002]. Dibutylisobutylphthalat, Diisobutylphthalat und Dibutylphthalat sind auch in den ersten Arbeiten über die flüchtigen Inhaltsstoffe der Rhizome von Medizinal-Rhabarber identifiziert worden [Frattini et al, 1974]. Aufgrund ihrer Rolle als Weichmacher bei der Herstellung von Plastikmaterialien werden sie meist als Kontaminationsprodukte diskutiert [Di Bella et al, 1999; 2001]. Es wurde auch beschrieben, dass sie als Hautausscheidungsprodukte bei der Aufarbeitung der Proben in die Extrakte gelangen können [Spiteller, 1973].

Die sensorische Bewertung schwefelhaltiger Komponenten hatte gezeigt, dass Vertreter von Mercaptoalkoholen und Mercaptoketonen Rhabarbergeruch besitzen [Schellenberg, 2002; Vermeulen et al, 2003]. Unter Verwendung eines flammenphotometrischen Detektors (FPD)

konnten jedoch keine schwefelhaltigen Komponenten in den VHS-Extrakten detektiert werden. Um auszuschliessen, dass dieser negative Befund hinsichtlich des Vorkommens schwefelhaltiger Aromastoffe in Rhabarberstielen auf die angewandte Isolierungstechnik zurückzuführen ist, wurden mit 3-Mercaptohexanol als Referenzsubstanz Wiederfindungsversuche durchgeführt. Es zeigte sich, dass mittels VHS ca. 60 % der eingesetzten schwefelhaltigen Verbindung wiedergefunden wurden.

#### 4.1.3 Sensorische Bewertung des Vakuum Headspace Extraktes

Die aromaaktiven Komponenten ungekochter Rhabarberstiele wurden mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) ermittelt [Ullrich und Grosch, 1987; Schieberle, 1995]. Als Ausgangsmaterial wurde der in Tabelle 4.1.1 aufgeführte VHS-Extrakt III verwendet, d.h. ein Extrakt, der durch Vereinigen aliquoter Anteile von 15 Extrakten verschiedener Chargen gewonnen worden war. Der einen typisch grünen, an frisch geschälte Rhabarberstiele erinnernden Geruch aufweisende Extrakt wurde schrittweise mit Pentan-Diethylether (1:1, v/v) im Verhältnis 1:1 (v/v) verdünnt und jede Verdünnung gaschromatographisch-olfaktometrisch untersucht.

##### *Intensive Aromastoffe von Rhabarberstielen*

Bei der Untersuchung mittels GC/O wurden 18 geruchsaktive Substanzen detektiert (Tabelle 4.1.2). Die höchsten FD-Faktoren wurden für die beiden C<sub>6</sub>-Verbindungen (Z)-3-Hexenal (FD: 2048) und (Z)-3-Hexenol (FD: 512) ermittelt. Auch andere Vertreter dieser Stoffklasse, wie Hexanal, (E)-2-Hexenal und Hexanol, erwiesen sich mit einem FD-Faktor von 256 als aromaintensive Komponenten.

Die GC/O-Bewertung dieser C<sub>6</sub>-Komponenten im unverdünnten Extrakt (Beschreibungen siehe Tabelle 4.1.2) ergab, dass alle einen typischen grün-grasartigen Geruch aufwiesen. In Abhängigkeit von der funktionellen Gruppe und der Position der Doppelbindung wurde diese Grundrichtung durch spezifischere Noten überlagert. So überwog bei Hexanal, (Z)-3-Hexenal und (Z)-3-Hexenol die grasige Note, während (E)-2-Hexenal eine leicht fruchtige Apfelnote aufwies, die am Peakende in einen bittermandelartigen Geruch überging. Der Geruch von Hexanol konnte als fruchtig, zitronenartig beschrieben werden. Solche Unterschiede im "grünen Charakter" der C<sub>6</sub>-Verbindungen, z.B. grasartig-grün, blätterartig-grün, fruchtig-grün, würzig-grün, fettig-grün sind in vielen Studien zu finden [Whitehead et al, 1995; Reiners und

Grosch, 1998; Luning et al, 1994]. In der als letzten zitierten Arbeit, in der die C<sub>6</sub>-Aldehyde und Alkohole als wesentliche Bestandteile von Paprika gefunden wurden, wurden beispielweise Hexanal mit “grün, pflanzlich, grüne Paprika”, (Z)-3-Hexenal mit “grasartig, grün, grüne Paprika, fruchtig”, (E)-2-Hexenal mit “fruchtig, Mandel, würzig, süß” und (E)-2-Hexenol mit “Mandel, fruchtig, würzig” beschrieben. Diese unterschiedlichen Geruchsnoten bestätigen die systematischen Untersuchungen von Hatanaka et al (1992) zum Zusammenhang zwischen Struktur und grüner Geruchsqualität der C<sub>6</sub>-Aldehyde und Alkohole. Sie beschrieben die Position der Doppelbindung als wichtigstes Kriterium für den ausgeprägten frisch-fruchtig süßen und weniger grünen Geruch. Die Verbindungen mit Doppelbindung in Position 2 wurden am stärksten mit den Attributen fruchtig, süßlich bewertet. Die Verbindungen mit der Doppelbindung in Position 4 oder 5 besitzen hingegen einen mehr ölig-fettigen, herben, insektenartig-grünen Geruch. Die funktionelle Gruppe erwies sich als verantwortlich für einen stärker ausgeprägten grünen-würzigen Geruch. Die Alkohole zeigen im Vergleich zu den Aldehyden eine fruchtig-süßlichere, grüne Note.

Neben den C<sub>6</sub>-Verbindungen wurden mit (E,Z)-2,6-Nonadienal und (E)-2-Nonenal (jeweils FD: 256) zwei weitere Lipidoxidationsprodukte als sensorisch wichtige Komponenten der Rhabarberstiele detektiert. Fruchtig-blumige Noten zeigten β-Ionon, Linalool und 2-Phenylethanol, wobei β-Ionon den höchsten FD-Faktor (256) aufwies. Als weitere aromarelevante Komponenten erwiesen sich die methylverzweigten Komponenten 4-Methylhexanol (FD: 128; nussartig, röstig, kratzend) und 2-Methylbuttersäure (FD: 64; stechend, Käse) sowie als Vertreter der Säuren Hexansäure (FD: 32; stechend, säuerlich) und das ungesättigte Homologe (E)-2-Hexensäure (fruchtig, sauer).

#### *Beurteilung der Aromarelevanz*

Zur Beurteilung der Aromarelevanz einer flüchtigen Verbindung dient der sogenannte Aromawert, das Verhältnis aus Konzentration und Geruchsschwelle [Rothe und Thomas, 1963; Guadagni et al, 1963]. Da Rhabarber einen Wassergehalt von 92-95 % aufweist [Souci et al, 2000], wurden nasale Schwellenwerte in Wasser zur Berechnung herangezogen. Für 4-Methylhexanol und (E)-2-Hexensäure wurden die Geruchsschwellenwerte selbst bestimmt. Die anderen in Tabelle 4.1.2 aufgeführten Geruchsschwellen wurden der Literatur entnommen.

Hohe Aromawerte ergaben sich für die Vertreter der C<sub>6</sub>-Komponenten, wie (E)-2-Hexenal (54), (Z)-3-Hexenal (44), Hexanal (17) und (E)-2-Hexenol (12), die dadurch als potentielle



Komponenten, die für das Aroma von Rhabarberstielen verantwortlich sind, angesehen werden können. Hohe Aromawerte von 43 bzw. 40 wurden auch für die nur als Spurenkomponenten detektierten  $\beta$ -Ionon und (E,Z)-2,6-Nonadienal berechnet. Zur endgültigen Bewertung des Beitrags dieser Verbindungen zum Rhabarberstielaroma wäre jedoch eine exakte Quantifizierung z.B. mittels Isotopenverdünnungsanalyse erforderlich.

Auf keiner der Verdünnungsstufen konnte eine Geruchsnote detektiert werden, die darauf hindeutete, dass die in der Literatur mit Rhabarbernoten in Verbindung gebrachten Mercaptoalkanole und -alkanone [Schellenberg, 2002; Vermeulen et al, 2003] in dem Extrakt enthalten waren.

Tabelle 4.1.2 Sensorische Bewertung flüchtiger Inhaltsstoffe von Rhabarberstielen mittels GC/O <sup>a</sup>

No. <sup>b</sup>	Verbindung	Geruch <sup>c</sup>	FD-Faktor <sup>d</sup>	Geruchsschwelle (µg/L in Wasser)	Konzn. <sup>j</sup> (µg/kg)	AW <sup>k</sup>
6	Hexanal	grün, Gras	256	4.5 <sup>e</sup>	76	17
11	(Z)-3-Hexenal	grün, Gras	2048	0.25 <sup>e</sup>	11	44
13	1-Penten-3-ol	grün	4	400 <sup>e</sup>	24	0.1
16	2-Methylbutanol	bitter, medizinisch, muffig	16	320 <sup>f</sup>	304	1
17	(E)-2-Hexenal	grün, Gras, Apfel, Bittermandel	256	17 <sup>e</sup>	916	54
28	Hexanol	grün, fruchtig, Zitrusfucht	256	2500 <sup>g</sup>	74	0.03
30	(Z)-3-Hexenol	grün, Gras	512	70 <sup>e</sup>	139	2
33	(E)-2-Hexenol	grün, fruchtig	16	100 <sup>h</sup>	1241	12
35	4-Methylhexanol	grün, nussig, röstig, ölig, Karotten	128	2000	30	0.02
41	Decanal	Karotten, Zitrusfrucht	16	2 <sup>g</sup>	6	3
43	(E)-2-Nonenal	Karotten, fettig	256	0.08 <sup>g</sup>	0.4	5
44	Linalool	Zitrusfrucht, Zitrone, süß	128	6 <sup>e</sup>	0.6	0.1
45	(E,Z)-2,6-Nonadienal	Gurken, blumig	256	0.01 <sup>f</sup>	0.4	40
47	2-Methylbuttersäure	stechend, Käse, sauer	64	540 <sup>f</sup>	187	0.3
53	Hexansäure	stechend, sauer	32	3000 <sup>e</sup>	56	0.02
56	2-Phenylethanol	bitter-blumig, Kamille	32	1100 <sup>e</sup>	11	0.01
58	β-Ionon	süß, blumig, Veilchen	256	0.007 <sup>e</sup>	0.3	43
60	(E)-2-Hexensäure	fruchtig, sauer	8	300	516	1.7

<sup>a</sup> Material von 2001. <sup>b</sup> Die Nummern entsprechen den Verbindungen in Abbildung 4.1.1. <sup>c</sup> Geruchsqualität der Verbindung in unverdünntem Extrakt am Sniffing-Port. <sup>d</sup> Die FD-Faktoren der Verbindungen wurden mittels AEVA bestimmt (s. *Material und Methoden*). Die Geruchsschwellenwerte stammen aus der Literatur: <sup>e</sup> *Buttery et al, (1990)* <sup>f</sup> *Rychlik et al, (1998)*, <sup>g</sup> *Buttery et al, (1988)*, <sup>h</sup> *Larsen und Poll (1992)*. <sup>j</sup> Konzentration bestimmt in einem vereinigten Extrakt (Aliquoten aus 15 Extrakten) <sup>k</sup> Die Aromawerte wurden aus den Konzentrationen der Aromastoffe im vorliegenden Lebensmittel geteilt durch ihre Geruchsschwellenwerte berechnet.

#### 4.1.4 Einfluss enzymkatalysierter Reaktionen auf das Spektrum von C<sub>6</sub>-Verbindungen

C<sub>6</sub>-Verbindungen werden bei Zerstörung pflanzlichen Gewebes durch enzymkatalysierte Fragmentierung ungesättigter Fettsäuren sehr schnell gebildet. Dieses originäre Spektrum kann jedoch durch nachfolgende Reaktionen (Reduktion, Isomerisierung) rasch verändert werden.

Nachdem die C<sub>6</sub>-Verbindungen sich als wichtig für das Aroma ungekochter Rhabarberstiele erwiesen hatten, stellte sich die Frage, inwiefern das nach Zerkleinern freigesetzte Spektrum an C<sub>6</sub>-Verbindungen durch nachfolgende enzymkatalysierte Reaktionen modifiziert wird. Daher wurde die Isolierung mittels VHS zusätzlich unter enzym-inhibierenden Bedingungen durchgeführt. Durch Inhibierung enzymkatalysierter Reaktionen nach 3 Min. sollte versucht werden, das C<sub>6</sub>-Spektrum frisch geschälter Rhabarberstiele zu „fixieren“.

Verschiedene Varianten der Enzyminhibierung sind erfolgreich bei Früchten und Gemüsen eingesetzt worden. Gesättigte NaCl-Lösung wurde u.a. bei der Untersuchung flüchtiger Aromastoffe von Brotfrucht [Iwaoka et al, 1994] und von Aloe Blättern [Umano et al, 1999] verwendet. In Kiwi-Früchten wurden die Enzyme mit Hilfe von 0.01M SnCl<sub>2</sub> inhibiert [Bartley und Schwede 1989]. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde bei Aprikosen [Guichard und Souty 1988] und bei Oliven [Ridolfi et al, 2002] und CaCl<sub>2</sub> bei Kirschen [Girard und Kopp, 1998] benutzt. CaCl<sub>2</sub> zeigte sich auch für Tomaten am besten geeignet, da im Gegensatz zu NaCl keine Isomerisierung von (Z)-3-Hexenal zu (E)-2-Hexenal bei der Verwendung dieses Inhibitors nach 3 h beobachtet wurde [Buttery et al, 1987]. In Analogie zu dieser bei Tomaten angewandten Strategie wurden die nach Zerkleinerung des pflanzlichen Materials einsetzenden enzymkatalysierten Reaktionen beim Rhabarber nach 3 Min. durch Zusatz gesättigter CaCl<sub>2</sub>-Lösung inhibiert.

In *Abbildung 4.1.2* sind typische HRGC-Chromatogramme der unter inhibierenden bzw. nicht-inhibierenden Bedingungen gewonnenen VHS-Extrakte dargestellt. Die Gehalte und prozentualen Verteilungen der C<sub>6</sub>-Komponenten sind in *Tabelle 4.1.3* zusammengestellt.

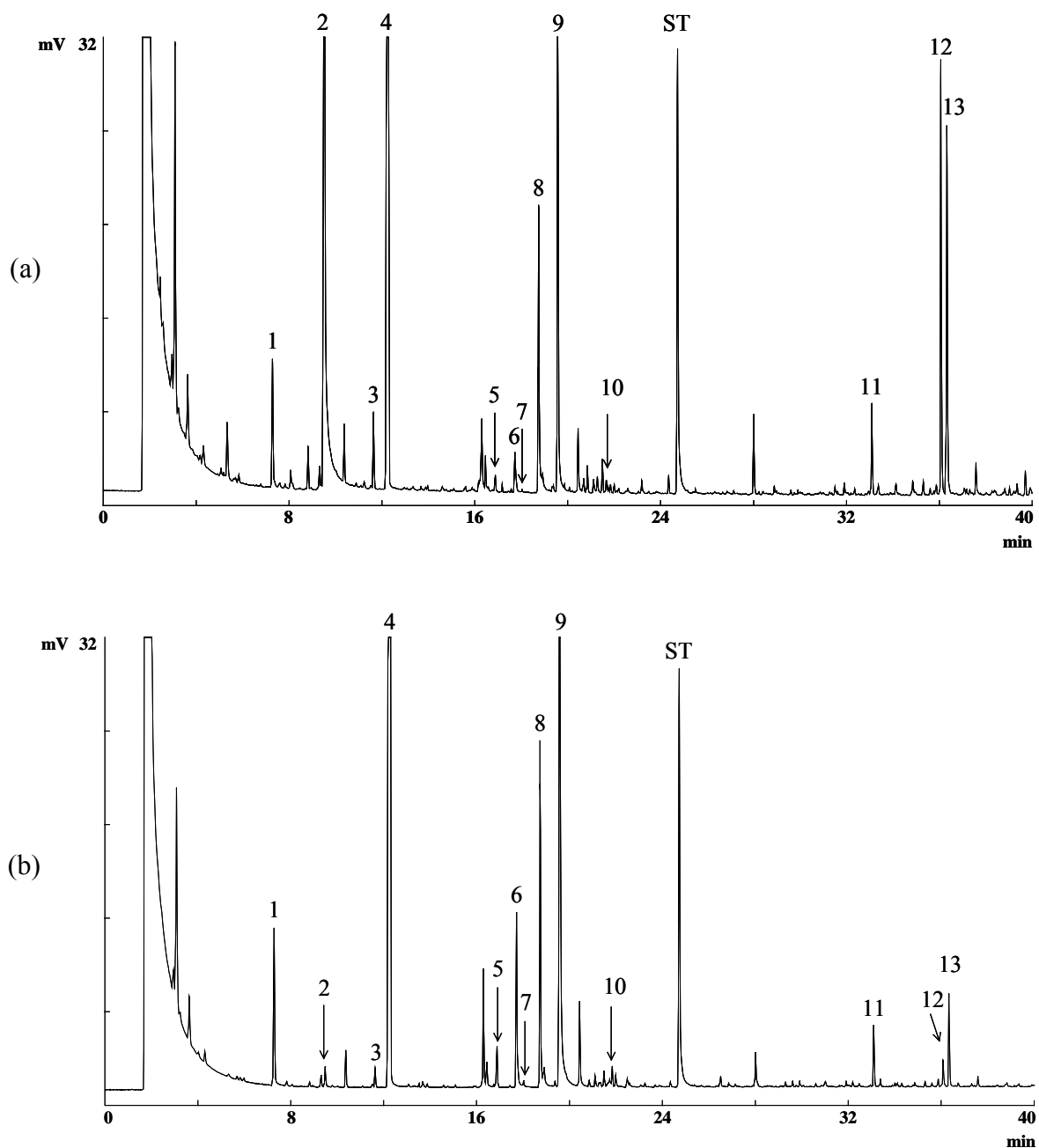


Abbildung 4.1.2 C<sub>6</sub>-Komponenten isoliert mittels VHS aus Rhabarber

- (a) unter inhibierenden Bedingungen (mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung)  
(b) unter nicht-inhibierenden Bedingungen (mit Wasser)

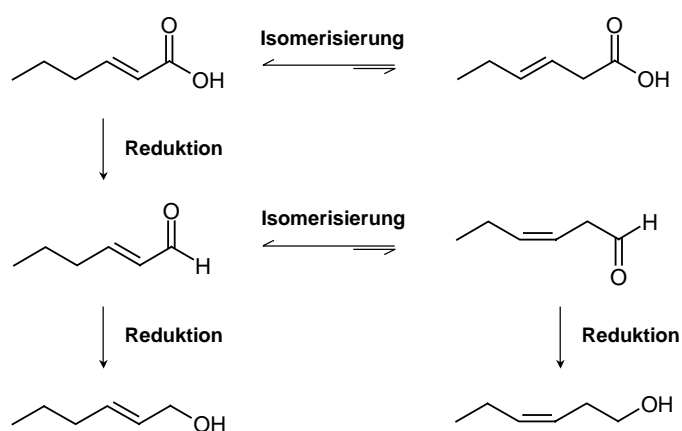
1. Hexanal, 2. (Z)-3-Hexenal, 3. (Z)-2-Hexenal, 4. (E)-2-Hexenal, 5. (E)-2-Hexenylacetat, 6. Hexanol, 7. (E)-3-Hexenol, 8. (Z)-3-Hexenol, 9. (E)-2-Hexenol, 10. (E)-2-Hexenylbutanoat, 11. Hexansäure, 12. (E)-3-Hexensäure, 13. (E)-2-Hexensäure.

Tabelle 4.1.3 Konzentrationen und prozentuale Verteilungen von C<sub>6</sub>-Komponenten in Rhabarber <sup>a</sup>

Verbindung	inhibiert <sup>b</sup>		nicht-inhibiert <sup>b</sup>			
	(µg/kg)	%	mit Wasser		ohne Wasser	
	(µg/kg)	%	(µg/kg)	%	(µg/kg)	%
<b>Aldehyde</b>						
Hexanal	217 ± 9	4.8	323 ± 27	8.6	131 ± 16	4.4
(Z)-3-Hexenal	1785 ± 457	39.8	31 ± 3	0.8	38 ± 9	1.3
(Z)-2-Hexenal	18 ± 2	0.4	8 ± 3	0.2	5 ± 2	0.2
(E)-2-Hexenal	1484 ± 50	33.2	2077 ± 74	55.0	922 ± 106	31.0
		Σ: 78.2		Σ: 64.6		Σ: 36.9
<b>Alkohole</b>						
Hexanol	8 ± 1	0.2	39 ± 2	1.0	78 ± 9	2.6
(Z)-3-Hexenol	24 ± 2	0.5	32 ± 1	0.8	59 ± 1	2.0
(E)-3-Hexenol	<1	0.02	3 ± 0.1	0.1	6 ± 0.1	0.2
(E)-2-Hexenol	215 ± 31	4.8	890 ± 21	23.6	1412 ± 46	47.6
		Σ: 5.5		Σ: 25.5		Σ: 52.4
<b>Säuren</b>						
Hexansäure	39 ± 5	0.9	53 ± 8	1.4	53 ± 8	1.8
(E)-3-Hexensäure	225 ± 13	5.0	36 ± 7	1.0	28 ± 7	0.9
(E)-2-Hexensäure	466 ± 49	10.4	282 ± 47	7.5	239 ± 53	8.0
		Σ: 16.3		Σ: 9.9		Σ: 10.7

<sup>a</sup> Material aus 2002. <sup>b</sup> Mittelwerte aus drei Bestimmungen ± Standard Fehler.

In dem durch Enzyminhibierung nach 3 Min. erhaltenen Spektrum flüchtiger Verbindungen dominieren die ungesättigten Aldehyde [(Z)-3- und (E)-2-Hexenal] und die ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren [(E)-3- und (E)-2-Hexensäure]. Werden die enzymkatalysierten Reaktionen nicht unterbunden, so wird dieses zunächst biosynthetisierte Spektrum durch komplexe Folgereaktionen verändert. Wie aus *Tabelle 4.1.3* ersichtlich, nehmen die Gehalte an (Z)-3-Hexenal und (E)-3-Hexensäure drastisch ab, während die Anteile an (E)-2-Hexenal und (E)-2-Hexenol deutlich ansteigen. Die Veränderungen sind offensichtlich auf eine Kombination von Isomerisierungen und Reduktionen zurückzuführen. Eine auf der Basis der beobachteten Konzentrationsänderungen postulierte Reaktionssequenz ist in *Abbildung 4.1.3* dargestellt.



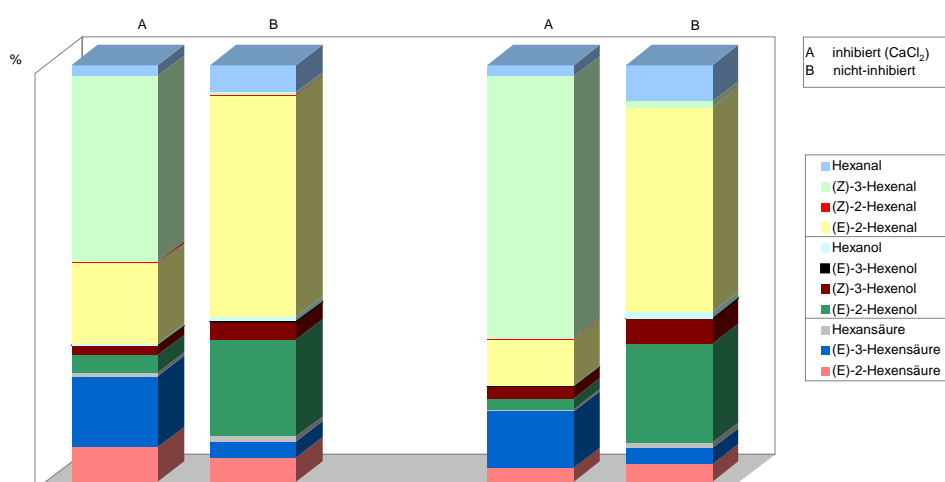
*Abbildung 4.1.3* Mögliche Folgereaktionen von ungesättigten C<sub>6</sub>-Verbindungen

Der unter nicht-inhibierenden Bedingungen beobachtete signifikante Anstieg der Konzentration an (E)-2-Hexenal kann durch Isomerisierung von (Z)-3-Hexenal erklärt werden. Die Konzentrationsabnahmen von (E)-2-Hexensäure und (E)-3-Hexensäure sowie die deutliche Verschiebung des Verhältnisses dieser beiden Säuren deuten darauf hin, dass die Isomerisierung von (E)-3-Hexensäure zu (E)-2-Hexensäure und die nachfolgende Reduktion ebenfalls zur Bildung von (E)-2-Hexenal beitragen. In Anwesenheit von Alkoholdehydrogenasen stellt dieser Aldehyd jedoch nur ein Intermediat dar und wird zumindest teilweise zum entsprechenden Alkohol (E)-2-Hexenol weiter reduziert. Dieser hypothetische Ablauf steht im Einklang mit den für die Stoffgruppen Aldehyde, Alkohole und Säuren beobachteten prozentualen Verhältnissen. Wie aus *Tabelle 4.1.3* ersichtlich, stimmt die Summe der für die C<sub>6</sub>-Aldehyde und C<sub>6</sub>-Säuren ermittelten prozentualen Abnahmen mit dem für die C<sub>6</sub>-Alkohole bestimmten Zuwachs sehr gut überein.

Die reduktive Kapazität des Rhabarberhomogenats erwies sich als stark abhängig von den Milieubedingungen. Um die Aufarbeitungen unter inhibierenden Bedingungen und nicht-inhibierenden Bedingungen möglichst vergleichbar durchzuführen, wurden bei der Isolierung der flüchtigen Verbindungen ohne Inhibierung die zerkleinerten Rhabarberstiele mit einem der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung äquivalenten Volumen an Wasser gemischt (Spalten "nicht inhibiert, mit Wasser" in *Tabelle 4.1.3*). Da diese Vorgehensweise sich von der in Kapitel 4.1 beschriebenen Versuchsführung, d.h. VHS-Isolierung aus Homogenat ohne Zugabe von Wasser, unterschied, wurde ein entsprechender Versuchsansatz in die vergleichende Untersuchung mit aufgenommen (Spalten "nicht inhibiert, ohne Wasser" in *Tabelle 4.1.3*).

Es zeigte sich, dass die Abwesenheit/Anwesenheit des Wassers offensichtlich stark die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase(n) beeinflusst. In den ohne Zugabe von Wasser homogenisierten Proben stellte (E)-2-Hexenol den mengenmäßig stärksten Vertreter aus der Gruppe der  $\text{C}_6$ -Verbindungen dar. Der prozentuale Anteil der  $\text{C}_6$ -Aldehyde war deutlich zugunsten der  $\text{C}_6$ -Alkohole gesunken.

Die beschriebenen Phänomene hinsichtlich der Bildung und Veränderung des Spektrums an  $\text{C}_6$ -Verbindungen konnten für andere Chargen bestätigt werden. Wie aus *Abbildung 4.1.4* ersichtlich, unterschieden sich Rhabarber-Chargen in den Verteilungen der unter inhibierenden Bedingungen erfassten  $\text{C}_6$ -Komponenten. Die unter nicht-inhibierenden Bedingungen ablaufenden Veränderungen sind jedoch vergleichbar.



*Abbildung 4.1.4* Prozentuale Verteilungen von  $\text{C}_6$ -Verbindungen in unterschiedlichen Rhabarberchargen (Material aus 2002)

Um die unterschiedlichen sensorischen Beiträge von C<sub>6</sub>-Verbindungen zu dem Aroma von frisch geschälten bzw. durch nachfolgende Reaktionen „gealterten“ Rhabarberstielen zu ermitteln, wurden die unter inhibierenden und nicht-inhibierenden Bedingungen berechneten Aromawerte verglichen (Tab. 4.1.4).

*Tabelle 4.1.4*

Aromawerte ausgewählter C<sub>6</sub>-Komponenten, die mittels VHS unter inhibierenden Bedingungen bzw. nicht-inhibierenden Bedingungen bestimmt wurden

<b>Verbindung</b>	<b>Aromawert <sup>a</sup></b>	
	<i>inhibiert</i> (nach 3Min.)	<i>nicht-inhibiert</i>
Hexanal	48	72
(Z)-3-Hexenal	7140	124
(E)-2-Hexenal	87	122
Hexanol	0.003	0.02
(Z)-3-Hexenol	0.3	0.6
(E)-2-Hexenol	2.2	8.9
(E)-3-Hexensäure	0.4	0.06
(E)-2-Hexensäure	1.6	0.9

<sup>a</sup> Der Aromawert wurde als Quotient aus dem Gehalt (Mittelwert, *Tabelle 4.1.3*) und der Geruchsschwelle in Wasser [*Tabelle 4.1.2*; (E)-3-Hexensäure: 600 µg/L] berechnet.

Wie aus *Tabelle 4.1.4* ersichtlich, wird aufgrund der hohen Konzentration an (Z)-3-Hexenal und seiner geringen Geruchsschwelle das aus zerkleinertem Rhabarber isolierte Aromaspektrum durch diesen ungesättigten Aldehyd beherrscht. Werden nachfolgende Reaktionen nicht inhibiert, nimmt die Bedeutung dieser Komponente drastisch ab. Die Beiträge des isomeren Aldehyds (E)-2-Hexenal sowie dessen Reduktionsprodukts (E)-2-Hexenol zum Rhabarber-Aroma nehmen zu.

#### *4.1.5 Sensorische Bewertungen ausgewählter Verbindungen in wässrigen Lösungen*

Der sensorische Beitrag der C<sub>6</sub>-Verbindungen sowie der beiden Hauptverteter der methylverzweigten Verbindungen, 2-Methylbuttersäure und 2-Methylbutanol, zum Rhabarber-Aroma wurde in wässrigen Lösungen bewertet. Stammlösungen der Aromastoffe wurden in neutraler wässriger Lösung sowie in einer wässrigen Lösung, welche die für



Rhabarber typischen organischen Säuren enthielt [Souci et al, 2000], so verdünnt, dass die Mengen den in Rhabarberstielen unter inhibierenden Bedingungen bestimmten Gehalten entsprachen. Die Konzentrationsverhältnisse wurden so gewählt, dass sie die in verschiedenen Chargen ermittelten Unterschiede in den Verteilungen der C<sub>6</sub>-Komponenten exemplarisch widerspiegeln.

*Tabelle 4.1.5* Sensorische Bewertung ausgewählter Rhabarberaromastoffe in wässrigen Lösungen

Verbindung	Konzentration (µg/l)		
	1	2	3
<i>Aldehyde</i>			
Hexanal	217	184	258
(Z)-3-Hexenal	1785	3244	5979
(Z)-2-Hexenal	18	19	18
(E)-2-Hexenal	1484	1419	1047
<i>Alkohole</i>			
Hexanol	8	17	18
(Z)-3-Hexenol	24	177	280
(E)-2-Hexenol	215	302	243
2-Methylbutanol	479	449	347
<i>Säuren</i>			
Hexansäure	39	58	50
(E)-3-Hexensäure	225	1246	1281
(E)-2-Hexensäure	466	599	324
2-Methylbuttersäure	497	277	338
<b>Sensorik</b>			
Medium	Geruchsbeschreibung		
Wasser (neutral)	intensive Apfel-Note; fruchtig, grün	grün, grasig, fruchtig, sauer	intensiv grün-grasig, leicht fruchtig, sauer
Wasser + Fruchtsäuren <sup>a</sup> (pH: 1.5)	Apfel-Note, vorherrschend; fruchtig, grün, zusätzlich saure Note	grün, grasig, fruchtig-sauer; an geschälte Rhabarberstiele erinnernd	intensiv grün-grasig, fruchtig-sauer

<sup>a</sup> (g/L), Äpfelsäure 12.5, Oxalsäure 4.6, Zitronensäure 1.3, Essigsäure 0.59, Gallussäure 0.03, Protocatechussäure 0.01, Kaffesäure 0.001, p-Cumarsäure 0.005.

Die sensorische Bewertung der neutralen wässrigen Lösungen zeigte, dass alle einen grün-fruchtigen Charakter aufwiesen. Die Lösungen 2 und 3 zeigten zusätzliche saure Noten, die sich durch die höheren Gehalte an ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren erklären lassen. Lösung 1, in der (E)-2-Hexenal und (Z)-3-Hexenal in einer gleichen Größenordnung vorlagen, war durch eine vorherrschende Apfelnote gekennzeichnet. In den Lösungen 2 und 3 wurde diese Note aufgrund der höheren Gehalte an (Z)-3-Hexenal durch einen grün-grasartigen Geruch verdrängt.

Die Rhabarber-typische saure Note war bei keiner der neutralen wässrigen Lösungen zu beobachten. Diese war erst wahrzunehmen, nachdem die Fruchtsäurelösung als Basis zur Verdünnung der Aromastoffe herangezogen wurde. Diese Lösungen wiesen sowohl einen runden, grün-fruchtigen als auch fruchtig-sauren Charakter auf. Lösung 2 erinnerte dabei am meisten an den Geruch frisch geschälter Rhabarberstiele.

#### 4.1.6 Zusammenfassung

Nach Isolierung flüchtiger Verbindungen ungekochter Rhabarberstiele mittels Vakuum Headspace Technik und kapillargaschromatographisch-massenspektrometrischer Untersuchung der Extrakte wurden 78 Komponenten identifiziert, von denen 59 erstmals in Rhabarber beschrieben wurden. In dem Spektrum flüchtiger Verbindungen überwogen die C<sub>6</sub>-Komponenten mit einem Anteil von etwa 65 %. Neben ungesättigten Aldehyden [(Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal] sowie den entsprechenden Alkoholen [(E)-2-Hexenol, (Z)-3-Hexenol] wurden auch die in pflanzlichen Systemen weniger häufig anzutreffenden ungesättigten Säuren [(E)-3-Hexensäure, (E)-2-Hexensäure] nachgewiesen. Als weitere charakteristische Stoffgruppen erwiesen sich methylverzweigte Säuren und Alkohole. Neben den in Pflanzen weit verbreiteten 2-methylverzweigten Vertretern (2-Methylbuttersäure, 2-Methylbutanol) wurden auch die ungewöhnlicheren 4-methylverzweigten Komponenten (4-Methylhexansäure, 4-Methylhexanol) detektiert.

Die VHS-Extrakte besaßen einen grünen, an frisch geschälte Rhabarberstiele erinnernden Geruch. Die Untersuchung geruchsaktiver Komponenten mit Hilfe der Gaschromatographie-Olfaktometrie unter Verwendung der Aromaextraktverdünnungsanalyse sowie die Bestimmung der Aromawerte zeigten, dass die C<sub>6</sub>-Verbindungen nicht nur quantitativ sondern auch sensorisch eine wichtige Rolle für das Aroma frischer, ungekochter Rhabarberstiele spielen.

Untersuchungen zum Einfluss enzymkatalysierter Reaktionen zeigten, dass das nach Zerkleinerung des pflanzlichen Gewebes freigesetzte Spektrum an C<sub>6</sub>-Verbindungen durch komplexe Folgeraktionen (Isomerisierungen und Reduktionen) rasch verändert wird. Wurden die enzymkatalysierten Reaktionen nach 3 Min. durch Zusatz von CaCl<sub>2</sub>-Lösung inhibiert, dominierten die ungesättigten Aldehyde (Z)-3- und (E)-2-Hexenal sowie die ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren (E)-3- und (E)-2-Hexensäure das Spektrum flüchtiger Verbindungen. Ohne Enzyminhibierung wurden (E)-2-Hexenal und (E)-2-Hexenol zu den mengenmäßig wichtigsten Komponenten. Die aus diesen quantitativen Verschiebungen resultierenden unterschiedlichen sensorischen Beiträge von C<sub>6</sub>-Verbindungen zu dem Aroma frisch geschälter bzw. durch nachfolgende Reaktionen „gealterter“ Rhabarberstiele wurden durch Berechnung von Aromawerten aufgezeigt.

Der sensorische Beitrag von C<sub>6</sub>-Verbindungen und 2-methylverzweigten Verbindungen zum Rhabarber-Aroma wurde in wässrigen Lösungen bewertet, wobei die Mengen den in Rhabarberstielen unter inhibierenden Bedingungen ermittelten Gehalten entsprachen. Die Rhabarber-typische saure Note war nur wahrzunehmen, wenn als Basis zur Verdünnung eine wässrige Lösung mit den in Rhabarber enthaltenen Fruchtsäuren verwendet wurde.

## 4.2 Einfluss anderer Isolierungsverfahren auf das Spektrum flüchtiger Verbindungen

### 4.2.1 Einleitung

Die Isolierung der flüchtigen Verbindungen stellt einen kritischen Schritt in der Aromaanalyse dar, da die eingesetzten Methoden in unterschiedlichem Maße zu qualitativen und quantitativen Veränderungen des originären Aromaspektrums des Ausgangsmaterials führen können. Vergleichende Untersuchungen flüchtiger Inhaltsstoffe unter Einsatz unterschiedlicher Isolierungstechniken wurden an verschiedenen Beispielen, z.B. Dill [Huopalahti et al, 1981], Weintraubensaft [Blanch et al, 1990], Paprika [Guadayol et al, 1997] oder Passionsfrucht [Werkhoff et al, 1998] durchgeführt. Sie zeigten, dass die Techniken hinsichtlich Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Extraktionsausbeute signifikante Unterschiede aufwiesen und dadurch zu unterschiedlichen Aromazusammensetzungen führten. Sie bestätigten, dass für die Charakterisierung flüchtiger Bestandteile eines Ausgangsmaterials parallel mehrere Methoden eingesetzt und miteinander verglichen werden sollten.

Zur Isolierung flüchtiger Verbindungen von Rhabarberstielen sollten daher neben der VHS-Technik zwei weitere Methoden angewandt werden: die Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) nach Kutscher-Steudel [Gattermann und Wieland, 1972] und die Simultane Destillation-Extraktion (SDE) in einer nach Schultz et al (1977) modifizierten Apparatur unter atmosphärischen Bedingungen. Die LLE ist ein schonendes Verfahren, da die Isolierung der flüchtigen Verbindungen ohne thermische Belastung des Untersuchungsmaterials abläuft. Bei der SDE dagegen erfolgt ein Kochprozess in der wässrigen Phase, der zur Bildung von thermischen Artefakten und zur Ausbildung bzw. Verstärkung der typischen Kochnote führen kann [Núñez et al, 1984; Tatsuka et al, 1990; Maignial et al, 1992; Chaintreau, 2001]. Da die Rhabarberstiele überwiegend in blanchiertem oder gekochtem Zustand verzehrt wird, diene diese Technik zur Erfassung von Aromastoffen aus thermisch behandeltem Rhabarber. Zur Charakterisierung der flüchtigen Inhaltsstoffe gekochten Rhabarbers wurde außerdem ein Kochprozess modelliert, wobei die Isolierung mittels LLE nach Erhitzen unter Rückfluss (15 min) durchgeführt wurde.

#### 4.2.2 Isolierung flüchtiger Verbindungen mittels Flüssig-Flüssig Extraktion und Simultaner Destillation-Extraktion

Während die Aufarbeitung mittels VHS zu Extrakten mit typisch grünem, an frisch geschälte Rhabarberstiele erinnernden Geruch geführt hatte, wiesen die LLE-Extrakte einen zwar auch grünen jedoch weitaus stechenderen Charakter auf. Die SDE-Extrakte zeigten darüber hinaus eine Kochnote.

In *Tabelle 4.2.1* sind die Verbindungen gegenübergestellt, die mittels LLE, SDE und VHS durch Analyse derselben Charge erfasst wurden. Analog zur VHS erfolgte auch bei LLE und SDE die quantitative Bestimmung der Komponenten durch Vergleich mit der vor der Probenaufarbeitung zugesetzten Standardverbindung (1-Decanol) unter Berücksichtigung von FID-Responsefaktoren und Wiederfindungsraten. Die mit Hilfe wässriger Lösungen (pH 3.5) der Referenzsubstanzen ermittelten Wiederfindungsraten für LLE und SDE sind im Anhang zusammengestellt.

Der Kutscher-Steudel Perforator ermöglicht lediglich die Untersuchung flüssiger Proben. Daher konnte nur der Überstand des zentrifugierten Rhabarberstiel/Wasser-Homogenats zur Isolierung eingesetzt werden. Auch bei der SDE ergaben sich bei Einsatz des kompletten Homogenats experimentelle Schwierigkeiten durch extreme Schaumbildung und Auftreten von Siedenverzügen. Bei dieser Technik wurde daher ebenfalls die nach Zentrifugieren des Homogenats erhaltene wässrige Phase zur Isolierung der flüchtigen Verbindungen verwendet. Da bei der Aufarbeitung der VHS-Technik das komplette Stielmaterial eingesetzt wurde, sind die Absolutgehalte der mit Hilfe von VHS und LLE bzw. SDE isolierten flüchtigen Verbindungen nicht direkt miteinander vergleichbar. Trotz der Unterschiede in den Gesamtmengen (VHS: 6006 µg/kg, LLE: 3167 µg/kg, SDE: 3042 µg/kg) zeigte sich jedoch, dass die Anteile der Hauptstoffgruppen übereinstimmen. Die herausragende Rolle der C<sub>6</sub>-Verbindungen wurde in allen Extrakten bestätigt (VHS: 73 %, LLE: 80 %, SDE: 75 %). Ungesättigte C<sub>6</sub>-Komponenten überwogen, wobei (E)-2-Hexenal, (E)-2-Hexenol und (E)-2-Hexensäure die konzentrationsstärksten Vertreter waren.

Tabelle 4.2.1 Quantitative Verteilung der mittels VHS, LLE und SDE aus Rhabarber isolierten flüchtigen Komponenten

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration (µg/kg) <sup>a</sup>			
			LLE	Charge IV <sup>c</sup> SDE	VHS	
<i>Alkohole</i>						
45	1,2-Ethandiol	1620	24 ± 5	31 ± 4	nd	d
5	1-Propanol	1040	34 ± 12	68 ± 3	179 ± 48	d
7	2-Methyl-1-propanol	1093	2 ± 0.4	2 ± 0.4	4 ± 1	d
12	1-Butanol	1145	1 ± 0.2	1 ± 0.1	6 ± 0.3	d,g
16	2-Methyl-1-butanol	1213	116 ± 13	254 ± 7	367 ± 57	d
23	3-Methyl-1-pentanol	1325	<1	<1	1 ± 0.1	d
21	4-Methyl-1-pentanol	1317	19 ± 2	28 ± 2	43 ± 3	d
18	1-Pentanol	1253	3 ± 0.5	3 ± 0.2	3 ± 0.3	d
9	2-Pentanol	1121	2 ± 0.5	3 ± 0.5	5 ± 1	d
8	3-Pentanol	1101	1 ± 0.2	<1	1 ± 0.3	d
13	1-Penten-3-ol	1162	12 ± 2	16 ± 2	30 ± 1	d
22	(Z)-2-Penten-1-ol	1322	12 ± 2	16 ± 1	12 ± 0.4	e
29	4-Methyl-3-penten-1-ol	1390	8 ± 1	8 ± 2	7 ± 1	f
26	Hexanol	1358	20 ± 3	28 ± 4	92 ± 6	d,g
32	(E)-2-Hexenol	1414	253 ± 33	315 ± 73	1938 ± 131	d
33	(Z)-2-Hexenol	1418	<1	1 ± 0.1	1 ± 0.3	d
27	(E)-3-Hexen-1-ol	1365	2 ± 0.4	2 ± 0.3	12 ± 1	d
28	(Z)-3-Hexen-1-ol	1385	22 ± 7	28 ± 4	327 ± 16	d
31	Cyclohexanol	1403	1 ± 0.1	1 ± 0.1	8 ± 1	d
34	4-Methyl-1-hexanol	1434	19 ± 3	22 ± 1	40 ± 3	d
41	2-Ethyl-1-hexanol	1490	nq	nq	<1	d
65	Hexadecanol	2383	3 ± 0.4	3 ± 0.5	7 ± 2	d
52	Benzylalkohol	1874	5 ± 1	6 ± 1	8 ± 0.4	d,g
53	2-Phenylethanol	1910	5 ± 0.1	6 ± 1	7 ± 1	d,g
30	2-Butoxyethanol	1401	1.5 ± 0.2	3 ± 0.5	nd	e
47	1-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	1780	3 ± 0.4	3 ± 0.4	nd	e
<i>Aldehyde</i>						
10	(E)-2-Pentenal	1134	1 ± 0.2	3 ± 0.2	3 ± 0.4	d
6	Hexanal	1077	51 ± 6	53 ± 6	163 ± 40	d,g
17	(E)-2-Hexenal	1216	1896 ± 227	2286 ± 123	1092 ± 171	d
15	(Z)-2-Hexenal	1196	9 ± 1	33 ± 2	4 ± 1	e
11	(Z)-3-Hexenal	1138	4 ± 0.5	4 ± 0.5	26 ± 6	d
-	(E)-2-Nonenal	1533	nd	nd	<1	d
-	(E,Z)-2,6-Nonadienal	1592	nd	nd	<1	e
42	Decanal	1496	nq	nq	10 ± 1	d,g
37	Furfural	1450	nd	33 ± 1	nd	d

Tabelle 4.2.1 (Fortsetzung)

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration (µg/kg) <sup>a</sup>			
			LLE	Charge IV <sup>c</sup> SDE	VHS	
<i>Ester</i>						
1	Ethylformiat	814	15 ± 1	23 ± 3	19 ± 2	d
2	Ethylacetat	856	63 ± 10	58 ± 3	22 ± 2	d,g
19	Hexylacetat	1271	<1	<1	2 ± 0.3	d
20	2-Methylbutyl- 2-methylbutanoat	1276	<1	<1	<1	e
-	Methyl-(E)-2-hexenoat	1284	nd	nd	1 ± 0.1	d
-	Ethyl-(E)-2-hexenoat	1345	nd	nd	<1	d
24	(E)-2-Hexenylacetat	1333	2 ± 0.3	2 ± 0.5	13 ± 0.3	d
39	(E)-2-Hexenylbutanoat	1475	3 ± 0.5	3 ± 0.5	9 ± 1	d
-	(E)-2-Hexenylhexanoat	1663	nd	nd	1 ± 0.3	d
38	(E)-3-Hexenylbutanoat	1452	1 ± 0.1	2 ± 0.5	3 ± 0.2	e
48	(E)-2-Hexenyl- (E)-2-hexenoat	1805	3 ± 1	2 ± 0.3	6 ± 5	e
58	Isopropylmyristat	2040	2 ± 0.2	2 ± 0.2	3 ± 1	d
68	Diisobutylphthalat	2592	5 ± 1	2 ± 0.2	2 ± 0.3	f,h
69	Dibutylphthalat	2693	2 ± 0.2	2 ± 0.2	1 ± 0.3	d,h
76	Di(2-ethylhexyl)phthalat	3160	nq	nq	74 ± 4	d
<i>Ketone</i>						
4	3-Pentanon	956	4 ± 1	2 ± 0.2	6 ± 0.2	e
25	6-Methyl-5-hepten-2-on	1341	<1	<1	<1	e
-	(E)-Geranylaceton	1853	nd	nd	2 ± 0.1	d
40	2,6,6-Trimethyl-2-vinyl- tetrahydropyran-3-on	1478	3 ± 1	3 ± 0.5	4 ± 0.3	f
<i>Säuren</i>						
36	Essigsäure	1449	15 ± 2	17 ± 1	18 ± 3	d
46	2-Methylbuttersäure	1670	116 ± 11	179 ± 25	250 ± 29	d
49	4-Methylpentansäure	1813	4 ± 0.3	3 ± 0.3	9 ± 0.3	d
51	Hexansäure	1846	24 ± 1	32 ± 2	77 ± 3	d,g
54	4-Methylhexansäure	1936	1 ± 0.3	2 ± 0.5	2 ± 0.2	d
55	(E)-3-Hexensäure	1948	30 ± 3	40 ± 8	31 ± 8	d
56	(E)-2-Hexensäure	1967	211 ± 17	181 ± 33	574 ± 73	d
59	Octansäure	2056	5 ± 1	11 ± 2	3 ± 0.4	d,g
60	Nonansäure	2165	5 ± 1	4 ± 1	1 ± 0.1	d,g,h
63	Decansäure	2286	3 ± 0.5	10 ± 3	1 ± 0.1	d,g,h
67	Dodecansäure	2480	4 ± 0.1	2 ± 0.5	2 ± 0.1	d,g
70	Tetradecansäure	2706	7 ± 1	7 ± 1	26 ± 1	d,g

Tabelle 4.2.1 (Fortsetzung)

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration (µg/kg) <sup>a</sup>			
			LLE	Charge IV <sup>c</sup> SDE	VHS	
71	Pentadecansäure	2819	4 ± 0.5	6 ± 1	42 ± 2	d,g
72	Hexadecansäure	2913	31 ± 3	125 ± 26	241 ± 19	d,g
73	9-Hexadecensäure	2957	7 ± 1	5 ± 1	2 ± 0.1	e
75	Octadecansäure	3132	nq	nq	2 ± 0.3	d
<b>Sonstige</b>						
43	Pyrrol	1511	nd	122 ± 35	nd	d
14	Limonen	1192	<1	<1	6 ± 1	d
44	Linalool	1548	<1	3 ± 0.1	2 ± 0.3	d
35	Linalooloxid	1440	nd	6 ± 1	nd	d
61	Sesquiterpen (MW:204)	2180	<1	5 ± 0.3	1 ± 0.1	f
62	Sesquiterpen (MW:204)	2201	3 ± 1	3 ± 0.5	1 ± 0.1	f
74	Squalen	3058	10 ± 1	5 ± 1	141 ± 63	d
-	β-Ionon	1943	nd	nd	<1	d
50	Anethol	1820	<1	<1	1 ± 0.2	d,g
64	p-Allylphenol	2338	54 ± 3	21 ± 4	6 ± 1	e
57	Methyleugenol	2013	2 ± 0.4	2 ± 0.4	2 ± 0.4	d,g
-	1,2-Dimethoxybenzol	1721	nd	nd	2 ± 0.1	d
-	1,4-Dimethoxybenzol	1728	nd	nd	<1	d
66	Indol	2336	1 ± 0.1	<1	3 ± 1	d

<sup>a</sup> Mittelwerte aus 3 Bestimmungen für alle Methoden ± Standard Fehler. <sup>b</sup> Die Nummern entsprechen den Verbindungen in Abbildung 4.2.1. Nummer 3 Ethanol (Lösungsmittel für den internen Standard), sind nicht aufgeführt. <sup>c</sup> Untersuchungsmaterial aus 2001. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte <sup>d</sup> mit Hilfe von Referenzsubstanzen; <sup>e</sup> durch Vergleich der kapillargaschromatographischen (Retentionszeit–Kovats-Index) und massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben; <sup>f</sup> durch Vergleich der massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben. Verbindungen identifiziert im Wurzelstock des Rhabarbers von <sup>g</sup> Miyazawa *et al* (1996). <sup>h</sup> Frattini *et al* (1974). KI: Kovats Indices. VHS: Vakuum Headspace Technik. LLE: Flüssig-Flüssig Extraktion. SDE: Simultane Destillation-Extraktion. nd: nicht detektiert. nq: nicht quantifiziert.



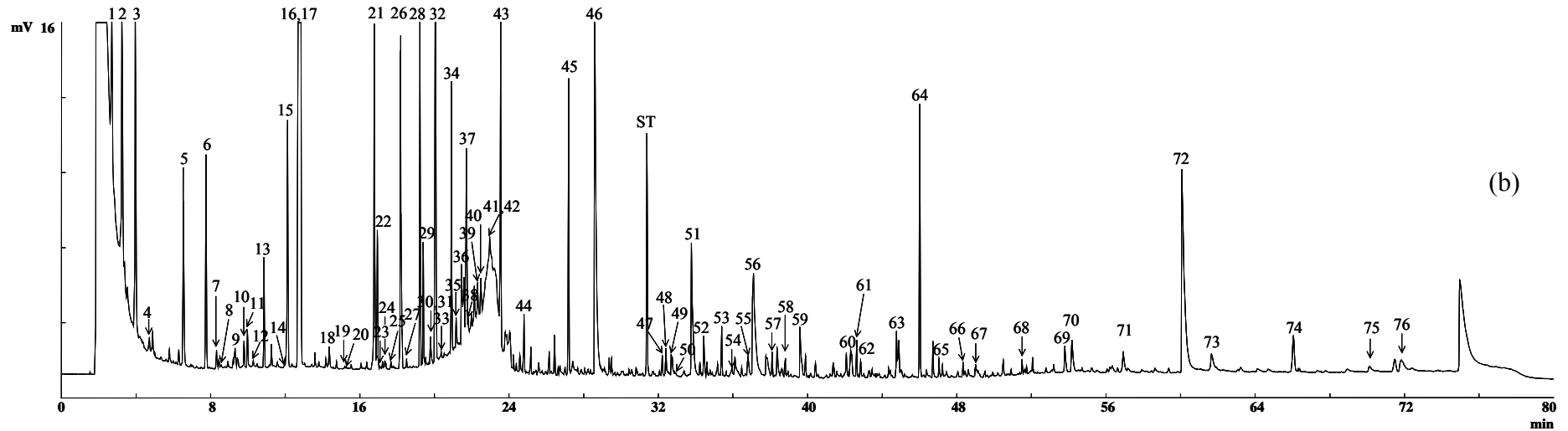
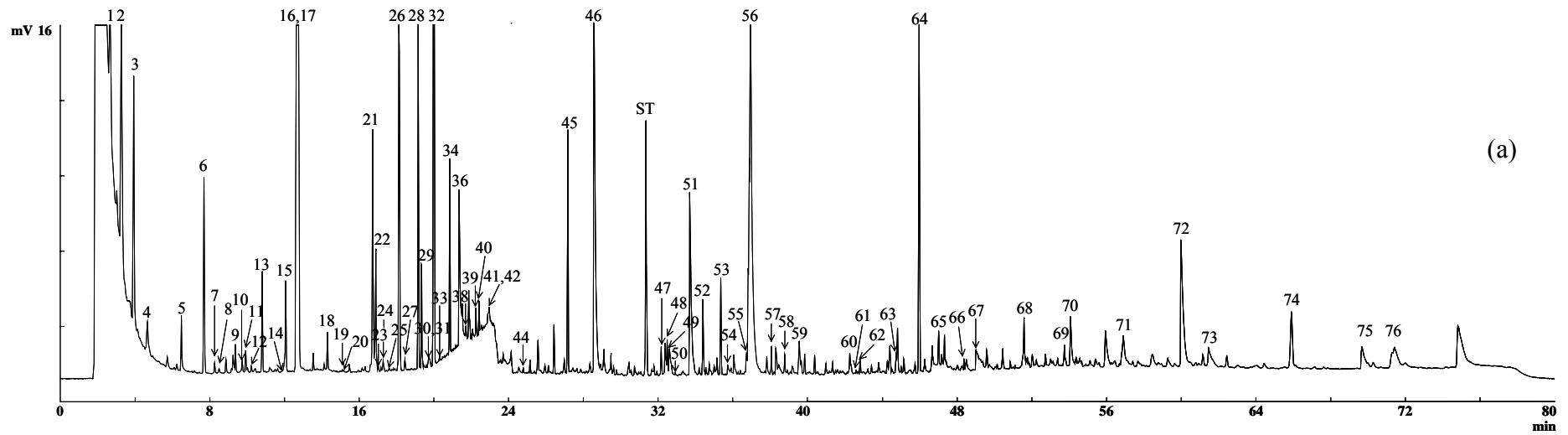


Abbildung 4.2.1

Kapillargaschromatographische Trennung (DBWAX) der mittels Flüssig-Flüssig Extraktion (a) und Simultaner Destillation-Extraktion (b) isolierten flüchtigen Komponenten von Rhabarberstielen

(Die angegebenen Nummern entsprechen den Verbindungen in Tabelle 4.2.2; für Bedingungen siehe Material und Methoden; ST: Internal Standard, 1-Decanol)

Auch die Klasse der methylverzweigten Verbindungen war mit 12 % (VHS), 9 % (LLE) und 12 % (SDE) zu ungefähr gleichen Anteilen in den Extrakten vertreten. 2-Methylbutanol und 2-Methylbuttersäure wurden als Hauptkomponenten dieser Stoffgruppe nachgewiesen.

Die in den LLE- und SDE-Extrakten identifizierten Muster flüchtiger Verbindungen stimmten gut überein. Wie aus den in Abbildung 4.2.1 dargestellten Chromatogramme ersichtlich, waren in den LLE-Extrakten jedoch deutlich höhere Mengen an Essigsäure (Peak Nr. 36) und (E)-2-Hexensäure (Nr. 56) enthalten. Demgegenüber zeigten die SDE-Extrakte die für eine thermische Belastung des Untersuchungsmaterials typischen Merkmale. SDE unter Normaldruck führte zur Bildung von Furfural (Peak Nr. 37), Pyrrol (Nr. 43) und Linalooloxid (Nr. 35). Furane, Pyrazine, Pyridine und Pyrrole kommen oft in SDE-Extrakten vor [Umamo et al, 1986; Tatsuka et al, 1990; Shimoda et al, 1995]. Viele dieser Verbindungen besitzen einen karamelartigen, röstigen, malzigen und gekocht riechenden Charakter [Fors, 1983]. Sie sind Produkte einer Vielzahl von Folge- und Parallelreaktionen (Maillard-Reaktion) zwischen Aminoverbindungen und reduzierenden Zuckern [Tressl and Rewicki, 1999; Kerler und Winkel, 2001].

In den SDE-Extrakten wurden darüber hinaus auch höhere Mengen an 2-Methylbutanol, 2-Methylbuttersäure, Hexadecansäure und Linalool gefunden. 2-Methylbutanol, 2-Methylbuttersäure und Linalool sind bekannt als glykosidisch gebundene Aromastoffe [Buttery et al, 1990 (Tomaten); Schwab und Schreier, 1988 (Äpfel); Wang et al, 2000 (Tee)]. Takeoka et al (1992) haben die glykosidisch gebundenen Aromastoffe von Nektarinen (*Prunus persica nectarine*) untersucht. Sie zeigten, dass zur Freisetzung solcher Aromastoffe (u.a. Benzaldehyd, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, 2-Methylbutanol,  $\beta$ -Ionon) nicht nur die enzymatische Hydrolyse ( $\beta$ -Glucosidase) sondern auch die chemische Hydrolyse (pH 3.0) während der Simultanen Destillation-Extraktion entscheidend beitragen kann. Die Untersuchung von grünem Tee [Shimoda et al, 1995] bestätigte ebenfalls die Bedeutung der chemischen Hydrolyse bei der Freisetzung glykosidisch gebundener Aromastoffe während der SDE.

#### 4.2.3 Einfluss des Isolierungsverfahrens auf das Spektrum von C<sub>6</sub>-Verbindungen

Analog zu den mittels VHS durchgeführten Untersuchungen sollte auch unter den Bedingungen der LLE und SDE der Einfluss enzymkatalysierter Reaktionen auf das Spektrum von C<sub>6</sub>-Komponenten untersucht werden. *Tabelle 4.2.2* zeigt die unter nicht-inhibierenden Bedingungen sowie nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub>-Lösung ermittelten Gehalte und prozentualen Anteile an C<sub>6</sub>-Aldehyden, -Alkoholen und -Säuren.

Ein Vergleich der unter nicht-inhibierenden Bedingungen mittels LLE und SDE erhaltenen prozentualen Verteilungen (*Tab. 4.2.2*) mit den unter Zugabe von Wasser mittels VHS ermittelten Werten (*Tab. 4.1.3*) zeigt, dass mit allen Methoden nahezu identische Muster von C<sub>6</sub>-Aldehyden (65 %), C<sub>6</sub>-Alkoholen (23-25 %) und C<sub>6</sub>-Säuren (10-12 %) erhalten wurden. Analog zu den Reaktionen unter VHS-Bedingungen wird auch unter Bedingungen der LLE und SDE bei Nicht-Inhibierung von Enzymaktivitäten der Gehalt an (Z)-3-Hexenal und (E)-2-Hexenol verringert. Zusätzlich nimmt der Gehalt an ungesättigten C<sub>6</sub>-Säuren ab und deren Verhältnis verschiebt sich zugunsten von (E)-2-Hexensäure.

Unter inhibierten Bedingungen wurden Unterschiede zwischen den Techniken deutlich. Die nach Inhibierung nahezu gleichen prozentualen Anteile an (Z)-3-Hexenal und (E)-2-Hexenal in den VHS-Extrakten werden unter den Bedingungen der LLE zugunsten des trans-konfigurierten Alkohols verschoben. Dies ist möglicherweise durch die verlängerte Extraktionsdauer (24 h gegenüber 3 h) zu erklären. Dieser Effekt wird durch die thermische Belastung im Zuge der SDE noch verstärkt. Unterschiede in den Verhältnissen in Abhängigkeit von Isolierungsverfahren sind auch für (E)-2- und (E)-3-Hexensäure zu beobachten.

Wie *Abbildung 4.2.2* veranschaulicht, konnten trotz quantitativer Unterschiede in den Spektren an C<sub>6</sub>-Verbindungen für andere Chargen ähnliche Phänomene hinsichtlich der Bildung und Veränderung des Spektrums beobachtet werden.

Tabelle 4.2.2 Konzentrationen und prozentuale Verteilungen von C<sub>6</sub>-Komponenten in Rhabarber

Verbindung	I <sup>a</sup>								
	LLE		nicht-inhibiert		I <sup>a</sup>		SDE		
	inhibiert				inhibiert		inhibiert	nicht-inhibiert	
	(µg/kg)	%	(µg/kg)	%	(µg/kg)	%	(µg/kg)	%	
<b>Aldehyde</b>									
Hexanal	30 ± 4	2.2	64 ± 15	3.6	32 ± 7	1.7	58 ± 18	2.6	
(Z)-3-Hexenal	177 ± 79	13.0	7 ± 2	0.4	73 ± 15	3.9	7 ± 1	0.3	
(Z)-2-Hexenal	8 ± 1	0.6	4 ± 1	0.2	24 ± 1	1.3	15 ± 2	0.7	
(E)-2-Hexenal	790 ± 148	58.1	1083 ± 228	60.5	1033 ± 59	55.1	1378 ± 192	61.3	
		Σ:73.9		Σ:64.7		Σ:62.0		Σ:73.9	
<b>Alkohole</b>									
Hexanol	6 ± 1	0.4	19 ± 5	1.0	7 ± 1	0.3	25 ± 5	1.1	
(Z)-3-Hexenol	17 ± 2	1.2	21 ± 3	1.2	18 ± 2	1.0	25 ± 4	1.1	
(E)-3-Hexenol	<1	<0.1	<1	<0.1	<1	<0.1	2 ± 0	0.1	
(E)-2-Hexenol	124 ± 10	9.1	379 ± 70	21.2	139 ± 9	7.4	470 ± 107	20.9	
		Σ:10.8		Σ:23.5		Σ:8.8		Σ:23.2	
<b>Säuren</b>									
Hexansäure	15 ± 1	1.1	28 ± 5	1.6	33 ± 7	1.8	30 ± 6	1.3	
(E)-3-Hexensäure	43 ± 5	3.2	21 ± 6	1.2	142 ± 30	7.6	29 ± 3	1.3	
(E)-2-Hexensäure	149 ± 12	11.0	162 ± 14	9.0	371 ± 93	19.8	210 ± 34	9.3	
		Σ:15.3		Σ:11.8		Σ:29.2		Σ:11.9	

<sup>a</sup> Material aus 2002. <sup>b</sup> Mittelwerte aus drei Bestimmungen ± Standard Fehler. LLE: Flüssig-Flüssig Extraktion, SDE: Simultane Destillation-Extraktion.

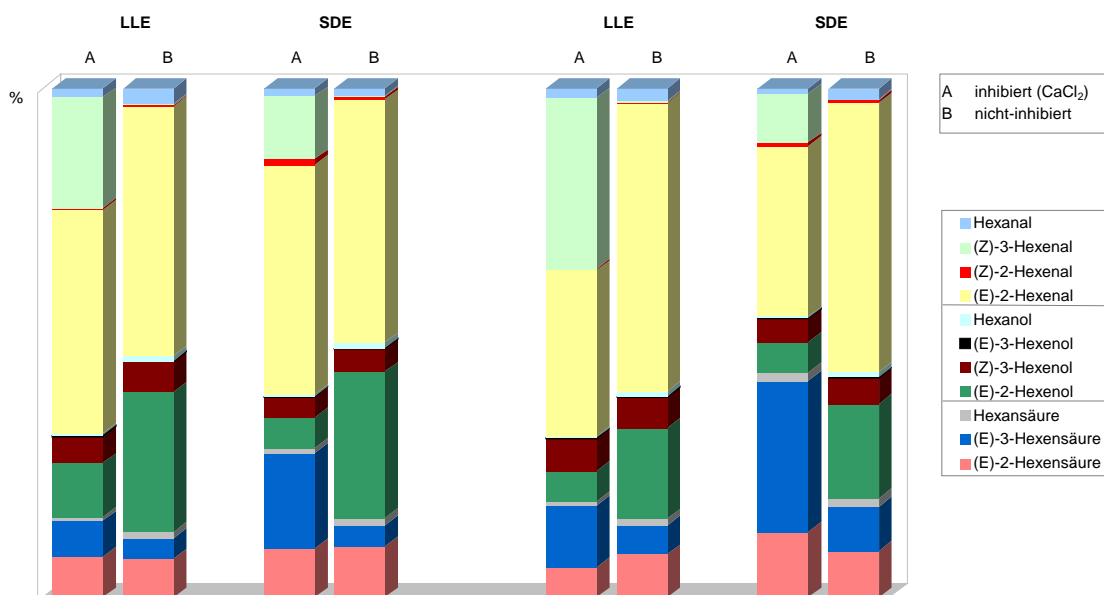


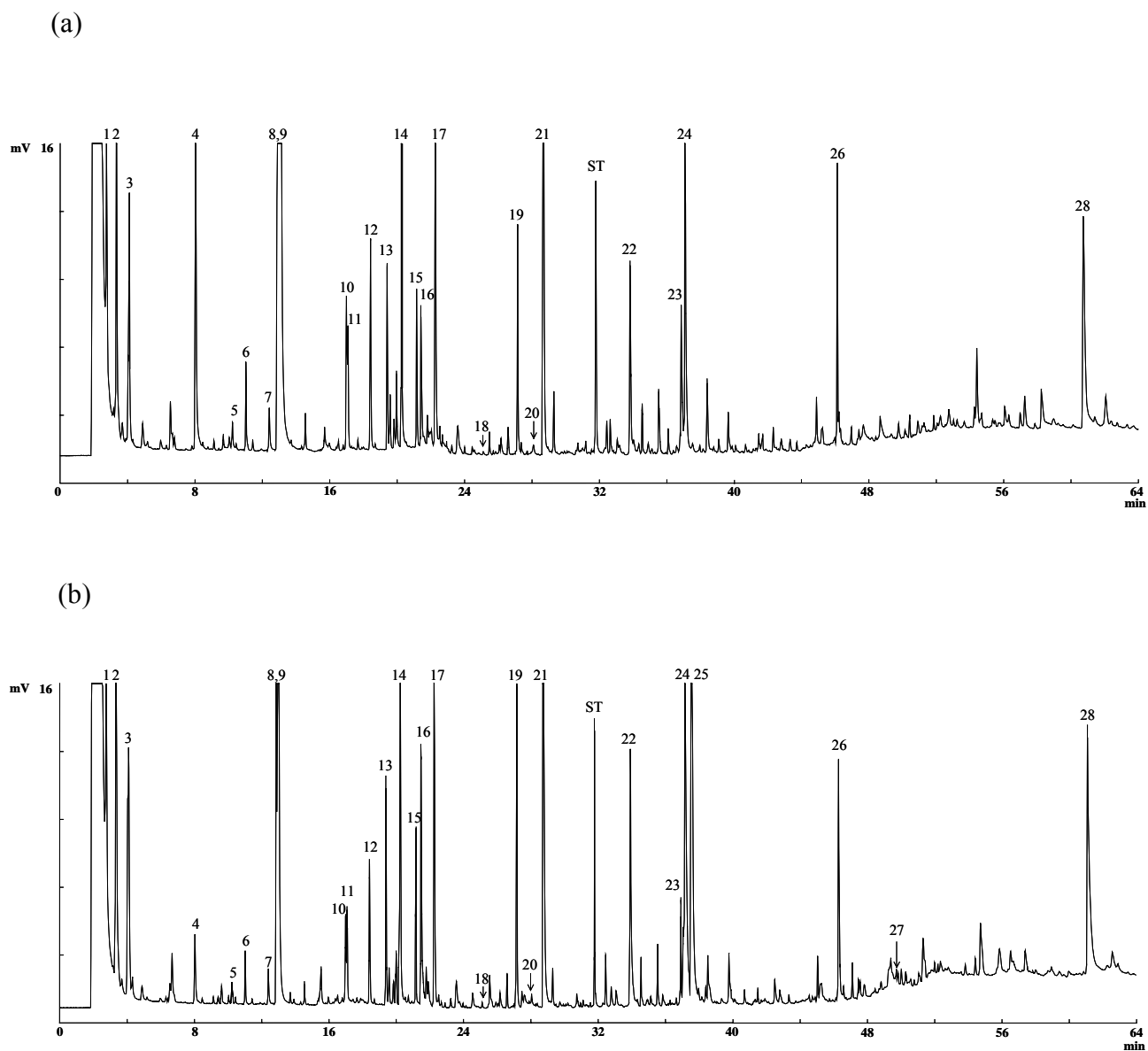
Abbildung 4.2.2 Prozentuale Verteilungen von C<sub>6</sub>-Verbindungen in unterschiedlichen Rhabarberchargen (Material aus 2002)

#### 4.2.4 Isolierung flüchtiger Verbindungen mittels Flüssig-Flüssig Extraktion nach Erhitzen unter Rückfluss

Zur Erfassung flüchtiger Verbindungen gekochten Rhabarbers wurde neben der SDE eine Flüssig-Flüssig Extraktion von zentrifugiertem Rhabarber/Wasser-Homogenat durchgeführt, welches 15 Min unter Rückfluss erhitzt worden war.

Die erhaltenen LLE-EH Extrakte zeigten ebenfalls grüne Noten, die aber weniger intensiv waren als in den LLE-Extrakten, die ohne Erhitzungsschritt gewonnen worden waren. Es war auch eine leichte Kochnote wahrzunehmen, die jedoch deutlich weniger ausgeprägt war als in den SDE-Extrakten.

In *Abbildung 4.2.3* sind die ohne Erhitzung (LLE) und nach Erhitzung (15 Min.) unter Rückfluss (LLE-EH) erhaltenen Chromatogramme dargestellt. Die Profile der flüchtigen Verbindungen erwiesen sich als ähnlich. Quantitative Daten für ausgewählte Vertreter, u.a. die C<sub>6</sub>-Komponenten und die methylverzweigten Verbindungen, sind in *Tabelle 4.2.3* zusammengestellt.



*Abbildung 4.2.3* Kapillargaschromatographische Trennung (DBWAX) der mittels Flüssig-Flüssig Extraktion isolierten flüchtigen Komponenten von Rhabarberstielen.

(a) Flüssig-Flüssig Extraktion ohne Erhitzen (LLE)

(b) Flüssig-Flüssig Extraktion nach Erhitzen unter Rückfluss (LLE-EH)

(Die angegebenen Nummern entsprechen den Verbindungen in Tabelle 4.2.3; für Bedingungen siehe Material und Methoden; ST: Internal Standard, 1-Decanol)

Tabelle 4.2.3

Quantitative Verteilung ausgewählter flüchtiger Verbindungen, die mittels Flüssig-Flüssig Extraktion aus nicht erhitztem (LLE) bzw. 15 Min. unter Rückfluss erhitztem (LLE-EH) Rhabarberhomogenat (zentrifugiert) isoliert wurden

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	KI (DBWAX)	Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) <sup>a</sup>		
			Charge A <sup>c</sup>		
			LLE	LLE-EH	
<b><i>C<sub>6</sub>-Verbindungen</i></b>					
4	Hexanal	1077	131 $\pm$ 16	42 $\pm$ 4	d,g
9	(E)-2-Hexenal	1216	1423 $\pm$ 97	580 $\pm$ 54	d
7	(Z)-2-Hexenal	1196	7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	e
5	(Z)-3-Hexenal	1138	4 $\pm$ 0.4	4 $\pm$ 0.2	d
12	Hexanol	1358	15 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	d,g
14	(E)-2-Hexenol	1414	283 $\pm$ 30	290 $\pm$ 29	d
13	(Z)-3-Hexen-1-ol	1385	14 $\pm$ 1	19 $\pm$ 3	d
22	Hexansäure	1846	19 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2	d,g
23	(E)-3-Hexensäure	1948	36 $\pm$ 2	30 $\pm$ 6	d
24	(E)-2-Hexensäure	1967	104 $\pm$ 14	131 $\pm$ 8	d
<b><i>Methylverzweigte Verbindungen</i></b>					
8	2-Methyl-1-butanol	1213	88 $\pm$ 7	79 $\pm$ 4	d
10	4-Methyl-1-pentanol	1317	14 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	d
15	4-Methyl-1-hexanol	1434	14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	d
21	2-Methylbuttersäure	1670	98 $\pm$ 16	126 $\pm$ 15	d
<b><i>Sonstige</i></b>					
1	Ethylformiat	814	20 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2	d
2	Ethylacetat	856	45 $\pm$ 2	40 $\pm$ 8	d,g
6	1-Penten-3-ol	1162	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	d
11	(Z)-2-Penten-1-ol	1322	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	e
16	Essigsäure	1449	34 $\pm$ 2	97 $\pm$ 5	d
18	Linalool	1548	1 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.1	d
19	1,2-Ethandiol	1620	33 $\pm$ 2	41 $\pm$ 6	d
20	Phenylacetaldehyd	1627	3.1 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.2	d
25	Unbekannt (MW:112)	1980	nd	340 $\pm$ 10	
26	p-Allylphenol	2338	25 $\pm$ 1	29 $\pm$ 4	e
27	2-Furoinsäure	2420	nd	5 $\pm$ 1	f
28	Hexadecansäure	2913	98 $\pm$ 17	148 $\pm$ 58	d,g

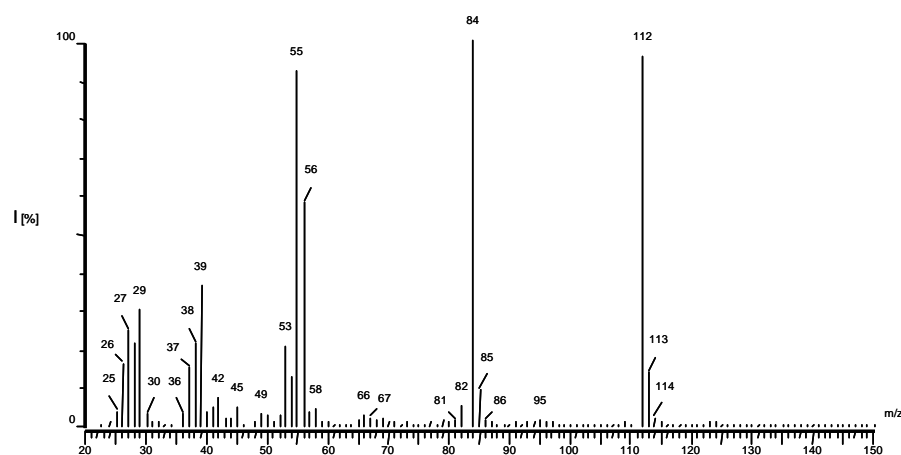
<sup>a</sup> Mittelwerte aus 3 Bestimmungen  $\pm$  Standard Fehler. <sup>b</sup> Die Nummern entsprechen den Verbindungen in Abbildung 4.2.3 Nummer 3 Ethanol (Lösungsmittel für den internen Standard) und Nummer 17 (ein nicht-identifiziertes und nicht-reproduzierbares Artefakt), sind nicht aufgeführt. <sup>c</sup> Untersuchungsmaterial aus 2000. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte <sup>d</sup> mit Hilfe von Referenzsubstanzen; <sup>e</sup> durch Vergleich der kapillargaschromatographischen (Retentionszeit-Kovats-Index) und massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben; <sup>f</sup> durch Vergleich der massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben. Verbindungen identifiziert im Wurzelstock des Rhabarbers von <sup>g</sup> Miyazawa *et al* (1996). <sup>h</sup> Frattini *et al* (1974). KI: Kovats Indices. LLE: Flüssig-Flüssig Extraktion. LLE-EH: Flüssig-Flüssig Extraktion von unter Rückfluss erhitztem Untersuchungsmaterial. nd: nicht detektiert.

Die C<sub>6</sub>-Komponenten stellten in beiden Extrakten die Hauptstoffgruppe dar. Die nach Erhitzen unter Rückfluss detektierte Gesamtmenge an C<sub>6</sub>-Verbindungen (1141 µg/kg) betrug jedoch nur noch ca. 50 % des ohne Erhitzen ermittelten Gehaltes (2036 µg/kg). Dies ist insbesondere auf die in den LLE-EH Extrakten weitaus niedrigeren Mengen an (E)-2-Hexenal und Hexanal zurückzuführen. Die enzymkatalysierte Bildung dieser Aldehyde wird durch den Erhitzungsprozess offensichtlich stark inhibiert.

Die nach Anwendung der SDE aufgetretenen typischen Artefakte (Furfural, Pyrrol und Linalooloxid) wurden nach 15-minütigen Kochen unter Rückfluss nicht detektiert. Als Komponente, die auf thermische Belastung des Materials hindeutet, wurde im LLE-EH Extrakt lediglich 2-Furoinsäure (Peak Nr. 27) nachgewiesen.

Die Spektren methylverzweigter Komponenten waren in beiden Extrakten vergleichbar. Für Essigsäure und Hexadecansäure wurden nach Erhitzen unter Rückfluss erhöhte Gehalte bestimmt.

Als entscheidender Unterschied erwies sich die Anwesenheit einer neuen Verbindung (Peak Nr. 25), die nach Erhitzen unter Rückfluss in einer Konzentration von 340 µg/kg (berechnet mit Responsefaktor 1) vorhanden war. Die Identität dieser Verbindung konnte nicht endgültig aufgeklärt werden. Auf der Grundlage des in *Abbildung 4.2.4* dargestellten Massenspektrums wurde als mögliche Struktur 5-Hydroxyfurfural (*Abb. 4.2.5*) postuliert.



*Abbildung 4.2.4* EI-Massenspektrum der Verbindung Nr. 25 (*Abb. 4.2.3 b* und *Tab. 4.2.3*)



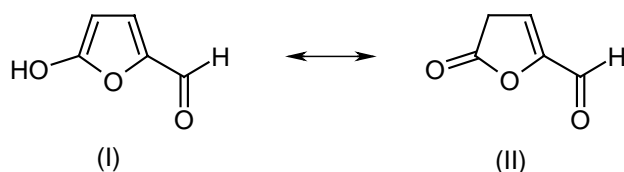


Abbildung 4.2.5 Strukturvorschlag für die unbekannt Verbindung Nr. 25  
(Abb. 4.2.3 b; Tab. 4.2.3)

Aus der tautomeren Form (II) dieser Verbindung könnte im Zuge des massenspektrometrischen Zerfalls nach CO-Abspaltung 3-Butenal-2-on gebildet werden. 3-Butenal-2-on wurde als Produkt der thermischen Degradierung von Holz detektiert [Faix et al, 1991 a, b]. Sein Massenspektrum [MG: 84; m/z (relative Intensität) 84 (100), 55 (56), 56 (27), 43 (13), 53 (13), 83 (12), 37 (9), 38 (8), 39 (7), 54 (7)] stimmt mit dem nach Abspaltung von  $M^+ - 28$  verbleibenden Fragmentierungsmuster (Abb. 4.2.4) gut überein.

5-Hydroxyfurfural ist bisher nicht als natürlich vorkommend beschrieben worden. Die im Zuge einer Literaturrecherche gefundenen Hinweise auf ein Vorkommen in Wein [De la Calle Garcia et al, 1998], Abwässern [Pörschmann et al, 1996] und Taubenorchis (*Peristeria elata*) [Jirovetz et al, 1992] erwiesen sich nach Kontaktaufnahme mit den Autoren als Fehler. In allen Fällen war irrtümlicherweise 5-Hydroxyfurfural anstatt des tatsächlich detektierten 5-Hydroxymethylfurfural angegeben worden.

Die Tatsache, dass die Verbindung erst nach Erhitzen in saurem Milieu unter Rückfluss nachweisbar ist, könnte dadurch erklärt werden, dass die tautomere Lactonform II (Abb. 4.2.5) erst durch intermolekulare Wasserabspaltung aus der entsprechenden Hydroxysäure entsteht oder die tautomere Form (I) (Abb. 4.2.5) in glykosidisch gebundener Form vorliegt und erst durch Säurekatalyse freigesetzt wird.

#### 4.2.5 Zusammenfassung

Flüchtige Inhaltsstoffe von Rhabarbersaft (Überstand des zentrifugierten Rhabarberstiel/Wasser Homogenats) wurden durch Simultane Destillation-Extraktion (SDE) bzw. Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) isoliert und mittels kapillargaschromatographisch-massenspektrometrischer Untersuchungen identifiziert und quantifiziert. Die LLE-Extrakte wiesen einen zwar auch grünen jedoch stechenderen Charakter auf als die VHS-Extrakte; nach Anwendung der SDE war darüber hinaus eine Kochnote erkennbar.

Die Anteile der Hauptstoffgruppen ( $C_6$ -Komponenten, Methylverzweigte Alkohole und Säuren) stimmten mit den in den VHS-Extrakten beobachteten Verteilungen überein. In den LLE-Extrakten waren jedoch deutlich höhere Mengen an Essigsäure und (E)-2-Hexensäure enthalten. Nach Einsatz der SDE wurden Komponenten, die auf Freisetzung flüchtiger Verbindungen aus nichtflüchtigen Vorstufen hindeuten, sowie typische Indikatorsubstanzen für thermische Belastung (Furfural, Pyrrol, Linalooloxid) detektiert. Die Bedingungen der LLE und SDE führten zu unterschiedlichen Bevorzugungen enzymatisch/chemisch-katalysierter Isomerisierungen und Reduktionen, so dass die Spektren an  $C_6$ -Komponenten sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Methode unterscheiden.

Nach Kochen eines Rhabarber/Wasser-Homogenats für 15 min. wurde mittels LLE eine neue Verbindung nachgewiesen, deren Struktur als 5-Hydroxyfurfural postuliert wurde.

### 4.3 Flüchtige Verbindungen von Rhabarber-Konzentrat

#### 4.3.1 Einleitung

Der Einsatz von Konzentraten spielt in der Getränkeindustrie eine wichtige Rolle [Hansen, 1998]. Die Konzentrierung von Säften bewirkt eine Minderung des Transport- und Lagervolumens durch selektiven Entzug des Wassers, darüber hinaus führt der erhöhte Trockensubstanzgehalt zu einer gewissen chemischen und mikrobiologischen Stabilität des Konzentrates. Außerdem können Konzentrate helfen, Schwankungen von Menge und Qualität der verschiedenen Erntejahrgänge auszugleichen [Schobinger, 1978; Krasovic und Prisljan, 1997; Hansen, 1998].

Obwohl schonende Verfahren, wie Ultrafiltration, Umkehrosmose sowie Gefrierkonzentrierung für die Konzentratherstellung entwickelt wurden, wird heutzutage noch immer die Konzentrierung mittels herkömmlicher Verdampferanlagen für industrielle Massenproduktion (z. B. Orangen-, Trauben-, Apfelsaft) bevorzugt [Löffler, 1996; Hansen, 1998]. Dabei handelt es sich um eine Methode, die unter mehr oder weniger erhöhten Temperaturbedingungen arbeitet. Deswegen kann es im Laufe des Produktionsprozesses zu unerwünschten Veränderungen und Minderungen der Inhaltsstoffe kommen. Vor diesem Hintergrund sind flüchtige Verbindungen, die die sensorischen Eigenschaften des Endproduktes entscheidend beeinflussen, von besonderer Bedeutung.

Der Einfluss der thermischen Konzentrierung von flüssigen Säften und Pürees zu Saft- oder Aromakonzentrat auf die Aromastoffzusammensetzung wurde bei einer Vielzahl von Früchten und Gemüsen untersucht, z.B. bei Aprikosenpüree [Nitz und Kollmannsberger, 1993], Erdbeersaft [Kollmannsberger und Berger, 1994], Johannisbeersaft [Boccorh et al, 1999] und Tomatensaft [Buttery et al, 1990].

Die thermische Konzentrierung von Aprikosenpüree hatte einen deutlichen Anstieg im Gehalt der Terpenalkohole sowie eine drastische Abnahme im Gehalt der Monoterpene und kurzkettigen Ester im Konzentrat zur Folge [Nitz und Kollmannsberger, 1993].

In Grapefruitsaft führte eine Saftkonzentrierung (von 11.6 ° Brix auf 65 °Brix) zum Verlust von mehr als 90 % der flüchtigen Verbindungen [Lin et al, 2002]. Während die grün/fettig/metallisch riechenden Verbindungen des frischen Grapefruitsaftes im Konzentrat verblieben, waren die meisten der zum frisch/citrusartigen und schweflig/grapefruitartigen Charakter beitragenden Verbindungen verloren gegangen.

Die Veränderungen in der Aromazusammensetzung von Guavasaft infolge von Hochdruckbehandlung (600 Mpa, 25 °C, 15 Min) sowie Pasteurisierung (95 °C, 5 Min) wurden von *Yen und Lin (1999)* untersucht. Ihre Ergebnisse verdeutlichten, dass der hochdruckbehandelte Saft sowohl qualitativ als auch quantitativ keine signifikanten Aromaveränderungen zeigte, während die thermische Behandlung zu einem etwa 35 %-igen Aromaverlust im Vergleich zu frischem Guavasaft führte.

Eine Studie über den Einfluss der Verarbeitung bei Tomatensaft zeigte, dass nicht nur eine Konzentrierung sondern auch eine Anwendung von "Hot break" Bedingungen (82 °C, 15 s) oder Sterilisierung (121 °C, 42 s) zu Veränderungen der Aromazusammensetzung des pflanzlichen Ausgangsmaterials führt [*Sucan und Russel, 2002*].

Thermische Prozesse bewirken Aromaveränderungen nicht nur bei Säften und Saftkonzentraten sondern auch bei anderen Produkten. Die Aromastoffe dosenkonservierter Pflaumen unterschieden sich sowohl qualitativ als auch quantitativ von denen frischer Pflaumen. Benzaldehyd, Nonanal, 3-Hydroxybutan-2-on und Furfural dominierten das Aromaspektrum [*Ismail et al, 1980*]

Als Material für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen standen zwei industriell hergestellte entoxalisierte Konzentrate (60 °Brix) zur Verfügung. Die Produkte wiesen sowohl im Geruch als auch im Geschmack saure, gekochte, karamelartige sowie an Pflaumenmus erinnernde Noten auf. Der typische "grüne Charakter" frischer Rhabarberstiele fehlte bei den Konzentraten. Auch in der äußeren Erscheinung (dickflüssig, dunkelbraun-bernstein Farbe) zeigten die Konzentrate Ähnlichkeit mit einem Pflaumenerzeugnis.

#### 4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Isolierung flüchtiger Inhaltsstoffe der Rhabarberkonzentrate erfolgte durch Flüssig-Flüssig Extraktion. Die gewonnenen Extrakte wurden mittels HRGC und HRGC/MS analysiert. Die quantitative Bestimmung der Komponenten erfolgte durch Vergleich mit der vor der Probenaufarbeitung zugesetzten Standardverbindung (1-Decanol) unter Berücksichtigung von FID-Responsefaktoren und Wiederfindungsraten. Die in den beiden Konzentraten erfassten Verbindungen sind in *Tabelle 4.3.1* zusammengestellt. *Abbildung 4.3.1* zeigt die kapillargaschromatographische Trennung der aus Konzentrat II isolierten flüchtigen Inhaltsstoffe.

Tabelle 4.3.1 Mittels Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) aus Rhabarberkonzentraten  
isolierte flüchtige Komponenten

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	Konzentration (µg/kg) <sup>a</sup>			
		KI (DBWAX)	I	II	
<i>Alkohole</i>					
30	1,2-Ethandiol	1620	1875	3595	d
4	1-Propanol	1040	3293	7378	d
5	2-Methyl-1-propanol	1093	499	373	d
8	1-Butanol	1145	45	63	d
10	2-Methyl-1-butanol	1213	1387	993	d
11	1-Pentanol	1253	35	18	d
7	2-Pentanol	1121	16	82	d
6	3-Pentanol	1101	286	153	d
9	1-Penten-3-ol	1162	11	10	d
13	(Z)-2-Penten-1-ol	1322	14	27	e
12	4-Methyl-1-pentanol	1317	26	59	d
14	Hexanol	1358	28	37	d
17	(E)-2-Hexenol	1414	28	47	d
15	(Z)-3-Hexen-1-ol	1385	41	53	d
18	4-Methylhexanol	1434	n.q. <sup>g</sup>	n.q	d
45	Tetradecanol	2170	11	29	d
55	Octadecanol	2570	78	118	d
36	Benzylalkohol	1874	60	88	d
37	2-Phenylethanol	1910	59	20	d
16	2-Butoxyethanol	1401	6	49	e
34	1-(2-Butoxyethoxy)ethanol	1780	124	46	e
<i>Aldehyde</i>					
21	Decanal	1496	59	77	d
23	Benzaldehyd	1515	34	54	d
31	Phenylacetaldehyd	1627	107	264	d
56	Vanillin	2585	163	180	d
<i>Ester</i>					
1	Ethylformiat	814	3485	4877	d
2	Ethylacetat	856	8466	7988	d
28	Ethyl-2-furoat	1611	-	49	d
57	Diisobutylphthalat	2592	255	307	f
58	Dibutylphthalat	2693	156	71	d
62	Di(2-ethylhexyl)phthalat	3160	n.q	n.q	d
<i>Säuren</i>					
19	Essigsäure	1449	233733	262825	d
25	Propansäure	1540	38	49	d
26	2-Methylpropansäure	1562	60	25	d

Tabelle 4.3.1 Fortsetzung

Nr. <sup>b</sup>	Verbindung	Konzentration (µg/kg) <sup>a</sup>			
		KI (DBWAX)	Konzentrat <sup>c</sup>		
			I	II	
33	2-Methylbuttersäure	1670	314	342	d
35	Hexansäure	1846	123	19	d
49	Decansäure	2286	595	66	d
53	Dodecansäure	2480	404	35	d
59	Tetradecansäure	2706	314	289	d
60	Hexadecansäure	2913	2187	1853	d
51	o-Hydroxyzimtsäure	2410	432	75	f
52	2-Furoinsäure	2420	340	230	f
<b><i>Furane, Pyrone, Pyrrole</i></b>					
20	Furfural	1455	11505	7555	d
27	5-Methylfurfural	1565	60	29	d
54	5-Hydroxymethylfurfural	2500	47343	22028	d
22	2-Acetylfuran	1498	324	157	d
41	2-(Hydroxyacetyl)-furan	1990	1746	1147	f
32	Furfurylalkohol	1653	244	124	d
39	Maltol	1943	544	85	d
47	5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol	2251	1227	59	f
48	5-Hydroxymaltol	2277	743	362	f
42	2-Formylpyrrol	2010	6330	2773	d
40	Unbekannt, MG:112	1980	581	1064	-
<b><i>Sonstige</i></b>					
29	2-Undecanon	1614	-	77	d
38	γ-Octalacton	1914	883	1185	d
43	Pantolacton	2012	136	234	f
44	γ-Decalacton	2140	267	188	d
46	Unbekannt, MG:150	2182	387	284	f
50	Isoeugenol	2340	145	53	d
61	Squalen	3058	n.q	n.q	d

<sup>a</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen (Standardabweichung für alle Komponenten <15%).

<sup>b</sup> Die Nummern der Verbindungen entsprechen denen in Abbildung 1 (Nummer 24 ist ein nicht-identifiziertes und nicht-reproduzierbares Artefakt; Nummer 3 ist Ethanol (Lösungsmittel für Internen-Standard), die in dieser Tabelle nicht aufgeführt sind).

<sup>c</sup> Untersuchungsmaterial aus 2000 (I) und 2001 (II). Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte <sup>d</sup> mit Hilfe von Referenzsubstanzen; <sup>e</sup> durch Vergleich der kapillargaschromatographischen (Retentionszeit–Kovats-Index) und massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben; <sup>f</sup> durch Vergleich der massenspektrometrischen Daten mit Literaturangaben. KI: Kovats Indices. <sup>g</sup> n.q.: nicht quantifizierbar, da Überlappung mit Essigsäurepeak.

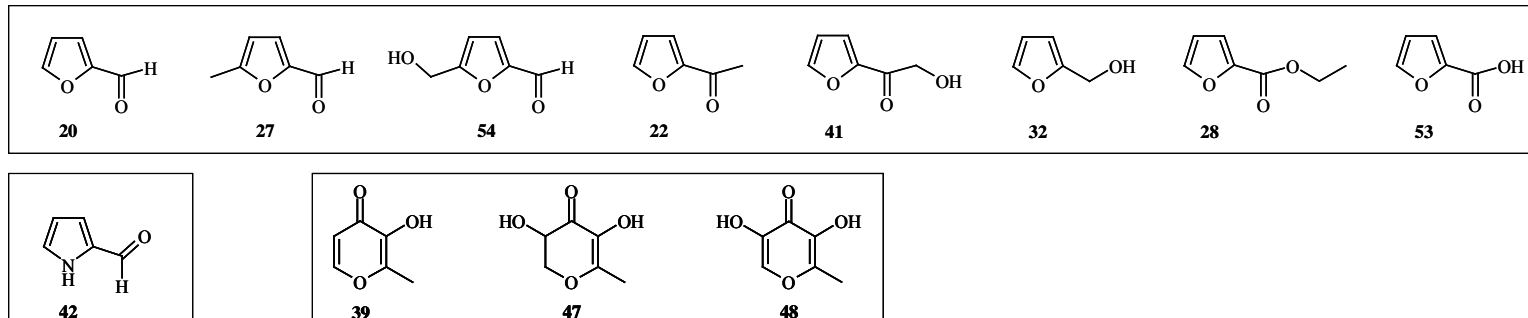
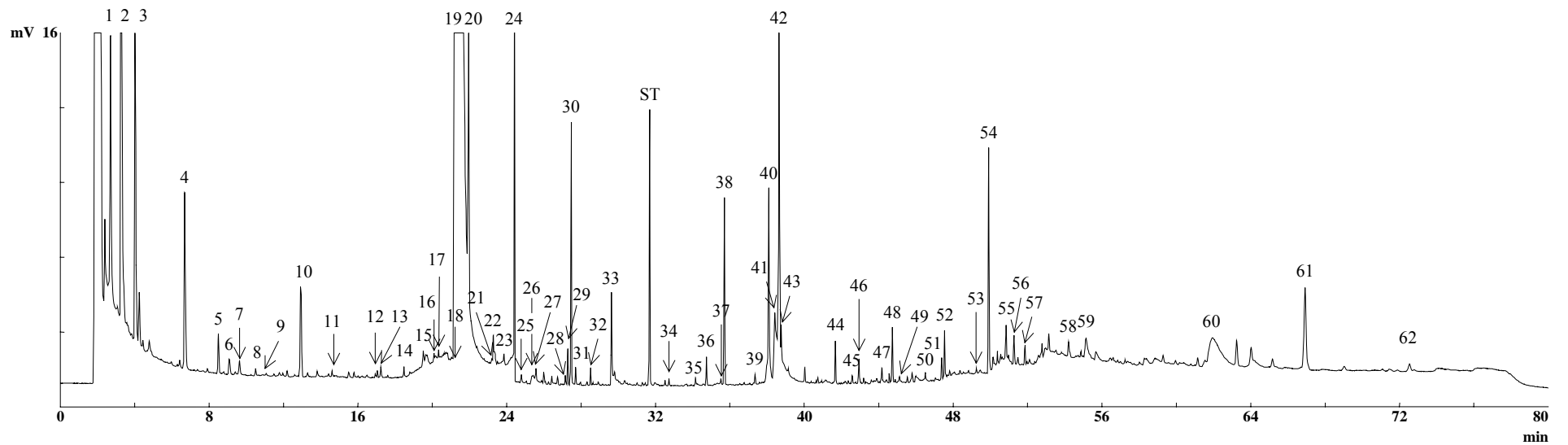


Abbildung 4.3.1

Kapillargaschromatographische Trennung (DBWAX) der mittels Flüssig-Flüssig Extraktion aus Rhabarber-Konzentrat II isolierten flüchtigen Komponenten

(Die angegebenen Nummern der Verbindungen entsprechen denen in Tabelle 1; für Bedingungen siehe Material und Methoden; ST: Internal Standard, 1-Decanol)

Mit Ausnahme von zwei Verbindungen (Ethyl-2-furoat und 2-Undecanon) wurden in beiden Konzentraten die gleichen Komponenten identifiziert. Unterschiede waren lediglich in den mengenmäßigen Verteilungen zu erkennen. Die flüchtigen Inhaltsstoffe der Konzentrate unterschieden sich deutlich von dem Spektrum an Verbindungen, welches mittels LLE aus frischen Rhabarberstielen isoliert wurde. Die im frischen Rhabarber dominierenden C<sub>6</sub>-Verbindungen (Aldehyde, Alkohole und Säuren) waren im Konzentrat nicht oder nur in Spuren vorhanden. Lediglich drei Alkohole (Hexanol, (E)-2-Hexenol und (Z)-3-Hexenol) konnten in Mengen <50 ppb nachgewiesen werden. Dieses Phänomen einer deutlichen Reduzierung des Gehaltes an C<sub>6</sub>-Verbindungen war auch bei dem Konzentrierungsprozess im Zuge der Herstellung von Tomatenmark beobachtet worden [Buttery et al, 1990].

Als mengenmäßig vorherrschender flüchtiger Bestandteil der Konzentrate wurde Essigsäure identifiziert. Daneben stellten Vertreter von Furanen, Pyronen und Pyrrolen die konzentrationsstärksten Inhaltsstoffe dar. Einige der Strukturen sind in *Abbildung 4.3.1* dargestellt. Diese Verbindungen sind typische Maillard-Produkte, die bei der thermischen Behandlung und/oder Lagerung von Lebensmitteln gebildet werden können. Bei der Maillard-Reaktion handelt es sich um eine Vielzahl von Folge- und Parallelreaktionen zwischen Aminoverbindungen und reduzierenden Zuckern bzw. deren Abbauprodukten. Vorkommen, Bildung und Bedeutung zahlreicher Maillard-Komponenten für das Aroma thermisch behandelte Lebensmittel wurden in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefasst [Parliment, 1989; Ho, 1996; Tressl and Rewicki, 1999; Kerler und Winkel, 2001].

In Rhabarber-Konzentrat wurden 5-Hydroxymethylfurfural und Furfural als mengenmäßig wichtigste Maillard-Reaktionsprodukte nachgewiesen, deren Bildung sich über Cyclisierung und Dehydratisierung aus der Amadori-Verbindung (1-Amino-1-desoxyketose) ableitet. Sie sind die bekanntesten Zerfallprodukte der 3-Desoxyosone, die aus Hexosen und Pentosen hervorgehen [Vernin und Parkanyi, 1982; Tressl und Rewicki, 1999]. 5-Hydroxymethylfurfural, aber auch Furfural, werden in der Regel als Indikator der Qualitätverschlechterung eines Lebensmittels im Verlauf der Hitzebehandlung (Wärmeschädigung) oder Lagerung angesehen [Mijares et al, 1986; Gomis et al, 1991; Akalin und Gönc, 1997; Luz Sans et al, 2003].



Das Interesse an 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) ist gewachsen, nachdem die karzinogene und mutagene Potenz dieser Verbindung nachgewiesen wurde [Ulbrich *et al*, 1994; Surh und Tannenbaum, 1994].

Eine umfassende Studie von Bachmann *et al* (1997) zum Gehalt an HMF in rund 500 Lebensmitteln aus verschiedenen Produktgruppen zeigte, dass in karamelhaltigen Produkten (110-9500 mg/kg), Trockenpflaumensäften (510-2850 mg/L) und Dörrobst (Pflaumen, Äpfel, Birnen; 26-3500 mg/kg) hohe Mengen enthalten sind. Der HMF-Gehalt in anderen Produkten, z. B. in Marmeladen (0.1- 3.8 mg/kg, Luz Sanz *et al*, 2003; 0.7-34 mg/kg, Bachmann *et al*, 1997) oder Honig (5.1-18.5 mg/kg, Rada-Mendoza *et al*, 2002; <0.1-57 mg/kg, Bachmann *et al*, 1997) ist vergleichsweise geringer. Die HMF-Gehalte in den untersuchten Rhabarberkonzentraten (47.4 und 22.0 mg/kg) liegen ebenfalls in diesen Größenordnungen und sind auch vergleichbar mit den in Birnendicksäften gefundenen Werten (4.8-38 mg/L, Bachmann *et al*, 1997). Berücksichtigt man, dass Konzentrate rückverdünnt werden, liegen die dann zu erwartenden Werte in der gleichen Größenordnung wie die in pasteurisierten Fruchtsäften (<0.1-10 mg/L, Bachmann *et al*, 1997).

Neuere Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen von Janzowski *et al* (2000) deuten darauf hin, dass die durchschnittliche Aufnahme von HMF durch Verzehr von Lebensmitteln kein Gesundheitsrisiko darstellt.

Neben den Furan-Verbindungen konnte 2-Formylpyrrol als quantitativ wichtige stickstoffhaltige Komponente in den Konzentraten identifiziert werden. Es handelt sich um eine Komponente, die in anderen Lebensmitteln, wie z.B. in Hopfen [Tressl *et al*, 1974], Sesam Öl [Shimoda *et al*, 1996], Popcorn [Buttery *et al*, 1997] und Tomatenpulver [Eichner *et al*, 1998] ebenfalls beschrieben wurde. Pyrrole sind bekannt als aromaaktive Komponenten, von denen viele einen röstigen, erdigen, malzigen Charakter besitzen [Maga, 1981]. Besondere Bedeutung hat das röstig, cracker- und popcornartig riechende 2-Acetylpyrrolin, das mit dem niedrigsten Geruchsschwellenwert (0.1 ppb) aus der Gruppe der Pyrrol-Verbindungen entscheidend zum charakteristischen Aroma von Popcorn, Reis und Crakern beiträgt [Schieberle, 1991; Buttery *et al*, 1983; Buttery *et al*, 1994].

Während substituierte Furane, Pyrrole, Thiophene und Pyridine im Verlauf der Maillard-Reaktion üblicherweise aus dem 3-Desoxyaldoketose-Weg gebildet werden, sind

substituierte Cyclopentenone, Pyrone, Furanone, und Reduktone die bekannten Produkte des 1-Desoxy-2,3-diketose Weges [Vernin und Parkanyi, 1982; Tressl und Rewicki, 1999]. In Rhabarberkonzentraten konnten als Beispiele für solche  $\gamma$ -Pyrone Maltol, 5-Hydroxymaltol [3,5-Dihydroxy-2-methyl-4(H)-pyran-4-on] und 5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol [2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-on] identifiziert werden. Der Bildungsweg von Maltol wurde schon in den 50-er Jahren von Patton (1950) untersucht. Sie erklärten diese Komponente als Folgeprodukt beim Erhitzen von Glycin mit Maltose oder Lactose. Die Untersuchungen von Kim und Baltés (1996) zeigten, dass der thermische Abbau von 5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol zur Bildung verschiedener Produkte, u.a. zu Maltol und 5-Hydroxymaltol führt. 5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol wurde erstmals von Mills et al (1970) identifiziert. Diese Verbindung wurde in vielen erhitzten Lebensmitteln (z.B. in Gemüsen, Fleisch, Karamelprodukten, gebrannten Mandeln und Brotkruste) nachgewiesen [Ledl et al, 1976]. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Pyrone mit ihren karamelartigen, röstigen, getoasteten, malzigen und gekocht riechenden Noten entscheidend zum Aroma vieler Lebensmittel beitragen, wie z.B. Soja Sauce [Nonomura et al, 1980], Malz [Fickert und Schieberle, 1998] und Süßkartoffeln [Sun et al, 1995]. Pyrone (5-Hydroxymaltol und 5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol) und Furane (2-Acetylfuran, Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural) wurden auch in Erdbeermarmelade nachgewiesen [Barron und Etiévant, 1990].

Die in den unter Rückfluss erhitzten Rhabarberhomogenaten aufgetretene unbekannte Verbindung (Nr. 40 in Tab. 4.3.2 bzw. Abb. 4.3.1, MG: 112) wurde in den Konzentraten ebenfalls detektiert. Wie bereits diskutiert, konnte diese Verbindung nicht eindeutig identifiziert werden.

Die in frischen Rhabarberstielen nachgewiesenen methylverzweigten Verbindungen waren auch in den Konzentraten vorhanden. Aus der Klasse der 2-methylverzweigten Komponenten konnten 2-Methylbutanol und 2-Methylpropanol sowie ihre entsprechenden Säuren identifiziert werden. Aus der Gruppe der 4-methylverzweigten war 4-Methylhexanol nachweisbar, während 4-Methylhexansäure in den Konzentraten nicht gefunden werden konnte.

Die sensorischen Eigenschaften der Konzentrate korrelierten mit dem Spektrum der identifizierten flüchtigen Verbindungen. Wie gezeigt, stellten Essigsäure und die Maillard-Reaktionsprodukte die Hauptkomponenten dar. Während Essigsäure einen sauren und

stechenden Geruch besitzt, weisen die nachgewiesenen Maillard-Produkte eine karamelartig-röstige, gekochte Note auf [Fickert und Schieberle, 1998; Cutzach et al, 1997]. Diese tragen möglicherweise zum Gesamtgeruchseindruck des Konzentrates bei. Die auch in thermisch behandelten Pflaumenprodukten (Trockenpflaumensaft, Dörrobst, gekochte Pflaumen) in bedeutenden Mengen vorhandenen Furane (Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural) [Ismail et al, 1980; Sabarez et al, 2000; Luz Sanz et al, 2003; Vernin et al, 1986] könnten für den an Pflaumenmus erinnernden Geruch der Konzentrate verantwortlich sein. Zur Ermittlung des tatsächlichen Beitrags einzelner Komponenten zum Aroma der Rhabarberkonzentrate müsste eine GC/O-Bewertung gekoppelt mit einer Aromaextraktverdünnungsanalyse durchgeführt werden, wie sie in Kapitel 4.1.3 für die VHS-Extrakte von Rhabarberstielen beschrieben wurde.

#### 4.3.3 Zusammenfassung

Die flüchtigen Verbindungen industriell hergestellter Rhabarber-Konzentrate wurden mittels Flüssig-Flüssig Extraktion isoliert und kapillargaschromatographisch/massenspektrometrisch untersucht.

Die in frisch geschnittenen Rhabarberstielen vorherrschenden C<sub>6</sub>-Verbindungen spielten in den Konzentraten nur eine untergeordnete Rolle; es waren lediglich Spuren von Hexanol, (E)-2-Hexenol und (Z)-3-Hexenol nachweisbar. Aus der Klasse der methylverzweigten Komponenten wurden 2-Methylbutanol, 2-Methylpropanol und ihre entsprechenden Säuren sowie 4-Methylhexanol identifiziert. Neben Essigsäure wurden als Hauptinhaltsstoffe Verbindungen nachgewiesen, deren Bildung durch thermisch katalysierte Reaktionen im Zuge der Konzentrierung erklärt werden kann. Neben den quantitativ dominierenden Furanen (5-Hydroxymethylfurfural und Furfural) wurden als weitere typische Maillard-Produkte  $\gamma$ -Pyrone (Maltol, 5-Hydroxymaltol und 5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol) sowie 2-Formylpyrrol nachgewiesen.

Die Unterschiede in den Spektren flüchtiger Verbindungen von frischem Rhabarber und Rhabarber-Konzentrat stimmten mit den sensorischen Bewertungen überein. Die für frisch geschnittene Rhabarberstiele typische "grüne" Note fehlte in den Konzentraten. Die Hauptkomponenten (Essigsäure und Maillard-Produkte) tragen möglicherweise zum sauren sowie gekochten, karamelartigen und an Pflaumenmus erinnernden Gesamtgeruchseindruck bei.

## 4.4 Flüchtige Verbindungen kommerzieller Rhabarber-Aromen

### 4.4.1 Einleitung

Auf der Basis naturidentischer Aromastoffe wird kommerziell ein breites Spektrum von Aromen hergestellt, die zur Aromatisierung insbesondere verarbeiteter Lebensmittel eingesetzt werden. Auch für die Geruchsnote "Rhabarber" werden Aromen angeboten, die an Rhabarberkuchen oder -kompott erinnernde Geruchsnoten aufweisen. Drei solcher auf der Basis naturidentischer Aromastoffe aufgebaute Aromen standen zur Verfügung; ihre Zusammensetzungen sollten mit den in Rhabarber identifizierten Komponenten verglichen werden.

### 4.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die durch kapillargaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen der Aromen ermittelten prozentualen Verteilungen der Aromastoffe sind in *Tabelle 4.4.1* zusammengestellt.

Es ist ersichtlich, dass die Aromen sich hinsichtlich Zahl und Art der Komponenten deutlich unterscheiden. Eine Schlüsselkomponente, die in allen Aromen enthalten war, ist 1-Phenylethylacetat. Aroma 1 bestand fast vollständig (98,5 %) aus diesem Ester. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von Rhabarber konnten weder 1-Phenylethylacetat noch der in allen drei Aromen ebenfalls enthaltene Alkohol 1-Phenylethanol nachgewiesen werden. Lediglich der in Aroma 3 ebenfalls anwesende isomere Alkohol 2-Phenylethanol war auch in Rhabarberstielen detektierbar.

Die in den ungekochten Rhabarberstielen dominierenden ungesättigten C<sub>6</sub>-Aldehyde und -Alkohole spielen in den Rhabarber-Aromen nur eine untergeordnete Rolle, lediglich in Aroma 2 liegen diese Komponenten mit einem Anteil von ca. 12 % vor. Auch aus der Gruppe der 2- bzw. 4-methylverzweigten Alkohole und Säuren ist nur 2-Methylbuttersäure vertreten. Im Gegensatz zu den Rhabarberstielen zeichnen sich die Aromen 2 und 3 durch relativ hohe Gehalte an Estern aus. In Aroma 2 stellen neben den Estern der C<sub>6</sub>-Alkohole der schwefelhaltige Ester Methyl-3-(methylthio)-propanoat und Ethylbutanoat die Hauptvertreter dieser Stoffklasse dar. Hauptkomponente in Aroma 3 ist das in Rhabarber nicht detektierte Vanillin.

Tabelle 4.4.1 Zusammensetzungen kommerzieller Rhabarber-Aromen

	(% )			
	1	2	3	
<b>Ester</b>				
Ethylacetat		0,2	2,9	*
Ethylformiat		0,05	0,2	*
Ethylbutanoat		12,5	1,0	
Ethylhexanoat		3,0	0,2	
Ethyllactat			1,6	
Ethyl-2-methylbutanoat			3,0	
Ethyl-3-methylbutanoat			3,1	
Ethylpropanoat			0,1	
Ethyl-2-propenoat			0,1	
Hexylacetat		0,05		*
(E)-2-Hexenylacetat		0,3		*
(Z)-3-Hexenylacetat		1,0	0,5	
(Z)-3-Hexenyllactat			0,2	
(E)-3-Hexenylbutanoat		0,1		*
(Z)-3-Hexenylhexanoat		0,1		
Hexylbutanoat		0,4		
Hexylformiat		0,2		
Hexylhexanoat		0,5		
Hexyl-2-methylbutyrat		0,1		
3-Methylbutylacetat			1,0	
3-Methylbutylbutanoat			0,6	
(E)-Methyl-3-hexenoat		0,1		
Methyltridecanoat		0,9	0,3	
1-Phenylethylacetat	98,5	12,6	15,0	
2-Phenylethylacetat			1,0	
Propylbenzoat		9,2		
<b>Alkohole</b>				
3-Methylbutanol			0,3	
Hexanol		4,8		*
(Z)-3-Hexenol		1,9	0,8	*
(E)-3-Hexenol		0,1		*
(E)-2-Hexenol		0,9		*
1-Phenylethanol	0,4	1,7	2,8	
2-Phenylethanol			0,2	*
Linalool		0,1		*
<b>Aldehyde, Acetale</b>				
Hexanal		0,1		*
Hexanal-PG-acetal		3,9		
Vanillin		3,3	44,2	
Vanillin-PG-acetal		0,2	6,8	
<b>Ketone</b>				
Acetoin		6,3		
2,3-Butandion		0,9	0,1	

Tabelle 4.4.1 (Fortsetzung)

	(%)			
	1	2	3	
1,3-Dihydroxy-2-propanon	0,7			
<b>Säuren</b>				
Buttersäure		0,6	0,5	*
Essigsäure		7,6	10,7	*
Hexansäure		2,3	0,7	*
2-Methylbuttersäure		3,7		*
Propansäure			0,2	*
<b>Lactone</b>				
$\gamma$ -Decalacton		3,4	0,5	*
<b>Schwefelverbindungen</b>				
Dimethyldisulfid		0,04		
Hexyl-3-(methylthio)-propanoat		0,3		
Methyl-3-(methylthio)-propanoat		13,5		
<b>Sonstige</b>				
Anethol			0,3	*
<b>Lösungsmittel<sup>b</sup></b>				
	PG	PG,E	PG,E	

<sup>a</sup> Mittelwert aus Doppelbestimmung. <sup>b</sup> PG (1,2-Propandiol), E (Ethanol).  
\* nachgewiesen in Rhabarberstielen.

Neben der analytischen wurde auch eine sensorische Bewertung der Aromen durchgeführt (Tab. 4.4.2). Aroma 1 zeigte kaum eine Veränderung in der Geruchsnote in Abhängigkeit von der Verdünnung. Demgegenüber traten bei Verdünnen der wesentlich komplexer aufgebauten Aromen 2 und 3 die sich aus den Bausteinen ergebenden Einzelnoten deutlich zutage. Bei Aroma 2 war eine schwefelige Kohl-Note erkennbar, während Aroma 3 eine intensive süße Vanille-Note aufwies.

Insgesamt besteht nur eine geringe Ähnlichkeit zwischen den in den Rhabarber-Aromen enthaltenen Komponenten und dem im Rahmen dieser Arbeit in Rhabarber identifizierten Spektrum flüchtiger Inhaltsstoffe.

Tabelle 4.4.2 Sensorische Bewertung der Aromen

Aroma	Original	Stufe der Verdünnung (mit Wasser)		
		1:20	1:100	1:1000
<b>1</b>	fruchtig, blumig, Rhabarberkuchen/- kompott	fruchtig, blumig, süßlich, terpentinartig Rhabarberkuchen/ -kompott	fruchtig, blumig, terpentinartig Rhabarberkuchen/- kompott	fruchtig, blumig Rhabarberkuchen/- kompott
<b>2</b>	fruchtig, esterig, schwefelig, gekocht Rhabarberkuchen/- kompott	fruchtig, malzig gekochter Kohl Rhabarberkuchen/ -kompott	fruchtig, gekochter Kohl, schwefelig, sahnig, Rhabarberkuchen/- kompott	fruchtig, gekocht, schwefelig, sahnig, Likörnote, Rhabarberkuchen/- kompott
<b>3</b>	Rumtopf, fruchtig, blumig, Vanille Rhabarberkuchen/- kompott	fruchtig, blumig, esterig, Rum, süßlich-säuerlich, Vanille Rhabarberkuchen/ -kompott	fruchtig, blumig, esterig, Rum, süßlich-säuerlich, Vanille, Rhabarberkuchen/- kompott	fruchtig, blumig, süßlich Rhabarberkuchen/- kompott

## 4.5 Chirale Aromastoffe in Rhabarber

### 4.5.1 Einleitung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, stellen neben den C<sub>6</sub>-Komponenten methylverzweigte Verbindungen eine andere wichtige Gruppe flüchtiger Inhaltsstoffe von Rhabarberstielen dar. Die 2-methylverzweigten Komponenten 2-Methylbutanol und 2-Methylbuttersäure sind die konzentrationstärksten Vertreter. Diese 2-methylverzweigten Verbindungen galten als typische Beispiele für chirale Aromastoffe, von denen in Lebensmittelmatrixen eines der beiden Enantiomere ausschließlich oder zumindest mit hoher optischer Reinheit vorliegt. Eine hohe optische Reinheit zugunsten der (S)-Enantiomere (>94 %) wurde für 2-methylverzweigte Alkohole, Säuren und Ester in Äpfeln und in Apfelerzeugnissen (Apfelsaft, Apfelwein, Cider, Calvados) ermittelt [Rettinger et al, 1990; Mosandl et al, 1990; Karl et al, 1992; Schumacher et al, 1998]. Es wurde gezeigt, dass 2-Methylbuttersäure auch in anderen Lebensmitteln, z.B. in Früchten (Erdbeeren, Papaya, Johannisbeeren, Ananas), alkoholischen Getränken (Weißwein, Bier, Cognac) sowie Käse mit einer optischen Reinheit von mindestens 80 %, meist zu mehr als 95 % in der (S)-Konfiguration vorliegt [Mosandl et al, 1990]. 2-Methylbutanol wurde in fermentierten Produkten (z.B. aus Weintrauben, Kartoffeln, Äpfeln und Stärke verschiedener Pflanzen) ebenfalls bevorzugt als (S)-Enantiomer nachgewiesen [Schumacher et al, 1999].

Bisher waren nur wenige Ausnahmen von dieser generellen Regel bekannt. So wurde in Parmesankäse für 2-Methylbuttersäure lediglich ein Enantiomerenverhältnis von 75 % (S)/25 % (R) gefunden [Werkhoff et al, 1993]. In gerösteten Kaffeebohnen (Arabica) wurde 2-Methylbuttersäure mit einem Anteil an (R)-Enantiomer von 72 % nachgewiesen [Maier, 2003]. Es wurde gezeigt, dass dieses Enantiomer im grünen Kaffee in einer Menge <0.95 mg/kg vorkommt. Erst der Röstprozess führte zu erhöhtem Gehalt an (R)-2-Methylbuttersäure (2-3 mg/kg).

Außerdem zeigte sich ein Verhältnis von etwa 2:1 zwischen (S)- und (R)-2-Methylbuttersäure in einem hydrolysierten Extrakt einer Handelsprobe von Römischer Kamille (*Chamaemelum nobile* (L.) ALLIONI syn. *Anthemis nobilis* L.) [Karl 1995]. Weitere Ausnahmen bilden einige Heilpflanzen, wie die *Veratrum* Arten. Die bei diesen Pflanzen vorkommenden Alkaloide sind Esteralkaloide, die sich von den C<sub>27</sub>-Alkaminen, wie Germin, Proteverin, Veravicin und Zygadin ableiten. Diese stark hydroxyhaltigen



Alkamine kommen in der Natur in mit 1-4 Carbonsäuren veresterter Form vor, wobei (R)-2-Methylbuttersäure eine der wichtigsten Säuren darstellt [Fieser und Fieser, 1976]. Weisenborn et al (1953) isolierten (R)-2-Methylbuttersäure aus *Veratrum viride*. In einer homöopathischen Zubereitung von Germer (*Veratrum album*) wurde (R)-2-Methylbuttersäure mit einer optischen Reinheit von 99 % nachgewiesen [Mosandl et al, 1990]. Der getrocknete Wurzelstock von Germer wurde in der Volksheilkunde bei Herz-Rhythmusstörungen und -Beschwerden, zur Linderung von Krämpfen, Erbrechen und Durchfall sowie bei Fieber verwendet. Besondere Bedeutung hatte die Droge früher als Bestandteil des "Schneeberger Schnupftabaks" [Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen, 2000].

Über die natürlichen Enantiomerenzusammensetzungen von 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure in Lebensmittelmatrices lagen bisher keine Daten vor. Řezanka und Dembitsky (2002) zeigten, dass der aus Israel stammende Süßwasser-Schwamm (*Cortispongilla barroist*) (R)-4-Methylhexansäure produziert.

Ziel der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen war es, die in Rhabarberstielen vorliegenden Enantiomerenverteilungen von 2-Methylbutanol, 2-Methylbuttersäure, 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure zu bestimmen. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der Multidimensionalen Gaschromatographie. Diese Analysenmethode ermöglichte eine direkte Untersuchung der betreffenden Verbindungen, wobei die Auftrennung der flüchtigen Fraktion der Rhabarberstiele an einer achiralen Phase und die nachfolgende Stereodifferenzierung ausgewählter Verbindungen an einer chiralen Phase durchgeführt wurden.

#### 4.5.2 Kapillargaschromatographische Enantiomerentrennung methylverzweigter Verbindungen

Bei dem für die Analyse verwendeten "multidimensionalen" Gaschromatographiesystem erfolgte die Kopplung der Säulen mit Hilfe eines *Moving Column Stream Switching* Systems (MCSS). Als Säulenkombinationen wurden eine achirale DB-5 bzw. eine DBWAX Kapillarsäule gekoppelt mit einer Kapillarsäule belegt mit 33% Heptakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)- $\beta$ -Cyclodextrin in OV-1701-vi [Perethyl- $\beta$ -CD] als chiraler Phase verwendet. Bicchi et al (1999) zeigten, dass modifizierte Cyclodextrin-Phasen (peralkylierte bzw. alkylierte/acylierte Derivate von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cyclodextrinen) vielseitig zur Analyse von

Aromen und etherischen Öle eingesetzt werden können. Von den peralkylierten  $\beta$ -Cyclodextrinen wurden die meisten Trennungen an permethyliertem  $\beta$ -Cyclodextrin durchgeführt [z.B. *Ruiz Del Castillo und Dobson, 2002; Reinhardt et al, 1995; Kreis et al, 1991; Mosandl et al, 1991*]. Über die Anwendung perethylierten  $\beta$ -Cyclodextrins als stationäre Phase zur chiroselektiven Analyse ist wenig in der Literatur bekannt. Auf dieser Phase wurden direkte gaschromatographische Enantiomerentrennungen von Linalool und  $\alpha$ -Terpineol [*Askari et al, 1991*] sowie von 2-alkylverzweigten Aromastoffen [*Rettinger et al, 1991; Karl et al, 1991; Karl et al, 1992*] durchgeführt. Die Phase ist, ähnlich wie andere peralkylierte  $\beta$ -Cyclodextrine, thermisch stabil [*Dai et al, 1995 a*] und wurde auch erfolgreich zur Trennung der Positionsisomere aromatischer Verbindungen (Phenol-, Benzolderivate) eingesetzt [*Dai et al, 1995 b; Jing et al, 1996*].

Wie aus *Abbildung 4.5.1* ersichtlich, konnten auf der Perethyl- $\beta$ -CD Phase die Enantiomere der in Rhabarberstielen identifizierten methylverzweigten Verbindungen getrennt werden. Die Bestimmung der Elutionsreihenfolge mit Hilfe authentischer Referenzsubstanzen definierter Chiralität zeigte, dass bei 2-Methylbutanol das (R)-Enantiomer vor dem (S)-Enantiomer eluiert. Im Vergleich dazu wurde für 2-Methylbuttersäure eine Umkehr der Reihenfolge festgestellt. Dies stimmt mit den von *Rettinger et al (1991)* sowie *Karl et al (1991, 1992)* beschriebenen Ergebnissen überein.

Die Enantiomere von 4-Methylhexanol konnte mit Hilfe der Perethyl- $\beta$ -CD Phase erstmals kapillargaschromatographisch getrennt werden. Die Enantiomere der entsprechenden Säure 4-Methylhexansäure waren auf Heptakis(2,3-Dimethyl-6-tert-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -Cyclodextrin als chiraler stationärer Phase getrennt worden, wobei jedoch keine Angaben zur Elutionsreihenfolge gemacht wurden [*Maas et al, 1993*]. *Řezanka und Dembitsky (2002)* trennten 4-Methylhexansäuremethylester auf Heptakis(2,6-Dimethyl-3-pentyl)- $\beta$ -Cyclodextrin. In Analogie zu den 2-methylverzweigten Verbindungen war auch für die 4-methylverzweigten Komponenten 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure eine Umkehr in der Elutionsreihenfolge der Enantiomere zu beobachten.

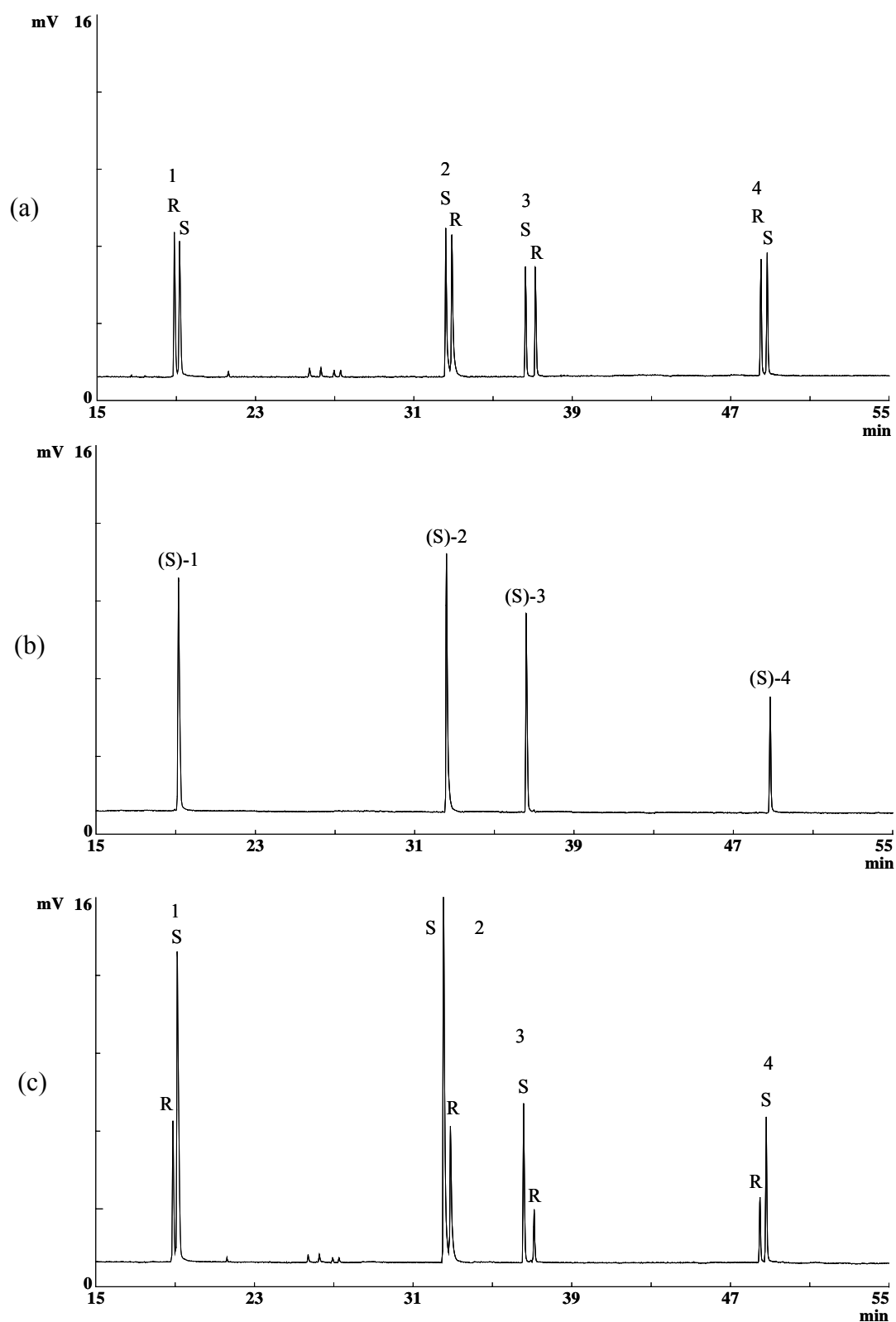


Abbildung 4.5.1 Trennung von 2-Methylbutanol (1), 4-Methylhexanol (2), 2-Methylbuttersäure (3) und 4-Methylhexansäure (4) auf Perethyl- $\beta$ -CD

(a) racemische Referenzsubstanzen; (b) (S)-Enantiomere;

(c) Racemische Referenzsubstanzen angereichert mit (S)-Enantiomeren

Bedingungen: Vorsäule, DB-5; 40 °C/5 min isotherm//4 °C/min $\rightarrow$ 230 °C

Hauptsäule, Perethyl- $\beta$ -CD; 37 °C/10 min isotherm //2 °C/min $\rightarrow$ 160 °C

#### 4.5.3 Enantiomerenverteilungen von 2- und 4-methylverzweigten Alkoholen und Säuren in Rhabarber-Extrakten

Mittels Enantio-MGDC gelang es, die methylverzweigten Verbindungen direkt, d. h. nach selektivem Transfer von der achiralen Vorsäule auf die chirale Hauptsäule (Perethyl- $\beta$ -CD), zu analysieren.

Abbildung 4.5.2 zeigt die Enantiomerenverteilung von 2-Methylbutanol (1), 4-Methylhexanol (2), 2-Methylbuttersäure (3) und 4-Methylhexansäure (4), wie sie nach MDGC-Analyse eines VHS-Extraktes unter Verwendung einer DB-5 als chirale Vorsäule ermittelt wurden. Es ist ersichtlich, dass deutliche Überschüsse an (R)-Enantiomeren vorliegen.

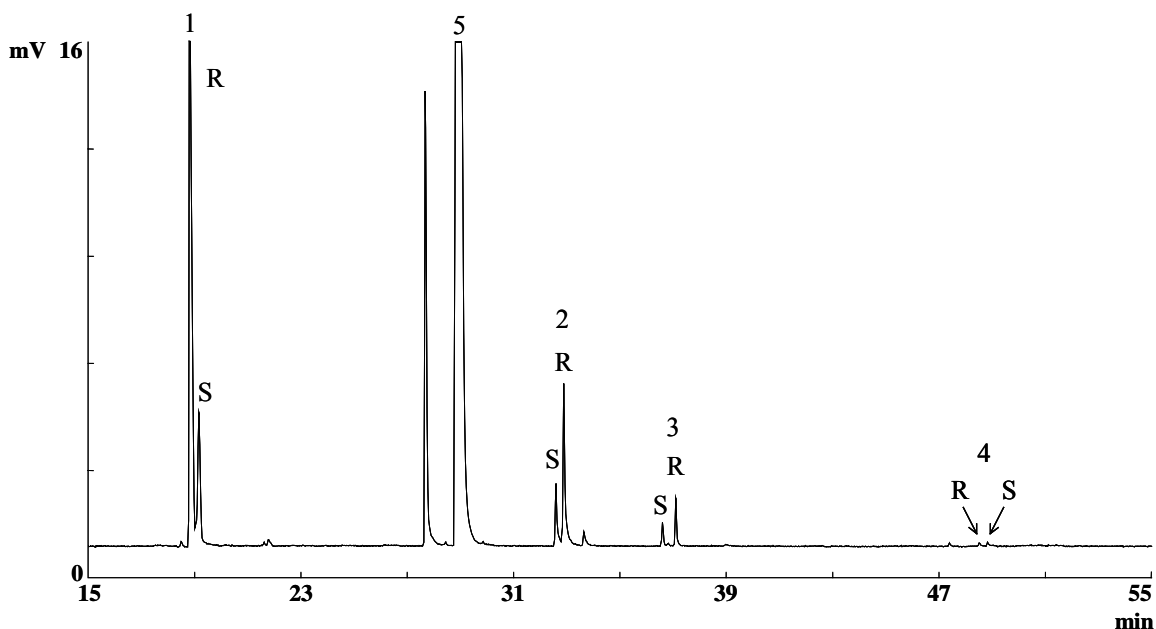


Abbildung 4.5.2 Enantioselektive MDGC-Analyse eines VHS-Extraktes auf Perethyl- $\beta$ -CD

2-Methylbutanol (1), 4-Methylhexanol (2), 2-Methylbuttersäure (3), 4-Methylhexansäure (4), (E)-2-Hexenol (5)

Bedingungen: Vorsäule, DB-5; 40 °C/5 min isotherm//4 °C/min→230 °C

Hauptsäule, Perethyl- $\beta$ -CD; 37 °C/10 min isotherm //2 °C/min→160 °C

Um dieses überraschende Ergebnis zu bestätigen und um auszuschließen, dass es bei den "Cuts" zum Co-Transfer von Substanzen kommt, die auf der chiralen Phase mit einem der getrennten Enantiomere koeluiieren, wurde eine Kapillarsäule entgegengesetzter Polarität (DBWAX) als Vorsäule verwendet (Abb. 4.5.3).

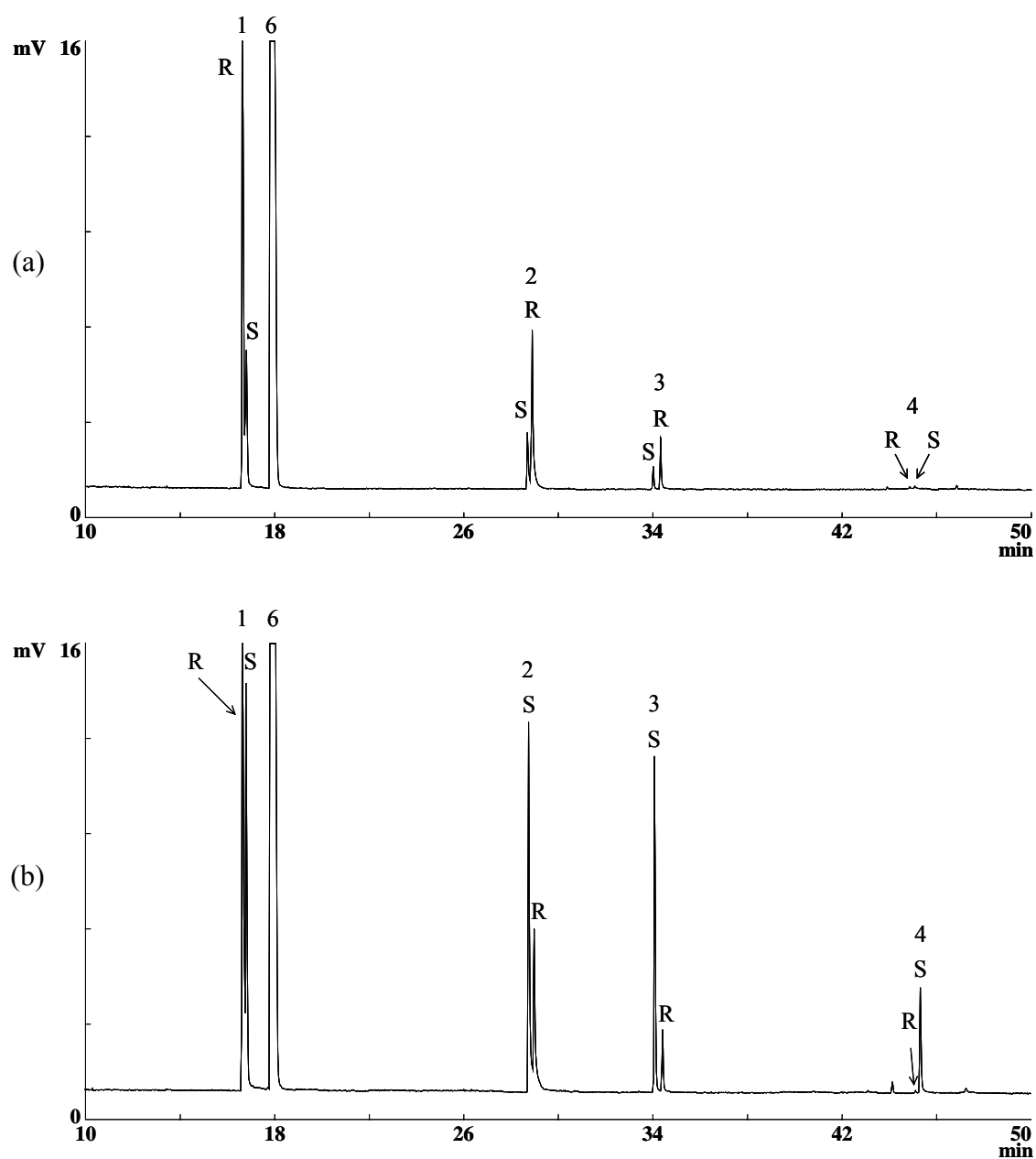


Abbildung 4.5.3 Enantioselektive MDGC-Analyse (a) eines VHS-Extraktes und (b) eines mit (S)-Enantiomeren angereicherten VHS Extraktes

2-Methylbutanol (1), 4-Methylhexanol (2), 2-Methylbuttersäure (3), 4-Methylhexansäure (4), (E)-2-Hexenol (6)

Bedingungen: Vorsäule: DBWAX; 40 °C/5 min isotherm//4 °C/min→230 °C

Hauptsäule: Perethyl- $\beta$ -CD; 47 °C/10 min isotherm//2 °C/min→160 °C

Wie in *Abbildung 4.5.3 (a)* darstellt, wurden auch nach der Überführung der Substanzen von der DBWAX-Vorsäule auf die Perethyl- $\beta$ -CD-Phase vergleichbare Anteile an (R)-Enantiomeren nachgewiesen werden.

Ein Vergleich von *Abbildung 4.5.2* mit *Abbildung 4.5.3 (a)* zeigt, dass sich die Chromatogramme lediglich in den zwei zusätzlichen Peaks (5) und (6) unterscheiden. Die Retentions-Indices und der Transfer von Referenzsubstanzen bestätigten, dass es sich um (E)-2-Hexenol (5) und (E)-2-Hexenal (6) handelt. Während der Transfer von 2-Methylbuttersäure an der DB-5 Vorsäule (KI: 880) zum simultanen Transfer von (E)-2-Hexenol (KI: 875) führte, wurde der Transfer von 2-Methylbutanol an der DBWAX Kapillarsäule (KI: 1206) von dem Transfer von (E)-2-Hexenal (KI: 1211) begleitet.

Die Identität der enantiodifferenzierten Alkylverbindungen wurde durch MDGC-Analyse eines VHS-Extraktes, zu dem die (S)-konfigurierten Referenzsubstanzen hinzugegeben worden waren, bestätigt (*Abb. 4.5.3 b*).

Die in VHS-Extrakten aus dem Jahrgang 2001 ermittelten Enantiomerenzusammensetzungen sind in *Tabelle 4.5.1* zusammengestellt (Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen). Unter Anwendung des von *Hädrich und Vogelsang (1999 a,b)* beschriebenen Verfahrens wurden für den Schritt des MDGC-Transfers Bestimmungsgrenzen von 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  für 2-Methylbutanol und 4-Methylhexanol bzw. 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  für 2-Methylbuttersäure ermittelt. Die mittels VHS ermittelten Konzentrationen dieser Verbindungen [2-Methylbutanol: 328-367  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 2-Methylbuttersäure 43-250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 4-Methylhexanol 18-40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Kapitel 4.1.2)] lagen deutlich über diesen Werten, so dass quantitative Aussage über die Enantiomerenverteilungen in allen Chargen möglich waren. Für 4-Methylhexansäure wurden eine Nachweisgrenze von 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  und eine Bestimmungsgrenze von 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ermittelt. Da die Konzentrationen in den VHS-Extrakten aus 2001 (1-2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) unter der Nachweisgrenze lagen, waren eine Quantifizierung der Enantiomere und die Berechnung von Enantiomerenverhältnissen nicht möglich [*GDCh, 2001*].

*Tabelle 4.5.1* Enantiomerenzusammensetzungen (%) von 2-Methylbutanol (1), 4-Methylhexanol (2), 2-Methylbuttersäure (3) und 4-Methylhexansäure (4) in VHS-Extrakten von Rhabarberstielen <sup>a</sup>

	<i>Enantiomerenzusammensetzung (%)</i> <sup>b</sup>							
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
Charge A								
VHS1	79	21	92	8	64	36	nd	
VHS2	79	21	93	7	61	39	nd	
Charge B								
VHS1	81	19	92	8	61	39	nd	
VHS2	76	24	93	7	58	42	nd	
Charge C								
VHS1	79	21	88	12	69	31	nd	
VHS2	81	19	84	16	70	30	nd	
<i>Mittelwert</i>	<i>79</i>	<i>21</i>	<i>90</i>	<i>10</i>	<i>64</i>	<i>36</i>		

<sup>a</sup> Untersuchungsmaterial aus 2001. <sup>b</sup> Mittelwerte aus 3 Bestimmungen (Standardabweichung:  $\leq \pm 1$  für alle Komponente). <sup>nd</sup> nicht nachweisbar. VHS: Vakuum Headspace Technik.

Wie *Tabelle 4.5.1* zeigt, wurden für 2-Methylbutanol und 4-Methylhexanol in allen Extrakten hohe optische Reinheiten zugunsten der (R)-konfigurierten Enantiomere nachgewiesen. Die Enantiomerenverhältnissen variierten nur leicht zwischen unterschiedlichen Chargen. Für 2-Methylbuttersäure war der Überschuss an (R)-Enantiomer weniger deutlich ausgeprägt; eine relativ enge Spannbreite mit einem Mittelwert von 64 % (R)/ 36 % (S) war zu beobachten.

Um diese Ergebnisse für einen anderen Jahrgang zu bestätigen und insbesondere einen möglichen Einfluss des Isolierungsverfahrens auf die Enantiomerenverhältnisse zu überprüfen, wurden sowohl VHS- als auch LLE- und SDE-Extrakte von Rhabarberstielen aus drei weiteren Chargen des Jahres 2002 untersucht. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 4.5.2* zusammengestellt.

Tabelle 4.5.2 Enantiomerenzusammensetzungen (%) von 2-Methylbutanol (1), 4-Methylhexanol (2), 2-Methylbuttersäure (3) und 4-Methylhexansäure (4) in Rhabarber-Extrakten <sup>a</sup>

	Enantiomerenzusammensetzung (%) <sup>b</sup>							
	1		2		3		4	
	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
Charge D								
VHS1	92	8	85	15	62	38	*	
VHS2	92	8	94	6	66	34	R	> S <sup>c</sup>
SDE1	90	10	82	18	74	26	R	> S <sup>c</sup>
SDE2	90	10	>95		64	36	R	> S <sup>c</sup>
LLE1	92	8	>95		66	34	nd	
LLE2	93	7	>95		63	37	nd	
<i>Mittelwert</i>	92	8	-		66	34		
Charge E								
VHS1	79	21	71	29	66	34	*	
VHS2	81	19	75	25	56	44	*	
SDE1	76	24	73	27	68	32	R	> S <sup>c</sup>
SDE2	81	19	78	22	60	40	nd	
LLE1	83	17	81	19	66	34	R	> S <sup>c</sup>
LLE2	82	18	76	24	69	31	nd	
<i>Mittelwert</i>	80	20	76	24	64	36		
Charge F								
VHS1	85	15	85	15	67	33	R	> S <sup>c</sup>
VHS2	83	17	82	18	60	40	nd	
SDE1	87	13	87	13	76	24	R	> S <sup>c</sup>
SDE2	88	12	87	13	65	35	nd	
LLE1	87	13	88	12	69	31	nd	
LLE2	82	18	85	15	59	41	*	
<i>Mittelwert</i>	85	15	86	14	66	34		

<sup>a</sup> Untersuchungsmaterial aus 2002. <sup>b</sup> Mittelwert von 3 Bestimmungen (Standardabweichung:  $\leq \pm 1$  für alle Komponente). <sup>c</sup> sichtbarer Nachweis; keine quantitative Aussage über das Enantiomerenverhältnis möglich, weil die Konzentrationen der Enantiomere unter der Bestimmungsgrenze lagen. \* nachgewiesen, erlaubt keine quantitative Aussage über das Enantiomerenverhältnis, weil die Konzentrationen der Enantiomere unter der Bestimmungsgrenze lagen. <sup>nd</sup> nicht nachweisbar. VHS: Vakuum Headspace Technik. SDE: Simultane Destillation-Extraktion. LLE: Flüssig-Flüssig Extraktion.



Das Isolierungsverfahren hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Enantiomerenzusammensetzungen. Insbesondere bei der SDE, bei welcher der zentrifugierte Saft unter sauren Bedingungen (pH 3.5) für 2 Stunden erhitzt wurde, waren keine Anzeichen für eine Racemisierung erkennbar. Dies entspricht auch dem Befund, dass freie 2-Methylbuttersäure durch Wasserdampfdestillation racemisierungsfrei aus Äpfeln isoliert wurde [Rettinger et al, 1990]. Eine leichte Racemisierung war in Apfelmarmelade [Mosandl et al, 1990] und bei der unter drastischen Bedingungen (über 110°C) durchgeführten fraktionierten Destillation von (S)-2-Methylbuttersäure beobachtet worden [Gatfield et al, 2000].

Die Enantiomerenverhältnisse zeigten Unterschiede zwischen den Chargen. 2-Methylbutanol und 4-Methylhexanol wurden jedoch immer mit hohen Reinheiten der (R)-Enantiomere nachgewiesen. Für 2-Methylbuttersäure war der Überschuss an (R)-Enantiomer in Analogie zu den Daten aus 2001 deutlich kleiner als bei den Alkoholen. Die Enantiomerenzusammensetzungen bewegten sich in einem Schwankungsbereich von 61-71 % zugunsten des (R)-Enantiomers.

Die Konzentrationen von 2-Methylbutanol (68-358 µg/kg), 2-Methylbuttersäure (84-239 µg/kg) und 4-Methylhexanol (11-37 µg/kg) erlaubten eine Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse. Für 4-Methylhexansäure lag die identifizierte Menge (2-5 µg/kg) unterhalb der Bestimmungsgrenze des MDGC-Transfersschritts, so dass auf die Angabe eines Enantiomerenverhältnisses verzichtet wurde. Bei einigen Proben war visuell ein Überschuss des (R)-Enantiomers zu erkennen (Abb. 4.5.4); dies wurde durch die Angabe "R>S" zum Ausdruck gebracht.

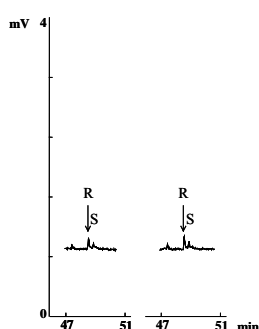


Abbildung 4.5.4. Enantioselektive MDGC-Analyse von 4-Methylhexansäure aus Rhabarber-Extrakten (Charge F) an Perethyl-β-CD. (Bedingungen: wie bei Abbildung 4.5.1)

#### 4.5.4 Biogenetische Aspekte

Die Rolle von Aminosäuren als Prekursoren flüchtiger Säuren, Alkohole und Ester ist in Experimenten mit isotope markierten Vorstufen in einer Vielzahl von Früchten gezeigt worden [Yabumoto et al, 1977; Kandra und Wagner, 1990; Rowan et al, 1996; Kandra und Wagner, 1998; Pérez et al, 2002]. Ausgehend von L-Isoleucin (2S,3S) läßt sich das fast ausschließliche Vorliegen (S)-konfigurierter 2-methylverzweigter Verbindungen plausibel erklären. Die im Rahmen dieser Arbeit in Rhabarber aufgezeigten Überschüsse an (R)-Enantiomeren stehen im Widerspruch zu diesem Biogeneseweg. Als Erklärung kommen eine andere Vorstufe oder ein anderer Stoffwechselweg in Betracht.

In Säugetieren ist die Rolle von L-Alloisoleucin (2S,3R) als Vorstufe (R)-konfigurierter 2-methylverzweigter Metabolite bekannt; die sogenannten (S)- und (R)-Wege (Abb. 4.5.5) wurden kürzlich zusammenfassend dargestellt [Mamer, 2001].

Die in den 50er Jahren postulierte nicht-enzymatische Keto-Enol Tautomerie auf der Stufe der 2-Oxo-3-methylpentansäure wurde lange als Erklärung für die Bildung von (R)-2-Methylbuttersäure herangezogen [Meister, 1951; Mamer und Tjoa, 1975; Mamer et al, 1976; Mosandl et al, 1990]. Mamer und Reimer (1992) erachteten die Bildung von Alloisoleucin jedoch als unvermeidliche Folge der Transaminierung von Isoleucin und schlugen als Mechanismus eine Ketimin-Enamin Tautomerie vor. Mamer und Lépine (1996) konnten mit markiertem  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -Isoleucin bei Ratten bestätigen, dass L-Alloisoleucin aus L-Isoleucin nicht durch Enolisierung auf der Stufe der  $\alpha$ -Ketosäure, sondern auf der Stufe der entsprechenden Ketimine gebildet wird (Abb. 4.5.6).

Im Gegensatz zu Isoleucin [Souci et al, 2000; Herrmann 1993; Hall et al, 1980] gibt es zum Vorkommen von Alloisoleucin als natürlichem Bestandteil von Pflanzen und Tieren wenige Daten in der Literatur. Alloisoleucin wurde u.a in vergorenen Produkten, wie Milch und Möhrensaft [Brückner und Hausch, 1989] sowie in der Haut der Gelbbauchunke (*Bombina variegata*) [Mignogna et al, 1993] nachgewiesen. Darüberhinaus fand man das (R)-Enantiomer in Antibiotika [Epperson und Ming, 2000; Sitachitta et al, 2000] sowie in Erdproben [Pollock et al, 1977].

Als weitere Erklärungsmöglichkeit für die Bildung (R)-konfigurierter Verbindungen wäre auch eine enzymatische Bildung aus entsprechenden ungesättigten Verbindungen möglich. Im Apfelgewebe ist z. B. die Bildung von (R)-Ethyl 2-methylbutanoat aus Ethyltiglat beschrieben worden (Abb. 4.5.7).

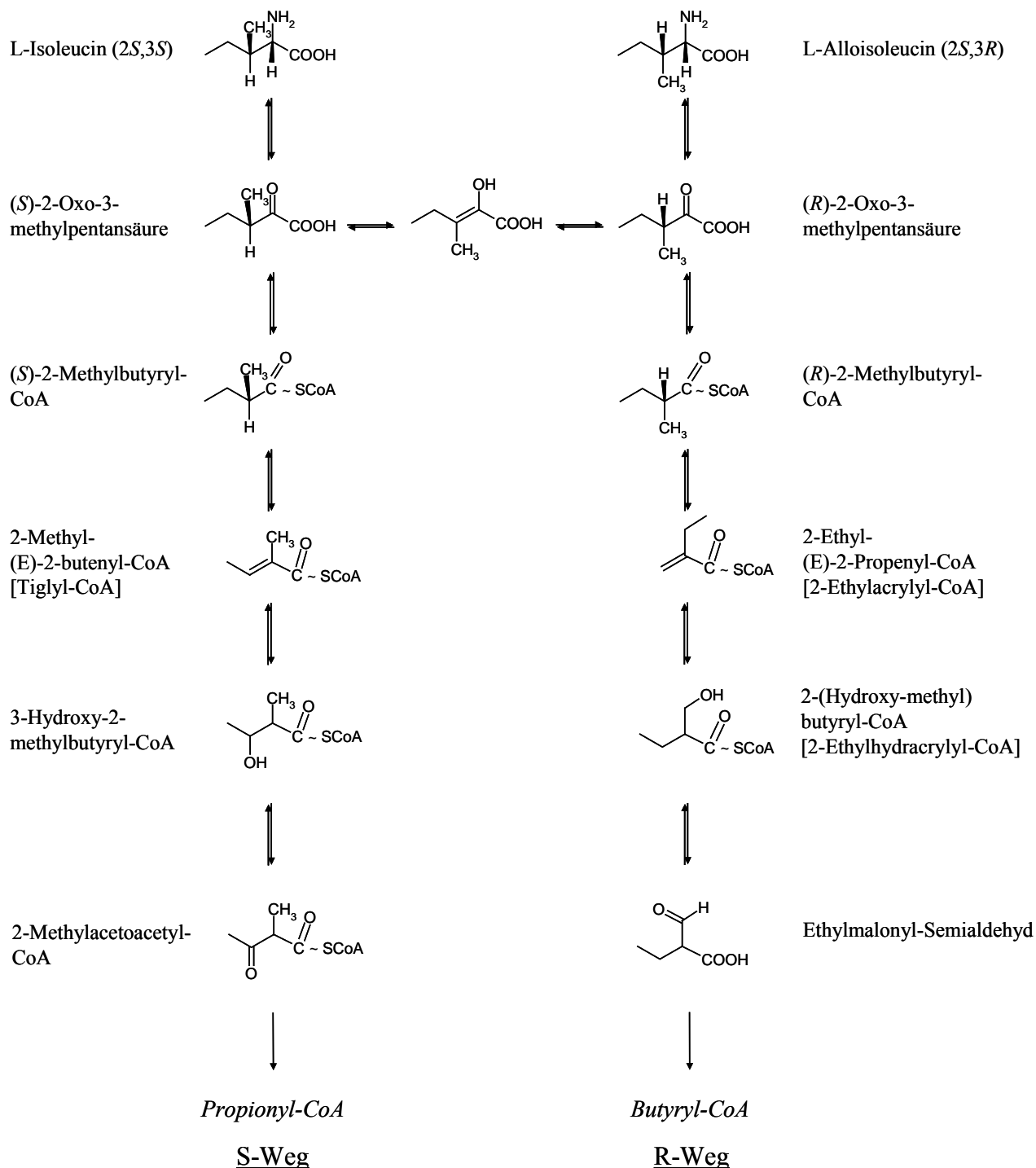


Abbildung 4.5.5 Oxidativer Abbau von Isoleucin [Mamer et al, 1976]

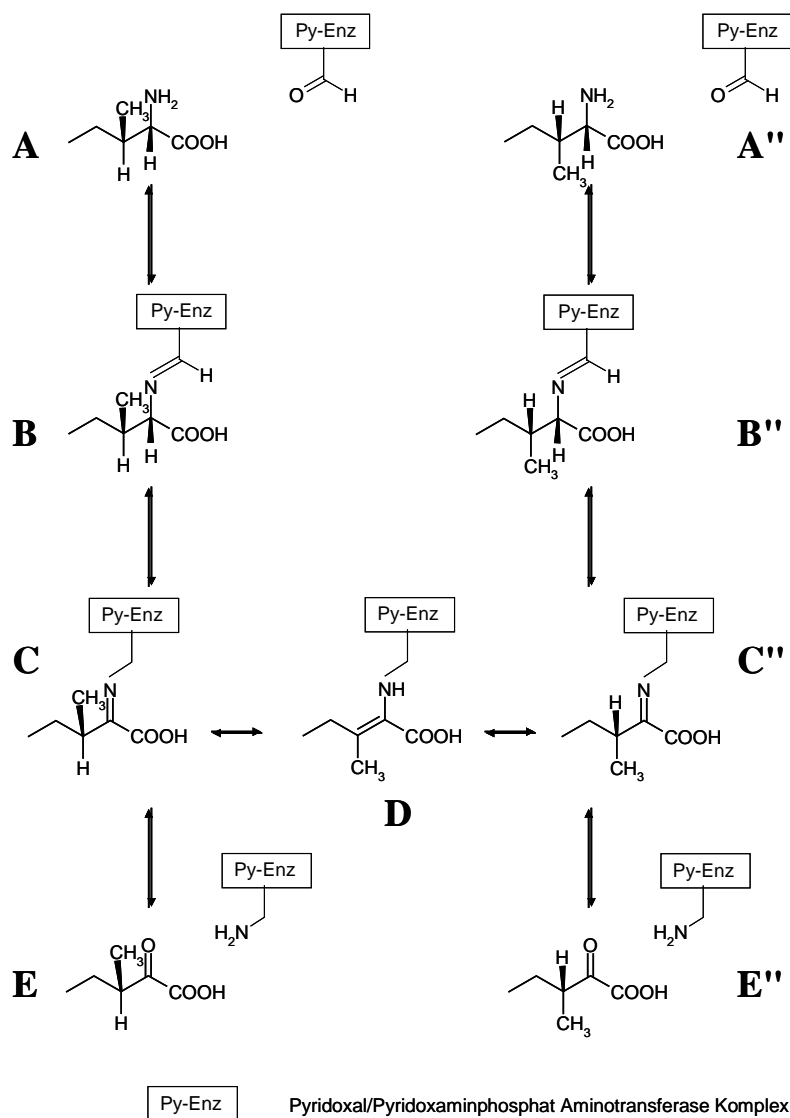


Abbildung 4.5.6 Vorgeslagener Mechanismus für die Konversion von Isoleucin zu Alloisoleucin [Mamer und Lepine, 1996]

Der Pyridoxalphosphat-Aminotransferase Enzym-Komplex (Py-Enz) reagiert mit der  $\text{H}_2\text{N}$ -Gruppe der Aminosäure (A, L-Isoleucin; A'', L-Alloisoleucin) zu einem Aldimin (B und B''), d.h. einer Schiff-Base. Eine enzym-induzierte Isomerisation der Schiffbase führt zur Bildung eines Ketimins (C und C''). Das Ketimin kann leicht in Enolamin (D) umgeformt werden, das entweder L-Alloisoleucin (durch B'') oder (R)-2-Oxo-3-methylpentansäure (E'') ergibt. Die Hydrolyse des Ketimins ergibt (S)-2-Oxo-3-methylpentansäure (E) und (R)-2-Oxo-3-methylpentansäure (E').

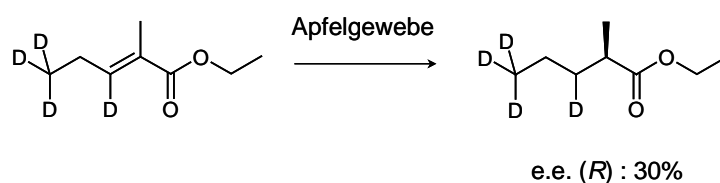


Abbildung 4.5.7 Ethyltiglat als Quelle für die Bildung von (R)-Ethyl-2-Methylbutanoat [Hauck et al, 2000]

Die hohen Anteile an (R)-Enantiomeren der untersuchten methylverzweigten Verbindungen im Rhabarberstiel lassen vermuten, dass dieses Phänomen nicht nur ausschließlich auf die Racemisierungsschritte von L-Isoleucin, sondern auf andere Vorläufer oder Biogenesewege zurückzuführen ist. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sind jedoch weitere Untersuchungen mit isotopenmarkierten Vorstufen notwendig.

#### 4.5.5 Sensorische Aspekte

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Enantiomere methylverzweigter Aromastoffe in ihren sensorischen Eigenschaften unterscheiden [Boelens et al, 1993]. (S)-2-Methylbuttersäure riecht angenehm süß und fruchtig, während (R)-2-Methylbuttersäure einen unangenehmen, käseartigen Charakter aufweist. (S)-2-Methylbutanol wurde als frisch, etherisch charakterisiert, der Geruch des entgegengesetzten Enantiomers wurde dagegen als vergoren, fettig beschrieben [Mosandl, 1992; Boelens et al, 1993; Koppenhoefer et al, 1994].

Beide Enantiomere von 4-Methylhexansäure wurden als fettig und sauer (erinnernd an Hexansäure) charakterisiert. Der Geruchseindruck der (R)-4-Methylhexansäure war jedoch stärker [Ohloff, 1972]. Die sensorische Bewertung von 4-Methylhexansäure mittels GC-O (Geruchsbeschreibung an Perethyl- $\beta$ -CD mit 200 ng/pro Enantiomer am Sniffing-port) bestätigte, dass die (R)-Form einen intensiveren Geruch aufwies als das (S)-Enantiomer. Zusätzlich zu der sauren, stechenden Note wies (S)-4-Methylhexansäure eine leicht grüne und buttersäureartige Note auf, während das (R)-4-Enantiomer einen käseartigen und essigsäureartigen Charakter zeigte.

Über die Geruchsqualitäten der Enantiomere von 4-Methylhexanol waren aus der Literatur keine Daten bekannt. Bei der GC-O Analyse (Geruchsbeschreibung an Perethyl- $\beta$ -CD mit 200 ng am Sniffing-port) zeigte (S)-4-Methylhexanol eine würzige, nussartige sowie leicht

grün-saure Note. (R)-4-Methylhexanol besaß hingegen einen stärker ausgeprägten grünen, öligen, nuss- und möhrenartigen Charakter.

2-Methylbutanol, 2-Methylbuttersäure und 4-Methylhexanol wurden als aromaaktive Komponenten ungekochter Rhabarberstiele bei der GC-O Analyse wahrgenommen (Kapitel 4.1.4). Die im Zuge der Aromaextraktverdünnungsanalyse detektierten Geruchsqualitäten (Tab. 4.1.2) stehen im Einklang mit den ermittelten Überschüssen an (R)-Enantiomeren. Für die 2-methylverzweigten Verbindungen wurden unangenehme Noten, wie bitter, muffig (2-Methylbutanol) und stechend, käseartig (2-Methylbuttersäure) festgestellt, die frisch-fruchtigen Noten wurden jedoch nicht wahrgenommen. Trotz der geringeren Unterschiede zwischen den Enantiomeren von 4-Methylhexanol deutet der beim GC-Sniffing detektierte grüne, ölige, nuss- und möhrenartige Charakter ebenfalls auf das (R)-Enantiomer hin.

#### 4.5.6 Zusammenfassung

Die in Rhabarberstielen vorliegenden Enantiomerenverteilungen von 2-Methylbutanol, 2-Methylbuttersäure, 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure wurden mit Hilfe Multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) untersucht. Unter Verwendung von Heptakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)- $\beta$ -Cyclodextrin als chirale Phase konnten die Enantiomere von 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure erstmals kapillargaschromatographisch getrennt werden. Nach der Ermittlung der Elutionsreihenfolgen an der chiralen Phase wurden die in VHS-Extrakten vorliegenden Enantiomerenverteilungen mittels MDGC unter Einsatz achiraler Vorsäulen unterschiedlicher Polarität bestimmt. Die methylverzweigten Verbindungen lagen mit deutlichen Überschüssen an (R)-Enantiomeren vor. Für 2-Methylbutanol und 4-Methylhexanol wurden hohe optische Reinheiten zugunsten der (R)-konfigurierten Enantiomere (>70%) nachgewiesen, die nur leicht zwischen unterschiedlichen Chargen variierten. Für 2-Methylbuttersäure war der Überschuss an (R)-Enantiomer weniger ausgeprägt [66% (R)/ 34% (S)], wobei nur eine relativ enge Spannbreite zu beobachten war.

Die Anwendung unterschiedlicher Isolierungstechniken hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Enantiomerenzusammensetzungen der Komponenten; insbesondere in den mittels SDE gewonnenen Extrakten waren keine Anzeichen für eine Racemisierung erkennbar.

Die sensorische Bewertung von 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure mit Hilfe von GC/Olfaktometrie unter Verwendung von Perethyl- $\beta$ -Cyclodextrin als chiraler stationärer Phase zeigte, dass die Enantiomere unterschiedliche Geruchsqualitäten aufweisen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Flüchtige Inhaltsstoffe von Rhabarber (*Rheum rhabarbarum* L.) wurden durch Vakuum Headspace Technik (VHS) isoliert und mittels kapillargaschromatographisch/massenspektrometrischer Methoden untersucht. Die VHS-Extrakte besaßen einen grünen, an geschälte Rhabarberstiele erinnernden Geruch. In dem Spektrum flüchtiger Verbindungen überwogen die C<sub>6</sub>-Komponenten mit einem Anteil >65 %. Neben ungesättigten Aldehyden ((Z)-3-Hexenal, (E)-2-Hexenal) sowie den entsprechenden Alkoholen ((E)-2-Hexenol, (Z)-3-Hexenol) wurden auch die in pflanzlichen Systemen seltener vorkommenden C<sub>6</sub>-Säuren ((E)-2-Hexensäure, (E)-3-Hexensäure) nachgewiesen. Geruchsaktive Komponenten wurden mit Hilfe von Kapillargaschromatographie/Olfaktometrie (GC/O) und unter Einsatz der Aromaextraktverdünnungsanalyse ermittelt. Die Bestimmung von Aromawerten zeigte, dass die C<sub>6</sub>-Verbindungen eine wichtige Rolle für das Aroma ungekochter Rhabarberstiele spielen.

Untersuchungen zum Einfluss enzymkatalysierter Reaktionen zeigten, dass das nach Zerkleinerung des Gewebes freigesetzte Spektrum an C<sub>6</sub>-Verbindungen durch komplexe Folgeraktionen rasch verändert wird. Isomerisierungen und Reduktionen führen zu quantitativen Verschiebungen, woraus unterschiedliche sensorische Beiträge der C<sub>6</sub>-Komponenten zum Aroma frisch geschälter bzw. durch nachfolgende Reaktionen "gealterter" Rhabarberstiele resultieren.

Eine weitere wichtige Gruppe flüchtiger Verbindungen von Rhabarberstielen stellten methylverzweigte Verbindungen dar. Neben den 2-methylverzweigten Vertretern (2-Methylbutanol und 2-Methylbuttersäure) wurden auch die ungewöhnlicheren 4-methylverzweigten Komponenten (4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure) nachgewiesen. Die Enantiomerenzusammensetzungen dieser chiralen Verbindungen wurden mittels Multidimensionaler Gaschromatographie unter Verwendung von Heptakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)- $\beta$ -Cyclodextrin als chirale stationäre Phase bestimmt. Die methylverzweigten Verbindungen lagen mit deutlichen Überschüssen an (R)-Enantiomeren vor. Unterschiedliche Isolierungstechniken hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Enantiomerenzusammensetzungen der Komponenten. Die sensorische Bewertung von 4-Methylhexanol und 4-Methylhexansäure mittels GC/O zeigte, dass die Enantiomere unterschiedliche Geruchsqualitäten aufweisen.



Als zusätzliche Methoden zur Isolierung flüchtiger Inhaltsstoffe aus Rhabarbersaft wurden die Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) und die Simultane Destillation-Extraktion (SDE) eingesetzt. Die LLE-Extrakte wiesen einen zwar auch grünen jedoch stechenderen Charakter auf als die VHS-Extrakte; nach Anwendung der SDE war darüber hinaus eine Kochnote erkennbar. Die Anteile der Hauptstoffgruppen ( $C_6$ -Komponenten, Methylverzweigte Alkohole und Säuren) stimmten mit den in den VHS-Extrakten beobachteten Verteilungen überein. In den LLE-Extrakten waren jedoch deutlich höhere Mengen an Essigsäure und (E)-2-Hexensäure enthalten. Nach Einsatz der SDE wurden typische Indikatorsubstanzen für thermische Belastung (Furfural, Pyrrol, Linalooloxid) detektiert. Die Bedingungen der LLE und SDE führten zu unterschiedlichen Bevorzungen enzymatisch/chemisch-katalysierter Isomerisierungen und Reduktionen, so dass die Spektren an  $C_6$ -Komponenten sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Methode unterschieden. Nach Kochen eines Rhabarber/Wasser-Homogenats (15 Min.) unter Rückfluss wurde mittels LLE eine neue Verbindung nachgewiesen, deren Struktur auf Grundlage der massenspektrometrischen Daten als 5-Hydroxyfurfural postuliert wurde.

Frischer Rhabarber und industriell hergestellte Rhabarber-Konzentrate unterschieden sich signifikant in den Spektren flüchtiger Verbindungen. Die in frisch geschnittenen Rhabarberstielen vorherrschenden  $C_6$ -Verbindungen spielten in den Konzentraten, die einen sauren sowie gekochten, karamelartigen und an Pflaumenmus erinnernden Geruch zeigten, nur eine untergeordnete Rolle. Aus der Klasse der methylverzweigten Komponenten wurden 2-Methylbutanol, 2-Methylpropanol und ihre entsprechenden Säuren sowie 4-Methylhexanol identifiziert. Neben Essigsäure wurden typische Beispiele für Verbindungen gefunden, die durch thermische Belastung des pflanzlichen Ausgangsmaterials im Zuge der Konzentrierung gebildet wurden. Neben den dominierenden Furanen (5-Hydroxymethylfurfural und Furfural) wurden andere heterocyclische Verbindungen, wie  $\gamma$ -Pyrone (Maltol, 5-Hydroxymaltol und 5-Hydroxy-(5,6)-dihydromaltol) und 2-Formylpyrrol als typische Maillard-Produkte nachgewiesen.

In kommerziellen, auf der Basis naturidentischer Aromastoffe aufgebauten Aromen mit der Geruchsnote "Rhabarber" stellten 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol, die in Rhabarber nicht nachgewiesen wurden, die Hauptkomponenten dar.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, I.; Seki, T.; Noguchi, H.; Kashiwada, Y. Galloyl esters from rhubrs are potent inhibitors of squalene epoxidase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis. *Planta Med.* **2000**, *66*, 753-756.
- Aburjai, T. A. Anti-platelet stilbenes from aerial parts of *Rheum palaestinum*. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 407-410.
- Acree, T.E.; Barnard, J.; Cunningham, D.G. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* **1984**, *14*, 273-286.
- Aeppli, B. *Das Rhabarber-Kochbuch*. Midena, Augsburg, 1996.
- Agarwal, S.K.; Singh, S.S.; Lakshmi, V.; Verma, S.; Kumar, S. Chemistry and pharmacology of rhubarb (*Rheum species*) – a review. *J. Scientific Ind. Res.* **2001**, *60*, 1-9.
- Akalin, A.S.; Gönc, S. Lactulose and 5-HMF contents in market milks. *Milchwissenschaft.* **1997**, *52*, 377-380.
- Andersen, R.A.; Hamilton-Kemp, T.R.; Hildebrand, D.F.; McCracken Jr., C.T.; Collins, R.W.; Fleming, P.D. Structure-antifungal activity relationship among volatile C<sub>6</sub> and C<sub>9</sub> aliphatic aldehydes, ketones, and alcohols. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1563-1568.
- Anonym. Rhabarber verführen. *Gemüse* **1996**, *33*, 650.
- Anonym Rhabarber – Muntermacher gegen Fröhjähmüdigkeit. *Die Industrielle Obst- und Gemüseverwertung* **1996**, *81*, 178-179.
- Askar, A.; Morad, M.M. Lebensmittelvergiftung. 1. Toxine in natürlichen Lebensmitteln. *Alimenta* 1980, *19*, 59-66.
- Askari, C.; Hener, U.; Schmarr, H.-G.; Rapp, A.; Mosandl, A. Stereodifferentiation of some chiral monoterpenes using multidimensional gas chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, *340*, 768-772.
- Bachmann, S.; Meier, M.; Känzig, A. 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **1997**, *51*, 49-50.
- Barron, D.; Etiévant, P.X. The volatile constituents of strawberry jam. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, *191*, 279-285.
- Bartley, J.P.; Schwede, A.M. Production of volatile compounds in ripening kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1023-1025.
- Behr, H.C. Die kleine Marktstudie - Rhabarber. *Gemüse* **1991**, *27*, 338-340.
- Bernreuther, A. Epperlein, U.; Koppenhofer, B. Enantiomers: Why they are important and how to resolve them. In *Techniques for Analyzing Food Aroma*. Marsili, R. Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, pp. 143-208.
- Bicchi, C.; D'Amato, A.; Rubiolo, P. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. *J. Chromatogr.* **1999**, *843*, 99-121.
- Blanch, G.P.; Reglero, G.; Herraiz, M.; Tabera, J. A comparison of different extraction methods for the volatile components of grape juice. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 11-15.
- Blank, I.; Milo, C.; Jianming, L.; Fay, L.B. Quantification of aroma-impact components by Isotope Dilution Assay – recent developments. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Teranishi, R.; Wick, E. L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999, pp. 63-74.
- Blau, K.; Halket, J.M. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. Wiley, Chichester, 1993.

- Blundstone, H.A.; Dickinson, D. The chemistry of edible rhubarb. *J. Sci. Fd. Agric.* **1964**, *15*, 94-101.
- Boccorh, Ra. K.; Paterson, A.; Piggott, J.R. Sources of variations in aroma-active volatiles, or flavor components, of blackcurrant concentrates. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1999**, *208*, 362-368
- Bown, D. *The Royal Horticultural Society New Encyclopedia of Herbs and Their Uses*. DK Publ., London, 2002; pp. 343-344.
- Boelens, M.H.; Boelens, H.; von Gemert, L. J. Sensory properties of optical isomers. *Perf. Flav.* **1993**, *18*, 2-16.
- Böttcher, H. *Frischhaltung und Lagerung von Gemüse*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1996; pp. 216-217.
- Buchgraber, M.; Ulberth, F. Precision and accuracy of the Likens-Nickerson method for the quantification of cheese flavour components. *Milchwissenschaft* **1999**, *54*, 677-680.
- Bracho, J.C.; Rosado, A.; Pino, J.A. Comparison of isolation methods for propolis volatiles. *J. Essent. Oil. Res.* **1996**, *8*, 665-668.
- Brenna, W.E.; Fuganti, C.; Serra, S. Enantioselective perception of chiral odorants. *Tetrahedron- Assymetr.* **2003**, *14*, 1-42.
- Brennand, C.P.; Lindsay, R.C. Distribution of volatile branched chain fatty acids in various lamb tissues. *Meat Sci.* **1992**, *31*, 411-421.
- Brückner, H.; Hausch, M. Detection of free D-amino acids in food by chiral phase capillary gas chromatography. *J. High Res. Chrom.* **1989**, *12*, 680-684.
- Büttner, A.; Schieberle, P. Exhaled Odorant Measurement (EXOM) – A new approach to quantify the degree of in-mouth release of food aroma compounds. *Lebensm. –Wiss. u. –Technol.* **2000**, *33*, 553-559.
- Büttner, A.; Beer, A.; Hannig, C.; Settles, M. Observation of the swallowing process by application of videofluoroscopy and real-time Magnetic Resonance Imaging – consequences for retronasal aroma stimulation. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 1211-1219.
- Büttner, 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.* **2001**, *49*, 1358-1363.
- Büttner, A. Die Wahrnehmung von Lebensmittelaromen beim Verzehr – ein Wechselspiel physiologischer Phänomene. Vortrag, 32. Detscher Lebensmittelchemikertag, 2003.
- Büttner, A.; Beer, A.; Hannig, C.; Settles, M.; Schieberle, P. Physiological and analytical studies on flavor perception dynamics and induced by eating and swallowing process. *Food Qual. Pref.* **2002**, *13*, 497-504.
- Burdock, G.A. *Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients*. 3<sup>rd</sup> Edition, CRC Press, Boca Raton, 1995; pp. 241-242, 833-843, 860-861.
- Burrows, G. Rhubarb. In *Fruit Processing. Nutrition, Products, and Quality Management*; Arthey, D.; Ashurst, P. R. Eds.; Aspen Publ., Gaithersburg, 2001; pp. 169.
- Buttery, R. G.; Ling, L.C.; Juliano, B.O.; Turnbaugh, J.G. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 823-826.
- Buttery, R.G.; Teranishi, R.; Ling, L.C. Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 540-544.
- Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G.; Ling, L. C. Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 1006-1009.
- 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.
- Buttery, R.G.; Takeoka, G.; Teranishi, R.; Ling, L.C. Tomato aroma components: identification of glycoside hydrolysis volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2050-3.

- Buttery, R.G. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*. Acree, T. E., Teranishi, R. Eds.; American Chemical Society Washington, DC, 1993; pp. 259-86.
- Buttery, R.G.; Ling, L.C. Volatile compounds of tomato fruits and plant parts. In *Bioactive Volatile Compounds from Plants*. Teranishi, R.; Buttery, R.G.; Sugisawa, H. Eds.; ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC., 1993; pp. 23-34.
- Buttery, R.G.; Stern, D.J.; Ling, L.C. Studies on flavor volatiles of some sweet corn products. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 791-795.
- Buttery, R.G.; Ling, L. C. Methods for isolating food and plant volatiles. In *Biotechnology for improved food and flavors*. Takeoka, G. R.; Teranishi, R.; Kobayashi, A.; Williams, P.J. Eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC., 1996; pp. 240-248.
- Buttery, R.G.; Ling, L.C.; Stern, D.J. Studies on popcorn aroma and flavor volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 837-843.
- Buttery, R.G.; Orts, W.J.; Takeoka, G.R.; Nam, Y. Volatile flavor components of rice cakes. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4353-4356.
- Buttery, R.G. Flavor chemistry and odor thresholds. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Teranishi, R.; Wick, E.L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 353-366.
- Cai, J.; Oraikul, B.; Jelen, P. Calcium bioavailability of quark with increased calcium content produced by addition of rhubarb. *J. Food Process. Pres.* **2000**, *24*, 479-494.
- Careri, M.; Manini, P.; Spagnoli, S.; Barbieri, G.; Bolzoni, L. Simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace methods in the gas chromatographic analysis of parmesan cheese volatiles. *Chromatographia*. **1994**, *38*, 386-394.
- Careri, M.; Mangia, A. GC-MS analysis of flavors and fragrances. *Chrom. Sci. Series* **2001**, *86*, 409-440.
- Chaintreau, A. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity – review. *Flav. Fragr. J.* **2001**, *16*, 136-148.
- Chase, T. Flavor Enzymes. In *Food Related Enzymes*. Whitaker, J. R. Ed., American Chemical Society, Washington, DC.1974; pp. 241-266..
- Chen, S.-H.; Huang, T.-C.; Ho, C.-T.; Tsai, P.-J. Extraction, analysis, and study on the volatiles in Roselle tea. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1101-1105.
- Chevallier, A. *Die BLV-Enzyklopedie der Heilpflanzen*. BLV Verlag, München, 1998; pp. 124.
- Chuman, T.; Noguchi, M. Acidic aroma constituents of turkish tobacco. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1021-1030.
- Chung, H.Y.; Yung, I.K.S.; Kim, J.-S. Comparison of volatile components in dried scallops (*Chlamys farreri* and *Patinopecten yessoensis*) prepared by boiling and steaming methods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 192-202.
- Cremer, D.R.; Eichner, K. Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2454-2460.
- Cronin, D.A.; Stanton, P. 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazine – an important contributor to carrot aroma. *J. Sci. Fd. Agric.* **1976**, *27*, 145-151.
- Crosby, J. Chirality in industry - an overview. In *Chirality in Industry. The Commercial Manufacture and Application of Optically Active Compounds*. Collins, A.N.; Sheldrake, G.N.; Crosby, J. Eds., Wiley, Chister. 1992, pp. 2-66.
- Cutzach, I.; Chatonnet, P.; Henry, R.; Dubourdiou, D. Identification of volatile compounds with a “toasty” aroma on heated oak used in barrelmaking. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2217-2224.

- Dai, R.; Fu, R.; Feng, Z.; Zhou, W. Pyrolysis-gas chromatography investigation of peralkylated  $\beta$ -cyclodextrins used as a capillary GC stationary phase. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1995**, *34*, 181-9.
- Dai, R.; Fu, R.; Zhou, W. Application of peralkylated  $\beta$ -CDs capillary columns for the GC separation of positional isomers of industrial chemicals. *J. Microcol. Sep.* **1995**, *7*, 455-460.
- De la Calle Garcia, D.; Reichenbaecher, M.; Danzer, K. Classification of wines by means of multivariate data analysis using the SPME/CGC-chromatograms of volatile aroma compounds. *Vitis* **1998**, *37*, 181-188.
- Demole, E.; Enggist, P.; Ohloff, G. 1-p-menthen-8-thiol: a powerful flavor impact constituents of grapefruit juice (*Citrus paradisi* MACFAYDEN). *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 1785-1794.
- Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.R.; Nielsen, M.T.; Andersen, R.A.; Collins, G.B.; Hildebrand, D.F. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 506-510.
- Derndorfer, E.; Elmadfa, I. Influence of oxalic acid on sensory attributes of rhubarb. *Nutrition* **2000**, *24*, 61-64.
- Di Bella, G.; Saitta, M.; Pellegrino, M.; Salvo, F.; Dugo, G. Contamination of Italian citrus essential oils: presence of phthalate esters. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1009-1012.
- Di Bella, G.; Saitta, M.; Lo Curto, S.; Salvo, F.; Licandro, G.; Dugo, G. Production process contamination of citrus essential oils by plastic materials. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3705-3708.
- Diener, U. Rhabarber – professionell. *Gemüse* **1997**, *33*, 452-454.
- Drawert, F.; Tressl, R.; Heimann, W.; Emberger, R.; Speck, M. Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. Enzymatisch-oxidative Bildung von C<sub>6</sub>-Aldehyden und Alkoholen und deren Vorstufen bei Äpfeln und Trauben. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1973**, *2*, 10-22.
- Drawert, F. Biochemical formation of aroma components. In *Aroma Research*. Maarse, H. Ed., Zeist, 1975; pp. 13-41.
- Dugo, G.; Mondello, L.; Cotroneo, A.; Bonaccorsi, I.; Lamonica, G. Enantiomeric distribution of volatile components of citrus oils by MDGC. *Perf. Flav.* **2001**, *26*, 20-35.
- EG-Aromen-Richtlinie. Verband der deutschen Essenzen-Industrie E.V., Bonn. 1988.
- Eichner, K.; Lange-Aperdanner, M.; Vossman, U. Analysis of volatile Maillard reaction products by different methods. In *Flavor Analysis, Developments in Isolation and Characterization*. Mussinan, C.J., Morello, M.J. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 1998; pp 124-140.
- Elmore, J.S.; Erhabadir, M.A.; Mottram, D.S. Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2638-2641.
- Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE) – a new and versatile technique for the careful and direkt isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237-241.
- Epperson J.D; Ming L.J. Proton NMR studies of Co(II) complexes of the peptide antibiotic bacitracin and analogues: insight into structure-activity relationship. *Biochem.* **2000**, *39*, 4037-4045.
- Faix, O.; Fortmann, L.; Bremer, J.; Meier, D. Thermal degradation products of wood. A collection of electron-impact (EI) mass spectra of polysaccharide-derived products. *Holz als Roh- und Werkstoff* **1991**, *49*, 299-304.

- Faix, O.; Fortmann, I.; Bremer, J.; Meier, D. Thermal degradation products of wood: gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization of polysaccharide derived products. *Holz als Roh- und Werkstoff* **1991**, *49*, 213-19.
- Fickert, B.; Scheiberle, P. Identification of the key odorants in barley malt (caramalt) using GC/MS techniques and odour dilution analyses. *Nahrung* **1998**, *42*, 371-375.
- Fieser, L. F.; Fieser, M. In *Organische Chemie*. Chemie Verlag, Weinheim, 1976; pp 1660.
- Fischer, U.; Grosch, W. Bildung von Aromastoffen bei der Autoxidation von Hexanal und 2(E)-Hexenal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 495-499.
- Fischer, U.; Grosch, W. Breakdown of the flavour compound 2(E)-hexenal in different solvents. *Food Chem.* **1991**, *39*, 59-72.
- Fleischer, Z.; Fleischer, A. The essential oils of etrog (*Citrus medica* L. Var. *Ethrog* Engl.). Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai, Part VI. *J. Ess. Oil Res.* **1991**, *3*, 377-379.
- Fors, S. Sensory properties of volatile Maillard reaction products and related compounds: a literature review. In *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. Waller, G.R.; Feather, M.S. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 1983; pp.185-286.
- Forss, D.A.; Dunstone, E.A.; Ramshaw, E.H.; Stark, W. Flavor of cucumbers. *J. Food Sci.* **1962**, *27*, 90-93.
- Foust, C.M.; Marshall, D.E. Culinary rhubarb production in North America: history and recent statistic. *HortScience* **1991**, *26*, 1360-1363.
- Frattini, C.; Bicchi, C.; Nano, G.M. Volatile aroma constituents of rhubarb. Part 1. *Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante Off., Aromi, Saponi, Cosmet., Aerosol.* **1974**, *56*, 597-606.
- Frattini, C.; Bicchi, C.; Barettoni, C.; Nano, G.M. Volatile aroma constituents of rhubarb. Part 2. *Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante Off., Aromi, Saponi, Cosmet., Aerosol.* **1976**, *58*, 132-135.
- Fülgraff, G. (Herausgeber) *Lebensmittel-Toxikologie*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1989; pp. 207-208.
- Galindo-Cuspinera, V.; Lubran, M.B.; Rankin, S.A. Comparison of volatile compounds in water- and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2010-2015.
- Gardner, H.W.; Dornbos Jr., D.L.; Desjardins, A.E. Hexanal, *trans*-2-nonenal inhibit soybean, *Glycine max*, seed germination. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1316-1320.
- Gatfield, I. L.; Hilmer, J.-M.; Werkhoff, P.; Bertram, H.-J. Mechanistic aspect of the formation of natural 2-methylbutanoic acid via fermentative oxidation of the corresponding alcohol. *Adv. Food Sci.* **2000**, *22*, 100-106.
- Gattermann-Wieland*. Die Praxis des organischen Chemikers. Teil 1. Allgemeine Arbeitsanweisungen. Wieland, T.; Mayer, C. Eds.; 42. Aufl.; Walter de Gruyter Verlag, Berlin, Germany, 1972; pp 71-73.
- GDCh, Lebensmittelchemische Gesellschaft. Enantioselektive Analyse zur Natürlichkeitsbewertung von Aromastoffen. *Lebensmittelchemie* **2001**, *55*, 24-26.
- Guadayol, J.M.; Caixach, J.; Ribe, J.; Cabanas, J.; Rivera, J. Extraction, separation and identification of volatile organic compounds from paprika oleoresin (Spanish type). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1868-1872.
- Gessner, M.; Deger, W.; Mosandl, A. Stereoisomere Aromastoffe. XXXI. Chirale Aromastoffe einiger Lebensmittel. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 417-421.
- Girard, B.; Kopp, G. Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 471-476.
- Glohuber, C. (Herausgeber) *Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994; pp. 239-240.

- Goel, V.; Oraikul, B.; Basu, T.K. Cholesterol lowering effects of rhubarb stalk fiber in hypercholesterolemic men. *J. Am. Coll. Nutr.* **1997**, *16*, 600-604.
- Gomis, D.B.; Alvarez, G.M.D.; Naredo, L.S.; Alonso, J.J.M. High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates. *Chromatographia*. **1991**, *32*, 45-48.
- Gottwald, W. *GC für Anwender*. VCH Verlag, Weinheim, 1995.
- Grein, B.; Huffer, M.; Scheller, G.; Schreier, P. 4-Hydroxy-2-alkenals and other products formed by water mediated oxidative decomposition of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2385-2390.
- Grob, K. *Making and manipulating capillary columns for gas chromatography*. Hüthig Verlag, Heidelberg, 1986.
- Grosch, W. Analyse von Aromastoffen. *Chemie in unserer Zeit* **1990**, *24*, 82-89.
- Grosch, W. Determination of potent odourants in foods by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) and calculation of Odor Activity Value (OAV). *Flavor Fragr. J.* **1994**, *9*, 147-158.
- Grosch, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Sense*. **2001**, *26*, 533-545.
- Güntert, M.; Krammer, G.; Sommer, H.; Werkhoff, P. The importance of the vacuum headspace method for the analysis of fruit. In *Flavor analysis, Developments in isolation and characterization*. Mussinan, C.J., Morello, M.J. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 1998; pp 38-60.
- Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Okano, S. Odour thresholds of some organic compounds associated with food flavours. *J. Sci. Food Agric.* **1963**, *14*, 761-765.
- Guadagni, D.G.; Buttery, R.G.; Harris, J. Odour intensities of hop oil components. *J. Sci. Food Agric.* **1966**, *17*, 142-144.
- Guichard, E.; Souty, M. Comparison of the relative quantities of aroma compounds found in fresh apricot (*Prunus armeniaca*) from six different varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 301-307.
- Guichard, E.; Kustermann, A.; Mosandl, A. Chiral flavour compounds from apricot. Distribution of  $\gamma$ -lactone enantiomers and stereodifferentiation of dihydroactinidiolide using multi-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1990**, *498*, 396-401.
- Guichard, E. Chiral  $\gamma$ -lactones, key compounds to apricot flavor. Sensory evaluation, quantification, and chiroselective analysis in different varieties. In *Fruit Flavors. Biogenesis, Characterization and Authentication*. Rouseff, R.L.; Leahy, M. Eds., American Chemical Society, Washington, DC. 1995; pp. 258-67.
- Guichard, H.; Lemesle, S.; Ledauphin, J.; Bariller, D.; Picoche, B. Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled calvados. 1. Evaluation of quality and defects on the basis of key odorants by olfactometry and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 424-432.
- Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3022-3026.
- Hädrich J.; Vogelgesang, J. Konzept 2000 - Ein statistischer Ansatz für die analytische Praxis. Teil 1: Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze (1. Mitteilung). *Deutsche Lebensm. Rdsch.* **1999**, *95*, 428-436.
- Hädrich J.; Vogelgesang, J. Konzept 2000- Ein statistischer Ansatz für die analytische Praxis. 2. Mitteilung: Berechnungsbeispiele. *Deutsche Lebensm. Rdsch.* **1999**, *95*, 495-499.
- Ha, J.K.; Lindsay, R.C. Method for the quantitative analysis of volatile free and total branched-chain fatty acids in cheese and milk fat. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 1988-1999.

- Ha, J. K.; Lindsay, R.C. Quantification of volatile branched-chain and n-chain fatty acids in flue-cured Virginia and blended Turkish tobacco. *Flavour Fragr. J.* **1991**, *6*, 81-85.
- Ha, J.K.; Lindsay, R.C. Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavors. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 1241-1247, 1250.
- Hall, N.T.; Smoot, J.M.; Knight, R.J., Jr.; Nagy, S. Protein and amino acid compositions of ten tropical fruits by gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 1217-21.
- Hamilton-Kemp, T.R.; Loughrin, J.H.; Archbold, D.D.; Andersen, R.A.; Hildebrand, D.F. Inhibition of pollen germination by volatile compounds including 2-hexenal and 3-hexenal. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 952-956.
- Hamilton-Kemp, T.R.; McCracken, Jr., C.T.; Andersen, R.A.; Hildebrand, D.F. Antimicrobial properties of natural volatile compounds. In *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV*. Baker, D.R.; Fenyves, J.G.; Basarab, G.S. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 1995; pp. 449-462.
- Hansen, W. Konzentratherstellung und Aromarückgewinnung mit Eindampfanlagen. *Flüss. Obst* **1998**, *65*, 243-247.
- Hansson, B.S.; Larsson, M.C.; Leal, W.S. Green leaf volatile-detecting olfactory receptor neurones display very high sensitivity and specificity in a scarab beetle. *Physiol. Entomol.* **1999**, *24*, 121-126.
- Haring, H.G.; Rijkens, F.; Boelens, H.; van der Gen, A. Olfactory studies on enantiomeric eremophilane sesquiterpenoids. *J. Agric. Food Chem.* **1972**, *20*, 1018-1021.
- 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.
- Hatanaka, A.; Kajiwara, T.; Horino, H.; Inokuchi, K. Odor-structure relationship in *n*-hexenols and *n*-hexenals. *Z. Naturforsch.* **1992**, *47*, 183-189.
- Hatanaka, A. Biosynthesis of so called "green odor" emitted by green leaves. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Sankawa, U. Ed., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1999; pp. 83-115.
- Hauck, T.; Weckerle, B.; Schwab, W. Metabolism of ethyl tiglate in apple fruits leads to the formation of small amounts of (*R*)-ethyl 2-methylbutanoate. *Enantiomer* **2000**, *5*, 505-512.
- He, H.-P.; Cai, Y.; Sun, M.; Corke, H. Extraction and Purification of Squalene from Amaranthus Grain. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 368-372.
- Herrmann, K. Vorkommen, Gehalte und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obstes und Gemüses. Eiweiss und Aminosäuren im Gemüse. *Industrielle Obst und Gemüseverarbeitung* **1993**, *78*, 294-298.
- Herrmann, K. Inhaltsstoffe des Rhabarbers. *Die industrielle Obst- und Gemüseverarbeitung* **1996**, *81*, 227-229.
- Herrmann, K. *Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 2001; pp. 121-122.
- Herman, S.J. Odor reception: structure and mechanism. *Cosmetics & Toiletries*. **2002**, *117*, 83-96.
- Hönow, R.; Hesse, A. Comparison of extraction methods for the determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor. *Food Chem.* **2002**, *78*, 511-521.
- Ho, Ch.-T. Thermal generation of Maillard Aromas. In *The Maillard-Reaction*. Raphael, I. Ed.; Wiley, Chichester, 1996; 27-54.
- Hofmann, T.; Czerny, M.; Calligaris, S.; Schieberle, P. Model studies on the influence of coffee melanoidins on flavor volatiles of coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2382-2386.



- Hsieh, R.J Contribution of lipoxygenase pathway to food flavors. In *Lipids in Food Flavors*. Ho, C-T., Hartman, T.G. Eds., American Chemical Society, Washington, DC. 1994; pp. 31-48.
- <http://chirbase.u-3mrs.fr>, Internetseite, Chirbase: a molecular database for chiral chromatography.
- Huopalahti, R.; Kallio, H.; Kärppä, P.; Linko, R. Comparison of two isolation procedures for aroma compounds of dill. In *Flavour '81*. Schreier, P. Ed., Walter de Gruyter, Berlin, 1981; pp. 369-376.
- Idstein, H.; Schreier, P. Aromastoffe der Papaya-Frucht (*Carica papaya*, L., var. Solo). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1985**, *18*, 167-169.
- Idstein, H.; Schreier, P. Volatile constituents from guava (*Psidium guaiava*, L.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 138-143.
- Idstein, H.; Bauer, C.; Schreier, P. Flüchtige Säuren in Tropenfrüchten: Cherimoya (*Annona cherimolia*, Mill.), Guava (*Psidium guajava*, L.), Mango (*mangifera indica*, L., var. Alphonso), Papaya (*Carica papaya*, L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1985**, *180*, 394-397.
- Ismail, H.M.M.; Williams, A.A.; Tucknott, O.G. The flavour components of plum. An investigation into the volatile componets of canned plum. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1980**, *171*, 265-268.
- Iwaoka, W.; Hagi, Y.; Umamo, K.; Shibamoto, T. Volatile chemicals identified in fresh and cooked breadfruit. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 975-976.
- Jagella, T.; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 16-21.
- Jagella, T.; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) II. Odour activity values of desirable and undesirable odorants of black pepper. II. Odour activity values of desirable and undesirable odorants of black pepper. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 22-26.
- Jahaniaval, F.; Kakuda, Y.; Marcone, M. F. Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five Amaranthus accessions and their comparison to other oils. *J. Am. Oil Chem.* **2000**, *77*, 847-852.
- Janzowski, C.; Glaab, V.; Samimi, E.; Schlatter, J.; Eisenbrand, G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 801-809.
- Jennings, W.G.; Filsoof, M. Comparison of sample preparation techniques for gas chromatographic analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 440-445.
- Jing, P.; Fu, R.-N.; Dai, R.-J.; Gu, J.-L. Investigation into the separation of achiral and chiral molecules on fused-silica capillary columns coated with three peralkylated cyclodextrins. *Chromatographia* **1996**, *43*, 628-632.
- Jirovetz, L.; Espinosa G.J.; Silvera, G.; Nikiforov, A.; Woidich, A Volatile constituents of *Peristeria elata* (Orchidaceae). *J. Ess. Oil Res.* **1992**, *4*, 435-438.
- Joulain, D. Study of the fragrance given off by certain springtime flowers. In *Progress in Essential Oil Research*. Brunke, E.-J. Ed.; Walter de Gruyter, Berlin. 1986; pp. 57-67.
- Juwancz, Z.; Szejtli, J. The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, *21*, 379-388.
- Kandra, L.; Wagner, G. J. Pathway for the biosynthesis of 4-methyl-1-hexanol volatilized from petal tissue of *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1599-1604.
- Kardos, E. Herstellung und Haltbarmachung von Gemüsesäften. *Flüss. Obst* **1975**, *42*, 488-497.

- Karl, V.; Schmarr, H.-G.; Mosandl, A. Simultaneous stereoanalysis of 2-alkyl-branched acids, esters and alcohols using a selectivity-adjusted column system in multi-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, *58*, 347-350.
- Karl, V.; Rettinger, K.; Dietrich, H.; Mosandl, A. 2-Alkylverzweigte Aromastoffe – Struktur, Geruch und chirospezifische Analyse. *Deutsche Lebensm. Rdsch.* **1992**, *88*, 147-149.
- Karl, V. Chirale Aromastoffe – alkylverzweigte Säuren, Ester und Alkohole. Dissertation. Shaker Verlag, Aachen, 1995.
- Karmas, K.; Hartman, T.G.; Salinas, J.P.; Lech, J.; Rosen, R.T. Lipid-derived flavor compounds in fresh and dehydrated tomato products. In *Lipids in Food Flavors*. Ho, C-T.; Hartman, T.G. Eds., American Chemical Society, Washington, DC., 1994. pp. 130-143.
- 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.; Winkel, C. The basic chemistry and process conditions underpinning reaction flavour production. In *Food Flavour Technology*. Taylor, A.J. Ed., CRC Press, Boca Raton, 2001; pp. 27-59.
- Kim, K.-S. Multidimensional Gas chromatography – a powerful tool for the analysis of multicomponent mixtures. *J. Food Sci. Nutr.* **1996**, *1*, 127-133.
- Kim, K.-J.; Chung, H.-J. Flavor compounds of pine sprout tea and pine needle tea. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1269-1272.
- Kim, M.-O.; Baltes, W. On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 282-289.
- Kimland, B.; Aasen, A. J.; Almqvist, S.-O.; Arpino, P.; Enzell, C.R. Volatile acids of sun-cured greek *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 835-847.
- König, W.A.; Fricke, C.; Saritas, Y.; Momeni, B.; Hohenfeld, G. Adulteration or natural variability? Enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils. *J. High Resol. Chrom.* **1997**, *20*, 55-61.
- Kollmansberger, H.; Nitz, S.; Drawert, F. Über den Nachweis von nicht natürlichen Aromen in Fruchtschaumweinen. 3. Enantiomere  $\gamma$ -Lactone in Ananasfrüchten und Ananasprodukten. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1991**, *13*, 58-63.
- Kollmansberger, H.; Berger, R.G. Industrial recovery of strawberry flavour – fractional distillation versus plate condensation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *198*, 491-494.
- Koppenhoefer, B.; Behnisch, R.; Epperlein, U.; Holzschuh, H.; Bernreuther, A.; Piras, P.; Roussel, C. Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavours and fragrances. *Perf. Flav.* **1994**, *19*, 1-14.
- Koskinen, A. *Asymmetric Synthesis of Natural Products*. Wiley, Chister, 1993. pp. 4-16.
- Kovats, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1. Retentionindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta.* **1958**, *41*, 1915-1932.
- Krasovc, D.; Prislán, B. Grundstoffe und Aromen in Getränkeindustrie. *Flüss. Obst* **1997**, *64*, 167-174.
- Kreis, P.; Juchelka, D.; Motz, C.; Mosandl, A. Chiral components of essential oils. Part 9. Stereodifferentiation of borneol, isoborneol, and bornyl acetate. *Deutsche Apotheker Zeitung* **1991**, *131*, 1984-7.
- Krings, U.; Berger, R.G. Trends in der Aromaforschung. Analytik eröffnet neue Möglichkeiten. *Lebensmitteltechnik* **1994**, *10*, 54-55.

- Krings, U.; Berger, R.G. Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 1-8.
- Krug, H. *Gemüseproduktion*. Paul&Parey Verlag, Berlin, 1991; pp. 294-301.
- Kumazawa, K.; Masuda, H. Change in the flavor of black tea during heat processing. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3304-3309.
- Lamikanra, O.; Richard, O.A. Effect of storage on some volatile aroma compounds in fresh-cut Cantaloupe melon. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4043-4047.
- Lane, C.F. Organic synthesis using borane-methyl sulfide. The hydroboration-oxidation of alkenes. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1437-1438.
- Larsen, M.; Poll, L. Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberry. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 120-123.
- Lawless, H.T.; Lee, C.B. Common chemical sense in food flavor. In *Flavor Science, Sensible Principles and Techniques*. Acree, T. E.; Teranishi, R. Eds., American Chemical Society, Washington, DC 1993; pp. 23-66.
- Le Quéré, J-L.; Pierre, A.; Riaublance, A.; Demazières, D. Characterization of aroma compounds in the volatile fraction of soft goat cheese during ripening. *Lait* **1998**, *78*, 279-290.
- Leahy, M.M.; Reineccius, G.A. Comparison of methods for the isolation of volatile compounds from aqueous model systems. In *Analysis of volatiles*. Schreier, P. Ed., Walter de Gruyter, Berlin. 1984; pp. 19-47.
- Leahy, M.M.; Roderick, R.G. Fruit flavor biogenesis. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Teranishi, R.; Wick, E.L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 275-285.
- Ledauphin, J.; Guichard, H.; Saint-Clair, J.-F.; Picoche, B.; Bariller, D. Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *451*, 433-442.
- Ledl, F.; Schnell, F.; Severin, Th. Nachweis von 2,3-Dihydro-3,5-dihydro-6-methyl-4H-pyron-4-on in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 367-370.
- Lehmann, D.; Maas, B.; Mosandl, A. Stereoisomeric flavour compounds LXIX: stereodifferentiation of  $\delta(\gamma)$ -lactones C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> in dairy products, margarine and coconut. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *201*, 55-61.
- Lehotay, S.J.; Hajšlová, J. Application of gas chromatography in food analysis. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, *21*, 686-697.
- Leitereg, T. J.; Guadagni, D. G.; Harris, J.; Mon, T. R.; Teranishi, R. Chemical and sensory data supporting the difference between the odors of the enantiomeric carvones. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 785-787.
- Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen*. Hiller, K.; Melzig, M.F. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2000. pp. 385.
- Lin, J.; Rouseff, R.L.; Barros, S.; Naim, M. Aroma composition changes in early season grapefruit juice produced from thermal concentration. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 813-819.
- Löffler, C. Möglichkeiten zur Herstellung von Orangensaftkonzentrat. *Flüss. Obst* **1996**, *63*, 695-701.
- Loughrin, J. H.; Hamilton-Kemp, T. R.; Hildebrand, D. F. Headspace compounds from flowers of *Nicotiana tabacum* and related species. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 455-460.
- Lu, Y.; Foo, L.Y. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chem.* **1998**, *61*, 29-33.

- Luning, P.A.; de Rijk, T.; Wichers, H.J.; Roozen, J.P. Gas chromatography, mass spectrometry, and sniffing port analysis of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annum*) at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 977-983.
- Luz Sanz, M.; Del Castillo, M.D.; Corzo, N.; Olano, A. 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicator of honey quality. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4278-4283.
- Maas, B.; Dietrich, A.; Karl, V.; Kaunzinger, A.; Lehmann, D.; Köpke, T.; Mosandl, A. *tert*-Butyldimethylsilyl-substituted cyclodextrin derivatives as versatile chiral stationary phases in capillary GC. *J. Microcol. Sep.* **1993**, *5*, 421-427.
- Maga, J.A. Pyrroles in foods. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 691-694.
- Maier, N.M.; Franco, P.; Lindner, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr.* **2001**, *906*, 3-33.
- Maier, H.G. Volatile minor acids in coffee. V. Origin of the saturated acids and cause of the different contents of untreated and steam treated samples. *Deutsche Lebensm. Rdsch.* **2003**, *99*, 376-378.
- Maignial, L.; Pibarot, P.; Bonetti, G.; Chaintreau, A.; Marion, J.P. Simultaneous distillation-extraction under static vacuum : isolation of volatile compounds at room temperature. *J. Chromatogr.* **1992**, *606*, 87-94.
- Majcenovic, A.B.; Schneider, R.; Lepoutre, J.-P.; Lempereur, V.; Baumes, R. Synthesis and Stable Isotope Dilution Assay of ethanthiol and diethyl disulfide in wine using solid phase microextraction. Effect of aging on their levels in wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6653-6658.
- Mamer, O.A.; Tjoa, S.S. 2-Ethyl-3-deuterohydracrylic acid, the major urinary metabolite of 2-trideteromethylbutyric acid by a new metabolic pathway. *Biomed. Mass Spectrom.* **1975**, *2*, 133-136.
- Mamer, O.A.; Tjoa, S.S.; Scriver, C.R.; Klassen, G.A. Demonstration of a new mammalian isoleucine catabolic pathway yielding an R series of metabolites. *Biochem.* **1976**, *160*, 417-426.
- Mamer O.A.; Lepine, F.L. <sup>15</sup>N conservation in the metabolic conversion of isoleucine to alloisoleucine in the rat. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1382-1388.
- Mamer, O. A. Initial catabolic steps of isoleucine, the R-pathway and the origin of alloisoleucine. *J. Chrom.* **2001**, *758*, 49-55.
- Manley, C.H. Trends in isndustrial flavor research. In *Flavor Chemistry. Industrial and Academic Research.* Risch, S.J; Ho, Ch-T. Eds., American Chemical Society, Washington DC, 2000; pp. 2-21.
- Mariaca, R.G.; Imhof, M.I. Bosset, J.O. Occurence of volatile chiral compounds in dairy products, especially cheese – a review. *Eur. Food. Res. Technol.* **2001**, *212*, 253-261.
- Marquardt, H.; Schäfer, S. G. *Lehrbuch der Toxikologie.* BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1994; pp. 678-679.
- Marx, F.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997**, *204*, 442-444.
- Martin, G.J.; Martin, M.L. Thirty years of flavor NMR. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress.* Teranishi, R.; Wick, E. L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 19-30.
- Matheis, G. Biogenese der Aromen von Obstfrüchten. *Flüss. Obst.* **1991**, *58*, 611-615.
- Mazza, G.; Miniati, E. *Anthocyanyns in Fruits, Vegetables and Grains.* CRC Press, Boca Raton, 1993; pp. 308-309.

- McGorin, R.J. Character impact compounds: flavors and off-flavors in foods. In *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. Marsili, R. Ed.; Marcel Dekker, Inc. New York, 2002, pp. 375-413.
- Meier-Augenstein, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1999**, *842*, 351-371.
- Meister, A. Studies on *d*- and *l*- $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acids. *Biol. Chem.* 1951, *190*, 269-276.
- Metcalf, L.D.; Schmitz, A.A.; Pelka, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas-chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **1966**, *38*, 514-15.
- Mijares, R.M.; Park, G.L.; Nelson, D.B.; McIver, R.C. HPLC analysis of HMF in orange juice. *J. Food Sci.* **1986**, *51*, 843-4
- Mick, W.; Götz, E.-M.; Schreier, P. Volatile acids of black tea aroma. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, **1984**, *17*, 104-106.
- Mignogna, G.; Simmaco, M.; Kreil, G.; Barra, D. Antibacterial and hemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO Journal* **1993**, *12*, 4829-4832.
- Mills, F.D.; Weisleder, D.; Hodge, J.E. 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, a novel nonenzymatic browning product. *Tetrahedron Lett.* 1970, *15*, 1243-1246.
- Milo, C.; Blank, I. Quantification of impact odorants in food by isotope dilution assay: strength and limitations. In *Flavor analysis, Developments in Isolation and Characterization*. Mussinan, C.J., Morello, M.J. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 1998; pp. 250-259.
- Mitchen, R. Glucosinolate – biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*. **2001**, *34*, 91-103.
- Miyazawa, M.; Minamino, Y.; Kameoka H. Volatile components of the rhizomes of *Rheum palmatum* L. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11*, 57-60.
- Mollimard P.; Spinnler, H.E. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origin and properties. *J. Dairy Sci.* **1996**, *79*, 169-184.
- Molnár, P. *Élelmiszerek érzékszervi vizsgálata*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1991; pp. 49-61.
- Mosandl, A. Chirality in flavor chemistry-recent developments in synthesis and analysis. *Food Rev. International*, **1988**, *4*, 1-43.
- Mosandl, A.; Rettinger, K.; Weber, B.; Henn, D. Untersuchungen zur Enantiomerenverteilung von 2-Methylbuttersäure in Früchten und anderen Lebensmitteln mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC). *Deutsche Lebensm. Rdsch.* **1990**, *86*, 375-379.
- Mosandl, A.; Fischer, K.; Hener, U.; Kreis, P.; Rettinger, K.; Schubert, V.; Schmarr, H.-G. Stereoisomeric flavor compounds. 48. Chiro-specific analysis of natural flavors and essential oils using multidimensional gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1131-1134.
- Mosandl, A. Capillary gas chromatography in quality assessment of flavours and fragrances. *J. Chromatogr.* **1992**, *624*, 267-292.
- Mosandl, A. Echtheitsbewertung von Fruchtaromen mittels enantioselektiver Kapillargaschromatographie. *Flüss. Obst* **1996**, *63*, 386-390.
- Mosandl, A.; Juchelka, D. Advances in the authenticity of assessment of citrus oils. *J. Essent. Oil Res.* **1997**, *9*, 5-12.
- Mosandl, A. Analytical authentication of genuine flavor compounds. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Teranishi, R.; Wick, E.L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 31-42.

- Müller, H. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997**, *204*, 88-94.
- Münch, P.; Schieberle, P. Quantitative studies on the formation of key odorants in thermally treated yeast extracts using Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4695-4701.
- Mussinan, C.J. Instrumental analysis in the flavor industry. In *Flavor Science. Sensible Principles and Techniques*. Acree, T.E.; Teranishi, R. Eds., American Chemical Society, Washington, DC, 1993; pp. 169-224.
- Näf, R.; Velluz, A.; Meyer, A. P. Volatile constituents of blood and blond oranges juices: a comparison. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 587-595.
- Ney, K.-H. *Lebensmittelaromen*. Behr's Verlag, Hamburg, 1987.
- Nitz, S.; Kollmansberger, H. Changes in flavor composition during thermal concentration of apricot purée. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *197*, 541-545..
- Noonan, S.C.; Savage, G.P. Oxalate content of foods and its effect on humans. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* **1999**, *8*, 64-74.
- Núñez, A.J.; Bemelmans, J.M.H.; Maarse, H. Isolation methods for the volatile components of grapefruit juice. Distillation and solvent extraction methods. *Chromatographia* **1984**, *18*, 153-158.
- Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T. *Shoyu* (soy sauce) flavor components: acidic fractions and the characteristic flavor components. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 339-351.
- Ohloff, G. Odorous properties of enantiomeric compounds. In *Olfaction and Taste IV, Proceedings of the Fourth International Symposium*. Schneider, D. Ed., Wiss. Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1972; pp. 156-160.
- Ohloff, G. Riechstoffe und Geruchsinn. Die molekulare Welt der Düfte. Springer Verlag, Berlin, 1990.
- Organikum*. Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G. Eds.; 20. Aufl.; Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg, 1996.
- Oszmianski, J.; Sokól-Letowska, A.; Kuczynski, A. Effect of rhubarb juice on phenolics and colour of unclarified apple juice. *Fruit Processing* **1995**, *5*, 179-182.
- Oszmianski, J.; Górka, M. Improvement of carotenoid content and color in carrot juice concentrate. *Fruit Processing* **2002**, *7*, 70-73.
- Ott, A.; Fay, L.B.; Chaintrau, A. Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 850-858.
- Ottinger, H.; Soldo, T.; Hoffmann, T. Systematic studies on structure and physiological activity of cyclic  $\alpha$ -keto enamines, a novel class of "cooling" compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5383-5390.
- Paneitz, A.; Westendorf, J. Anthranoid contents of rhubarb (*Rheum undulatum* L.) and other Rheum species and their toxicological relevance. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *210*, 97-101.
- Parliment, T.H. Thermal generation of aromas. In *Thermal Generation of Aromas*. Parliment, T.H.; McGorin, R.J.; Ho, Ch-T. Eds.; ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC., 1989; pp. 2-11.
- Plattig, K.-H. Der Geruchsinn des Menschen. *Physik in unserer Zeit.* **1987**, *18*, 146-158.
- Plattig, K.-H. *Spürnasen und Feinschmecker. Die chemische Sinne des Menschen*. Springer Verlag, Berlin, 1995.
- Pennarun, A-L.; Prost, C.; Damaimay, M. Aroma extracts from oyster *Crassostrea gigas*: Comparison of two extractions methods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 299-304.

- Peppard, T.L. How chemical analysis supports flavor creation. *Food Technology*. **1999**, 53 46-51.
- Peralta, R.R.; Shimoda, M.; Osajima, Y. Further characterisation of volatile compounds in fish sauce. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 3606-3610.
- Pérez, A. G.; Olías, R. ; Luaces, P. ; Sanz, C. Biosynthesis of strawberry aroma compounds through amino acid metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 4037-4042.
- Pörschmann, J.; Kopinke, F.-D.; Remmler, M.; MacKenzie, K.; Geyer, W.; Mothes, S. Hyphenated techniques for characterizing coal wastewaters and associated sediments. *J. Chromatogr.* **1996**, 750, 287-301.
- Polak, E.H.; Provasi, J. Odor sensitivity to geosmin enantiomers. *Chem. Senses* **1992**, 17, 23-26.
- Pollock, G.E.; Cheng, C.-N.; Cronin, S.E. Determination of the D and L isomers of some protein amino acids present in soils. *Anal. Chem.* **1977**, 49, 2-7.
- Prior, A. Cool desserts without the fridge. *Food Manufacture* **1993**, 68, 31-32.
- Prost, C.; Lee, C.Y.; Giampaoli, P.; Richard, H. Extraction of cookie aroma compounds from aqueous and dough model system. *J. Food Sci.* **1993**, 58, 586-588, 608.
- Rada-Mendoza, M.; Olano, A.; Villamiel, M. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chem.* **2002**, 79, 513-516.
- Ragunathan, N.; Krock, K.A.; Klawun, C.; Sasaki, A. T.; Wilkins, C. L. Gas chromatography with spectroscopic detectors. *J. Chromatogr. A.* **1999**, 856, 349-397.
- Ramarathnam, N.; Rubin, L.J.; Diosady, L.L. Studies on meat flavor. 4. Fractionation, characterization, and quantitation on volatiles from uncured and cured beef and chicken. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 939-945.
- Rauen, H.H. *Biochemisches Taschenbuch*. 1. Auflage. Springer Verlag, Berlin, 1965, pp. 90-106.
- Reddy, G.V.; Guerro, A. Behavioral responses of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, to green leaf volatiles of *Brassica oleracea* Subsp. *capitata*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 6025-6029.
- Reid, D.S. Fruit freezing. In *Processing Fruits: Science and Technology Volume 1. Biology, Principles, and Applications*. Somogyi, L.P.; Ramaswamy, H.S.; Hui, Y.H. Eds.; Technomic Publ., Lancaster-Basel, 1996; pp. 181.
- Reineccius, G. Instrumental methods of analysis. In *Food Flavour Technology*. Taylor, A. J. Ed., CRC Press, 2001; pp. 210-251.
- Reiners, J.; Grosch, W. Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavor Profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2754-2763.
- Reinhardt, R.; Engewald, W.; Himmelreich, U.; Christian, B.; Koppenhoefer, B. Enantiomer separation of cycloalkanols by capillary gas chromatography on cyclodextrin phases. *J. Chrom. Sci.* **1995**, 33, 236-43.
- Rettinger, K.; Weber, B.; Mosandl, A. XLII. 2-Methylbuttersäure-Enantiomerenverteilung in Äpfeln und apfelhaltigen Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1990**, 191, 265-268.
- Rettinger, K. R.; Karl, V.; Schmarr, H.-G.; Dettmar, F.; Hener, U.; Mosandl, A. Chirospecific analysis of 2-alkyl-branched alcohols, acids, and esters: chirality evaluation of 2-methylbutanoates from apples and pineapples. *Phytochem. Anal.* **1991**, 2, 184-188.
- Řezanka, T.; Dembitsky, V. M. Multibranching polyunsaturated and very-long-chain fatty acids of freshwater Israeli sponges. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 709-713.

- Ridolphi, M.; Terenziani, S.; Patumi, M.; Fontanazza, G. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 835-839.
- Rimpler, H. *Biogene Arzneistoffe*. Dt-Apotheken Verlag, Stuttgart, 1995; pp. 363-365.
- Römpp Lexikon Chemie. Falbe, J.; Regutz, M. (Herausgeber). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1996; pp. 703-704.
- Rocha, S.; Coutinho, P.; Barros, A.; Coimbra, M. A.; Delgadillo, I.; Cardoso, A. D. Aroma potential of two Bairrada white grape varieties: Maria Gomes and Bical. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4802-4807.
- Rothe, M.; Thomas, B. Aromastoffe in Brot. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1962/63**, *119*, 302-310.
- Rowan, D. D.; Lane, H. P.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl, and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3276-3285.
- Ruiz Del Castillo, M.; Dobson, G. Varietal differences in terpene composition of blackcurrent (*Ribes nigrum* L.) berries by solid phase microextraction/gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1510-1515.
- Ruiz Del Castillo, M.; Caja, M.M.; Herraiz, M. Use of the enantiomeric composition for the assessment of the authenticity of fruit beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1284-1288.
- Rumpunen, K.; Henriksen, K. Phytochemical and morphological characterization of seventy-one cultivars and selections of culinary rhubarb (*Rheum* ssp.). *J. Hort. Sci. & Biotechnol.* **1999**, *74*, 13-18.
- Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. TUM Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie, Garching, Germany, 1998.
- Sabarez, H.T.; Price, W.E.; Korth, J. Volatile changes during dehydration of d'Agén Prunes. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1838-1842.
- Sanceda, N.G.; Suzuki, E.; Kurata, T. Formation of volatile acids during fermentation of fish sauce. In *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. Shahidi, F.; Ho, Ch-T.; Eds.; Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 41-53.
- Sasaki, T. A.; Wilkins, C.L. Gas chromatography with Fourier transform infrared and mass spectral detection.
- Savage, G.P.; Vanhanen, L.; Mason, S.M.; Ross, A.B. Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods. *J. Food Comp. Analysis* **2000**, *13*, 201-206.
- Schaller, H.-G. Säulenschalten in der Kapillar-GC. *LaborPraxis*. **1987**, *11*, 1426-1429.
- Schellenberg A. Analytik und Sensorik chiraler, schwefelhaltiger Aromastoffe – Charakterisierung von Thiolactonen und Mercaptoalkoholen. Dissertation. TU München, 2002.
- Shimoda, M.; Peralta, R.R.; Osajima, Y. Headspace gas analysis of fish sauce. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3601-3605.
- Shimoda, M.; Shiratsuchi, H.; Nakada, Y.; Wu, Y.; Osajima, Y. Identification and Sensory Characterization of Volatile Flavor Compounds in Sesame Seed Oil. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3909-3912.
- Schieberle, P.; Grosch, W. Model experiments about the formation of volatile carbonyl compounds. *J. Am. Oil Chem.* **1981**, *58*, 602-607.



- Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 252-7.
- Schieberle, P.; Ofner, S.; Grosch, W. Evaluation of potent odorants in cucumbers (*Cucumis sativus*) and muskmelons (*Cucumis melo*) by Aroma Extract Dilution Analysis. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 193-195.
- Schieberle, P. Primary odorants in popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1141-1144.
- Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In *Characterization of Food: Emerging Methods*. Gaonkar, A.G. Ed.; Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands, 1995, pp. 403-431.
- Sitachitta, N.; Williamson, R. T.; G., William H. Yanucamides A and B, two new depsipeptides from an assemblage of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix* Species. *J. Natural Products.* **2000**, *63*, 197-200.
- Schmarr, H.-G. Beiträge zur On-line LC-GC Kopplung und modifizierte Cyclodextrine als chirale stationäre Phasen in der Kapillar-GC. Dissertation. J.W.v. Goethe Universität Frankfurt, 1992.
- Schobinger, U. Herstellung von Saft- und Aromakonzentraten. In *Frucht- und Gemüsesäfte*. Schobinger, U.; Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1987; pp. 294-380.
- Schomburg, G. Two-dimensional gas chromatography: principles, instrumentation, methods. *J. Chromatogr.* **1995**, *730*, 309-325.
- Schreier, P.; Mosandl, A. Aromaforschung heute. *Chemie in unserer Zeit.* **1985**, *19*, 22-31.
- Schreier, P.; Bernreuther, A.; Huffer, M. *Analysis of chiral organic molecules. Methodology and Applications*. Walter de Gruyter, Berlin, 1995.
- Schultz, T. H.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Eggling, S. B.; Teranishi, R. Isolation of volatile components from a model system. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 446-449.
- Schumacher, K.; Asche, S.; Heil, M.; Mittelstädt, F.; Dietrich, H.; Mosandl, A. Methyl-branched flavor compounds in fresh and processed apple. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4496-4500.
- Schumacher, K.; Hener, U.; Patz, C.; Dietrich, H.; Mosandl, A. Authenticity assessment of 2- and 3-methylbutanol using enantioselective and/or  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotope Ratio Analysis. *Eur. Food. Res. Technol.* **1999**, *209*, 12-15.
- Schurig, V. Chiral separation using gas chromatography. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, *21*, 647-661.
- Schwab, W.; Schreier, P. Simultaneous enzyme catalysis extraction: a versatile technique for the study of flavor precursors. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 1238-42.
- Schwab, W.; Schreier, P. Enzymic formation of flavor volatiles from lipids. In *Lipid Biotechnology*. Kou, T.M.; Gardner, H.W. Eds.; Marcel Dekker Inc., New York, 2002; pp. 293-318.
- Schweppe, H. *Handbuch der Naturfarbstoffe. Vorkommen, Verwendung, Nachweis*. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, 1994; pp. 200-227.
- Shahidi, F. Lipids in flavor formation. In *Flavor Chemistry, Industrial and Academic Research*. Risch, S.J.; Ho, Ch.-T. Eds.; ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC., 2000; pp. 24-43.
- Shang, X.; Yuan, Z. Determination of active components in rhubarb and study of their hydrophobicity by micellar electrokinetic chromatography. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 617-622.
- Shimoda, M.; Shigematsu, H. Shiratsuchi, H. Osajima, Y. Comparison of the odor concentrates by SDE and adsorptive column method from green tea infusion. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1616-1620.

- Sides, A.; Robards, K.; Helliwell, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in food. *Trends in Anal. Chem.* **2000**, *19*, 322-329.
- Siegmund, B.; Leitner, E.; Mayer, I.; Farkaš, P.; Sádecká, J.; Pfannhauser, W.; Kovác, M. Untersuchung zur Problematik der Extraktion von Aromastoffen mit der simultanen Destillation-Extraktion nach Likens-Nickerson. *Deutsche Lebensm Rundschau*. **1996**, *92*, 286-290.
- Snowdown, A.L. *A Colour Atlas of Post Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*. Wolfe Scientific LTD, London, 1991, pp. 220-221, 400.
- Son, S.M.; Moon, K.D.; Lee, C.Y. Rhubarb juice as natural antibrowning agent. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1288-1289.
- Spiteller, M. *Massenspektrumsammlung von Lösungsmitteln, Verunreinigungen, Säulenbeleg-materialien und einfachen aliphatischen Verbindungen*. Springer Verlag, Wien, Austria, 1973.
- Souci, S.W.; Fachmann, W.; Kraut, G.-H. *Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen*. 5. Aufl. bearbeitet vom Scherz, H., Medpharm Verlag Stuttgart, 2000.
- Stoll, K. Versuchergebnisse bei der Gefrierkonservierung von Gemüsearten. *Schweizerische Landwirtschaftliche Forschung* **1970**, *9*, 327-3360.
- Straub, H.; Ecker, E. Switching techniques for chromatographic separation columns. *GIT* **1975**, *19*, 13-16, 18-19.
- Sucan, M.K.; Russell, G.F. Effects of processing on tomato bioactive volatile compounds. In *Bioactive Compounds in Foods, Effect of Processing and Storage*. Lee, T.-Ch.; Ho, Ch.-T. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 2002; pp. 155-172.
- Sulzbach, H. Controlling chromatograph gas streams – by adjusting relative positioning off supply columns in connector leading to detector. Carlo Erba Strumentazione GmbH, Germany. DE 4017909. 1991.
- Sulzbach, H. Multidimensionale Kapillarsäulen-Gaschromatographie. *GIT* **1996**, *40*, 131.
- Sun, J.-B.; Severson, R.F.; Schlotzhauer, W.S.; Kays, S.J. Identifying critical volatiles in the flavor of baked “Jewel” sweetpotatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1995**, *120*, 468-474.
- Surburg, H.; Güntert, M.; Harder, H. Volatile compounds from flowers. Analytical and olfactory aspects. In *Bioactive Volatile Compounds from Plants*. Teranishi, R. Ed.; American Chemical Society, Washington, DC. 1993; pp. 169-186.
- Tairu, A.O.; Hofmann, T.; Schieberle, P. Characterization of key aroma compounds in dried fruits of the West African peppertree *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) using Aroma Extract Dilution Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3285-3287.
- Takeoka, G.R.; Güntert, M.; Flath, R.A.; Wurz, R.E.; Jennings, W. Volatile constituents of kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch.). *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 576-578.
- Takeoka, G.R.; Flath, R.A.; Buttery, R.G.; Winterhalter, P.; Güntert, M.; Ramming, D.W.; Teranishi, R. Free and bound flavor constituents of white-fleshed nectarines. In *Flavor Precursors. Thermal and Enzymatic Conversions*. Teranishi, R.; Takeoka, G.R.; Güntert, M. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC., 1992; pp. 116-38.
- Takeoka, G.R.; Flath, R.A.; Mon, T.R.; Teranishi, R.; Güntert, M. Volatile constituents of apricot (*Prunus armenica*). *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, *38*, 471-477.
- Takeoka, G. Flavor chemistry of vegetables. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Teranishi, R.; Wick, E.L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 287-304.

- Tarantilis, P.A.; Polissiou, M.G. Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 459-462.
- Tarrach, F.; Herrmann, K. Organische Säuren der Gemüsearten. *Z. Unters. Forsch. A.* **1985**, *181*, 313-315.
- Tatsuka, K.; Suekane, S.; Sakai, Y.; Sumitani, H. Volatile constituents of kiwi fruit flowers: simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 2176-2180.
- Taylor, A.J.; Linforth, R.S.T. Techniques for measuring volatile release *in vivo* during consumption of food. In *Flavor Release*. Roberts, D.D.; Taylor, A.J. Eds.; ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC., 2000; pp. 8-22.
- Teranishi, R.; Kint, S. Sample Preparation. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*. Acree, T. E.; Teranishi, R. American Chemical Society, Washington, DC., 1993; pp.137-168.
- Tressl, R.; Kossa, T.; Renner, R. Über die Bildung von Aromastoffen in Malz, Würze und Bier. *Mtschr. Brauerei.* 1974, *27*, 98-102.
- Tressl, R.; Friese, L.; Fendesack, F.; Köppler, H. Studies of the volatile composition of hops during storage. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 1426-1430.
- Tressl, R.; Bahri, D.; Engel, K.-H. Lipid oxidation in fruits and vegetables. In *Quality of Selected Fruits and Vegetables of North America*. Teranishi, R., Barrera-Benitez, H. Eds.; American Chemical Society, Washington, DC. 1981; pp. 213-232.
- Tressl, R.; Rewicki, D. Heat generated flavors and precursors. In *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Teranishi, R.; Wick, E.L.; Horstein, I. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999; pp. 305-326.
- Treptow, H. Rhabarber (*Rheum*-Arten) und seine Verwendung. *Ernährung* **1985**, *9*, 179-183.
- Tschümperlin, W. Einführung. In *Das Rhabarber-Kochbuch*, Aepli, B., Ed.; Midena, Augsburg, 1996, pp. 11-28.
- Tsuneya, T.; Ishihara, M.; Takatori, H. Acidic components in Scotch spearmint oil (*Mentha gracilis* Sole). *J. Essent. Oil Res.* **1998**, *10*, 507-516.
- Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavor compounds formed during autooxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277-282.
- Umamo, K.; Shoji, A.; Hagi, Y.; Shibamoto, T. Volatile constituents of peel of quince fruit, *Cydonia oblonga* Miller. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 593-6
- Umamo, K.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T. Aroma chemicals isolated and identified from leaves of *Aloe arborescens* Mill. Var. *natalensis* Berger. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3702-3705.
- Van Beek, T.A.; Maas, P.; King, B.M.; Leclercq, E.; Voragen, A.G.J; de Groot, A. Bitter Sesquiterpene Lactones from Chicory Roots. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1035-1038.
- Van Toller, S. The psychology and neuropsychology of flavor. In *Flavor Measurement*, Ho, Ch.-T.; Manley, C.H. Eds., Marcel Dekker Inc, New York. 1993; pp. 199-217.
- Vermeulen, C.; Guyot-Declerck, Ch.; Collin, S. Combinatorial synthesis and sensorial properties of mercapto primary alcohols and analogues. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3623-3628.
- Vernin, G.; Parkanyi, C. Mechanism of formation of heterocyclic compounds in Maillard and pyrolysis reactions. In *The Chemistry of Heterocyclic Flavoring and Aroma Compounds*. Vernin, G. Ed.; Ellis Horwood, Cichester, 1982; pp. 151-207.
- Vernin, G.; Bouin, D.; Metzger, J. The flavour components of plum and their changes during freezing, fermentation and cooking. In *The Shelf Life of Foods and Beverages*.

- Charalambous, G. Ed.; Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1986; pp. 255-283.
- Vogel, G. *Handbuch des speziellen Gemüsebaues*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 1996; pp. 841-851.
- Vollendorf, N.W.; Marlett, J.A. Comparison of two methods of fiber analysis of 58 foods. *J. Food Comp. Anal.* **1993**, *6*, 203-14.
- Wang, X.; Zheng, J.; Chen, Q. GC-MS study of chemical constituents of volatile oil from *Rheum tanguticum*. *Zhongguo Yaouxue Zazhi (Beijing)* **1995**, *30*, 719-720.
- Wang, D.; Yoshimura, T.; Kubota, K.; Kobayashi, A. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 1. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5411-5418.
- Wang, Y.; Kays, S.J. Contribution of volatile compounds to the characteristic aroma of baked "Jewel" sweetpotatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2000**, *125*, 638-643.
- Wang, D.; Kurasawa, E.; Yamaguchi, Y.; Kubota, K.; Kobayashi, A. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1900-1903.
- Wanzek, P. Rhabarber - Obst oder Gemüse. *Industrielle Obst- und Gemüseverwertung* **1997**, *82*, 200.
- Ward, T.J. Chiral separation. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4521-4528.
- Weaver, C.M.; Heaney, R.P.; Nickel, K.P.; Packard, P.I. Calcium bioavailability from high oxalate vegetables: chinese vegetables, sweet potatoes and rhubarb. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 524-525.
- Weeks, W.W. Carotenoids. A source of flavor and aroma. In *Biogeneration of Aromas*. Parliment, T.H.; Croteau, R.; Eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC., 1986; pp. 157-166.
- Werkhoff, P.; Brennecke, S.; Bretschneider, W. Fortschritte bei der chirospezifischen Analyse natürlicher Riech- und Aromastoffe. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1991**, *13*, 129-152.
- Werkhoff, P.; Brennecke, S.; Bretschneider, W. Neue Wege der Aroma- und Riechstoffanalyse. *Contact.* **1991/1992**, Teil I: *54* (Heft), 13-19.; Teil II.: *55*, 3-7.
- Werkhoff, P.; Brennecke, S.; Bretschneider, W.; Güntert, M.; Hopp, R.; Surburg, H. Chirospecific analysis in essential oil, fragrance and flavor research. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 307-328.
- Werkhoff, P.; Güntert, M. Identification of some ester compounds in Vanilla beans. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1997**, *30*, 429-431.
- Werkhoff, P.; Güntert, M.; Krammer, G.; Sommer, H.; Kaulen, J. Vacuum Headspace Method in aroma research: flavor chemistry of yellow passion fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1076-1093.
- Werkhoff, P.; Brennecke, S.; Bretschneider, W. Moderne Methoden und Isolierung. Extraktionstechniken flüchtiger Aromastoffe. *Contact.* **1998/2**, 17-23.
- Werkhoff, P. Die moderne Aromaforschung – Die Grundlagen. In *Auf den Geschmack gekommen*. H&R, 1999.
- Whitehead, I.M.; Muller, B.L.; Dean, C. Industrial use of soybean lipoxygenase for the production of natural green note flavor compounds. *Cereals Food World.* **1995**, *40*, 193-197.
- WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Volume 1*. World Health Organization, Geneva, 1999; pp. 231-240.

- Weisenborn, F. L.; Bolger, J. W.; Rosen, D. B.; Mann, L. T.; Johnson, L.; Holmes, H. L. Synthetic hypotensive esters from germin. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1792-1793.
- Williams, Patrick J. Hydrolytic flavor release in fruit and wines through hydrolysis of nonvolatile precursors. In *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*. Acree, T. E.; Teranishi, R. American Chemical Society, Washington, DC., 1993; 287-308.
- Winterhalter, P.; Lander, V.; Schreier, P. Influence of sample preparation on the composition of quince (*Cydonia oblonga*, Mill.). *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 335-337.
- Winterhalter P; Skouroumounis G.K. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **1997**, *55*, 73-105.
- Wong, E.; Nixon, L. N.; Johnson, C. B. Volatile medium chain fatty acids and mutton flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 495-498.
- Wong, K. C.; Wong, S. W.; Siew, S. S.; Tie, D.Y. Volatile constituents of the fruits of *Lansium domesticum* Correa (Duku and langsat) and *Baccaurea motleyana* (Muell. Arg.) Muell, Arg. (rambai). *Flavour Fragr J.* **1994**, *9*, 319-324.
- Wright, D.W. Application of multidimensional gas chromatography techniques to aroma analysis. In *Techniques for Analyzing Food Aroma*. Marsili, R. Ed., Marcel Dekker, Inc., New York. 1997, pp. 113-142.
- Wüst, M.; Mosandl, A. Important chiral monoterpene ethers in flavours and essential oils – enantioselective analysis and biogenesis. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 3-11.
- Yabumoto, K.; Yamaguchi, M.; Jennings, W. G. Biosynthesis of some volatile constituents of muskmelon, *Cucumis melo*. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1977**, *5*, 53-56.
- Yen, G.-C., Lin, H.-T. Changes in volatile flavor components of guava juice with high-pressure treatment and heat processing and during storage. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2082-2087.
- Yim, H.; Lee, Y.L.; Lee, C.H.; Lee, S.K. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med.* **1999**, *65*, 9-13.
- Young, H.; Gilbert, J.M.; Murray, S.H.; Ball, R.D. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *71*, 329-336.

## 7. ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AEVA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
API-MS	Atmospheric Pressure Ionization-Mass Spectrometry
AW	Aromawert
CHARM	Combined Hedonic Response Measurement
CD	Cyclodextrin
E	Ethanol
EI	Elektronenstoßionisation (Electron Impact)
EXOM	Exhaled Odorant Measurement
F	Filmdicke
FD-Faktor	Verdünnungsfaktor (Flavour Dilution Factor)
FID	Flammenionisationsdetektor
FPD	Flammenphotometrischer Detektor
FTIR	Fourier Transformations-Infrarotspektroskopie
GC/O	Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography)
HRGC	Kapillargaschromatographie (High Resolution Gas Chromatography)
HRGC/MS	Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie
I.D.	Innendurchmesser
IRMS	Isotopenmassenspektrometrie
IVA	Isotopenverdünnungsanalyse
KI	Kovats Index
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
LLE	Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction)
MCSS	Mowing Column Stream Switching
MDGC	Multidimensionale Gaschromatographie
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie (Mass Spectrometry)

---

MW	Mittelwert
NMR	Kernrezonanzspektroskopie
PG	1,2-Propandiol
Press Fit	Glas-Verbinder
PTR-MS	Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry
RI	Retentionsindex
SF	Standard Fehler
SDE	Simultane Destillation-Extraktion
SW	Standardabweichung
TLC	Dünnschichtschromatographie (Thin Layer Chromatography)
VHS	Vakuum Headspace Technik
$W_f$	Wiederfindung

## 7.2 Wiederfindungen bei VHS, SDE und LLE

Substanz	Wiederfindung (%) <sup>a</sup>		
	VHS	SDE	LLE
<b>Alkohole</b>			
1-Propanol	3 ± 1	61 ± 20	31 ± 15
2-Methylpropanol	28 ± 3	79 ± 10	64 ± 14
1-Butanol	22 ± 2	82 ± 9	74 ± 12
2-Methylbutanol	62 ± 3	90 ± 6	100 ± 12
3-Methylpentanol	81 ± 3	98 ± 5	102 ± 9
4-Methylpentanol	91 ± 3	93 ± 4	106 ± 6
1-Pentanol	60 ± 3	93 ± 3	106 ± 7
2-Pentanol	47 ± 3	90 ± 8	102 ± 11
3-Pentanol	53 ± 2	90 ± 3	97 ± 6
1-Penten-3-ol	46 ± 4	87 ± 8	96 ± 11
Hexanol	90 ± 3	94 ± 5	114 ± 11
(E)-2-Hexenol	78 ± 3	97 ± 3	106 ± 7
(Z)-2-Hexenol	69 ± 3	97 ± 6	99 ± 9
(E)-3-Hexen-1-ol	72 ± 4	92 ± 6	95 ± 8
(Z)-3-Hexen-1-ol	69 ± 3	92 ± 5	106 ± 7
Cyclohexanol	28 ± 3	96 ± 6	103 ± 10
3-Mercaptohexanol	60 ± 3	-	-
4-Methylhexanol	89 ± 3	99 ± 5	100 ± 9
2-Ethylhexanol	103 ± 1	101 ± 3	114 ± 10
Tetradecanol	33 ± 5	97 ± 4	88 ± 3
Hexadecanol	13 ± 2	101 ± 7	79 ± 9
Octadecanol	10 ± 1	100 ± 2	90 ± 16
Benzylalkohol	12 ± 1	43 ± 3	116 ± 9
Furfurylalkohol	3 ± 0.3	24 ± 3	92 ± 12
2-Phenylethanol	15 ± 2	47 ± 10	124 ± 13
1,2-Ethandiol	<1	135 ± 35	120 ± 25
<b>Aldehyde</b>			
(E)-2-Pentenal	89 ± 6	120 ± 10	123 ± 12
Hexanal	41 ± 3	100 ± 14	84 ± 14
(E)-2-Hexenal	89 ± 6	82 ± 4	82 ± 7
(Z)-3-Hexenal	37 ± 6	120 ± 8	86 ± 15
Nonanal	-	66 ± 6	48 ± 5
(E)-2-Nonenal	101 ± 5	121 ± 4	119 ± 5
Decanal	34 ± 3	67 ± 6	47 ± 5



Substanz	Wiederfindung (%) <sup>a</sup>		
	VHS	SDE	LLE
Benzaldehyd	110 ± 8	102 ± 6	120 ± 13
Furfural	24 ± 2	88 ± 7	88 ± 13
5-Methylfurfural	32 ± 3	87 ± 5	101 ± 7
4-Methoxybenzaldehyd	-	70 ± 6	100 ± 11
5-Hydroxymethylfurfural	<1	<1	15 ± 5
Phenylacetaldehyd	4 ± 0.5	36 ± 6	86 ± 7
Pyrrol-2-carboxaldehyd	4 ± 0.5	7 ± 1	100 ± 20
Vanillin	1 ± 0.2	<1	107 ± 32
<b>Ester</b>			
Hexylacetat	72 ± 3	71 ± 5	86 ± 4
(E)-Methyl-2-hexenoat	98 ± 4	87 ± 6	95 ± 6
(E)-Ethyl-2-hexenoat	96 ± 6	86 ± 5	92 ± 5
(E)-2-Hexenylacetat	96 ± 6	85 ± 5	93 ± 5
(E)-2-Hexenylbutanoat	77 ± 8	82 ± 7	87 ± 3
(E)-2-Hexenylhexanoat	79 ± 14	97 ± 4	86 ± 4
Methyl-2-furoat	72 ± 3	96 ± 6	102 ± 9
Ethyl-2-furoat	83 ± 3	100 ± 5	104 ± 9
Isopropylmyristat	66 ± 11	92 ± 9	95 ± 10
Diethylphthalat	13 ± 2	68 ± 9	124 ± 10
Dibutylphthalat	37 ± 5	107 ± 3	108 ± 5
Di-(2-Ethylhexyl)phthalat	2 ± 0.4	104 ± 7	65 ± 11
<b>Ketone</b>			
2-Acetylfuran	27 ± 2	87 ± 6	106 ± 11
(E)-Geranylaceton	113 ± 6	101 ± 2	98 ± 6
Maltol	-	-	79 ± 8
<b>Lactone</b>			
γ-Octalacton	21 ± 4	70 ± 5	110 ± 8
γ-Decalacton	33 ± 5	84 ± 10	120 ± 9
<b>Terpene, Terpenalkohole</b>			
β-Ionon	68 ± 15	100 ± 2	88 ± 13
Limonen	12 ± 2	18 ± 3	71 ± 3
α-Linalool	104 ± 6	98 ± 3	109 ± 8
α-Terpineol	69 ± 2	102 ± 2	120 ± 8
Squalen	4 ± 1	86 ± 3	67 ± 10
<b>Säuren</b>			
2-Methylbuttersäure	17 ± 2	70 ± 2	117 ± 12
4-Methylpentansäure	38 ± 3	82 ± 4	125 ± 13
Pentansäure	30 ± 4	80 ± 5	110 ± 10
Hexansäure	37 ± 3	82 ± 4	126 ± 13

Substanz	Wiederfindung (%) <sup>a</sup>		
	VHS	SDE	LLE
(E)-2-Hexensäure	19 ± 2	30 ± 4	101 ± 7
(E)-3-Hexensäure	10 ± 1	19 ± 1	114 ± 12
4-Methylhexansäure	28 ± 3	76 ± 5	110 ± 8
Octansäure	59 ± 4	110 ± 6	137 ± 13
Nonansäure	67 ± 5	113 ± 7	130 ± 11
Decansäure	73 ± 6	115 ± 7	129 ± 10
Dodecansäure	66 ± 7	116 ± 8	122 ± 10
Tetradecansäure	17 ± 2	119 ± 8	119 ± 9
Pentadecansäure	7 ± 1	119 ± 8	110 ± 12
Hexadecansäure	6 ± 1	125 ± 9	124 ± 15
<b>Sonstige Verbindungen</b>			
Anethol	102 ± 7	102 ± 2	96 ± 6
1,2-Dimethoxybenzol	80 ± 4	97 ± 2	110 ± 9
1,4-Dimethoxybenzol	104 ± 5	98 ± 1	115 ± 5
Indol	46 ± 2	71 ± 3	99 ± 7
Isoeugenol	50 ± 3	85 ± 5	92 ± 5
(E)-Linalooloxid	43 ± 3	94 ± 4	110 ± 9
Methyleugenol	66 ± 2	101 ± 4	104 ± 8
2-Methylpyridin	-	61 ± 10	-
Pyrrrol	64 ± 4	89 ± 8	85 ± 11

<sup>a</sup> Mittelwert aus 7 Bestimmungen ± Standardabweichung. VHS: Vakuum Headspace Technik; SDE: Simultane Destillation-Extraktion und LLE: Flüssig-Flüssig Extraktion.

Substanz	Wiederfindung (%)		
	VHS DS	ES	SDE
Äpfelsäure	<0.01	<0.1	<1
Oxalsäure	<0.01	<0.1	<1
Zitronensäure	<0.01	<0.1	<1

<sup>a</sup> Wert aus 3 Bestimmungen. VHS: VAKUUM Headspace Technik; SDE: Simultane Destillation-Extraktion und LLE: Flüssig-Flüssig Extraktion. ES: Extraktionsschritt. DS: Destillationsschritt.

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Márta Dregus  
Geburtsdatum: 04. 02. 1974  
Geburtsort: Budapest (Ungarn)  
Staatsangehörigkeit: ungarisch

## SCHULBILDUNG

Szilágyi Erzsébet Gymnasium, Budapest (Ungarn) 1988-1992  
Herceghalomer Grundschule (Ungarn) 1980-1988

## STUDIUM UND WEITERFÜHRENDE TÄTIGKEIT

Budapester Universität für Wirtschaftswissenschaften und Staatsverwaltung 1992-1999  
Fakultät für Lebensmittelwissenschaft, Budapest (Ungarn)  
Abschluss: Lebensmittel-Diplomingenieur MSc. (1997)

Agrarwissenschaftliche Universität 1995-1997  
Fakultät für Lehrerausbildung, Gödöllő (Ungarn)  
Abschluss: Ingenieur-Fachlehrerin MSc. (1998)

## PROMOTION

Technische Universität München  
Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie seit 2000

## SONSTIGE

- 13 Publikationen: Artikel, Vorträge und Poster
- Stipendien:
  - Internationales Erasmus Programm, 1999 (6 Monate)
  - Stipendium der Technischen Universität München, 2000 (9 Monate)
  - Stipendium des Bayerischen Staatsministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst, 2002 (1 Jahr)

### Veröffentlichungen der Dissertation:

Dregus, M., Schmarr, H.-G., Takahisa, E., Engel, K.-H. Enantioselective analysis of methyl branched alcohols and acids in rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.) stalks. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7086-7091.

Dregus, M., Engel, K.-H. Volatile constituents of rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.) stalks. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6530-6536.

Dregus, M., Barta, J., Engel, K.-H. Investigation of volatile constituents of rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L.). In *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century*. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium (2002) Ed.: Jean-Luc Le Quéré and Patrick X. Étievant. Intercept, Lavoisier, Londres. France. 2003; pp. 580-583.

Dregus, M., Barta, J., Engel, K.-H. A rebarbara és felhasználása. *Élelmezési Ipar.* **2001**, *55*, 276-280.

### *Vorträge:*

Engel, K.-H., Dregus, M. Investigation of volatile compounds in rhubarb.  
The 226th ACS National Meeting, 7-11. 09. 2003, New York, USA.

Dregus, M., Barta, J.; Ferenczy, A., Engel, K.-H. A zöldségrebarbara (*Rheum rhabarbarum* L.) aromaanyagainak vizsgálata. Lippay János-Vas Károly Internationales Wissenschaftliches Symposium. 6-7. 11. 2003, Budapest.

### *Poster:*

Dregus, M., Barta, J., Engel, K.-H. Flüchtige Verbindungen in Rhabarber-Konzentrat. GDCh-Jahrestagung Chemie, 6-11. 10. 2003, München.

Dregus, M., Eißner, R., Engel, K.-H. Enzym-katalysierte Bildung flüchtiger C<sub>6</sub>-Komponenten in Rhabarber (*Rheum rhabarbarum*). Deutscher Lebensmittelchemiker Tag, 9-11. 09. 2002, Frankfurt.

Dregus, M., Barta, J., Schellenberg, A., Engel, K.-H. Rebarbara sűrítmény aromaanyagainak vizsgálata. Lippay János-Vas Károly Internationales Wissenschaftliches Symposium, 6-7.11. 2000, Budapest.