

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie
Garching bei München

Objektivierung des bitteren Fehlgeschmacks von Karotten (*Daucus carota* L.) und Karottenprodukten

Andreas Czepa

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Th. Hofmann
(Westfälische Wilhelms-Universität Münster)
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

Die Dissertation wurde am 17.12.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.01.2004
angenommen.

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Januar 2003 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Th. Hofmann an der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Garching bei München durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Th. Hofmann, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende, motivierende Betreuung, die wertvollen Anregungen, Ratschläge und Diskussionen sowie das meiner Arbeit stets entgegengebrachte rege Interesse.

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

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Assistentinnen Frau Martina Coklica und Frau Kristin Kahlenberg, die mir in der Zeit von August 2000 bis September 2001 bzw. von Oktober 2001 bis Januar 2003 zur Seite standen. Durch ihre tatkräftige Unterstützung, ihre absolute Zuverlässigkeit, ihre schnelle und zugleich sehr saubere Arbeitsweise sowie ihr großes Engagement und Interesse haben sie maßgeblich zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. G. Bretschneider (Hipp-Werk, Pfaffenhofen) und Herrn K. Pittroff (Fa. Alete, München) danke ich für die Bereitstellung von bitteren Karottenbrei-Chargen sowie die gute, unkomplizierte Zusammenarbeit.

Frau Kerstin Keller, Frau Martina Coklica, Frau Nina Rotzoll, Herrn Andreas Weiß und Frau Kristin Kahlenberg danke ich sehr herzlich für ein wunderbares, freundliches und kameradschaftliches Arbeitsklima in unserem gemeinsamen Labor 62304.

Für die Teilnahme an zahlreichen, nicht immer angenehmen sensorischen Untersuchungen möchte ich mich bei meinen Kollegen Frau Sabine Bareuther, Herrn Dr. Oliver Frank, Herrn Dr. Magnus Jezussek, Herrn Harald Ottinger,

Frau Nina Rotzoll, Frau Susanne Scharbert, Herrn Timo Stark, Herrn Tomislav Soldo, Herrn Jörg Stein, Herrn Ingo Teutsch und Herrn Andreas Weiß bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. O. Frank und Herrn Dr. M. Steinhaus für ihr Engagement bei der Aufnahme der NMR-Spektren, Herrn J. Schönauer und Frau I. Otte für die gewissenhafte Aufnahme der Massenspektren sowie Frau S. Bijewitz für die Anfertigung der vielen schönen Zeichnungen.

Bei Herrn D. Börger bedanke ich mich sehr herzlich für den Vorschlag der Synthesestrategie für den Internen Standard [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol.

Herrn Ulrich Arzberger, Frau Dr. Ilka Haase und Frau Alexandra Lettschulte danke ich vielmals für ihr großes Engagement bei der Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin hatte ich am Institut das Glück, mit Frau Sandra Wunderlich und Herrn Jens-Michael Liepe zwei wundervolle Menschen kennenzulernen, die meine Doktorandenzeit zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt werden ließen.

Jens danke ich sehr herzlich für unzählige lustige Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts sowie für zahlreiche, unvorstellbare, nie dagewesene Wok-, Käse-, Spina-, Grill-, Käsefondue-, Wein- und Cocktail-Sessions.

Sandra danke ich ebenfalls sehr herzlich für zahllose wundervolle gemeinsame Stunden innerhalb und außerhalb des Instituts, für viele tolle Gespräche, ihr stets für mich offenes Ohr, ihre Ehrlichkeit sowie ihr riesiges mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich stets bauen konnte.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | DIE KAROTTE | 1 |
| 1.2 | BITTERER FEHLGESCHMACK IN KAROTTEN | 3 |
| 1.3 | METHODEN ZUR BEWERTUNG GESCHMACKSAKTIVER VERBINDUNGEN..... | 10 |
| 1.3.1 | Das Geschmackswert-Konzept..... | 10 |
| 1.3.2 | Die Geschmacksverdünnungsanalyse..... | 11 |
| 1.4 | AUFGABENSTELLUNG..... | 13 |
| 2 | ERGEBNISSE | 15 |
| 2.1 | AKTIVITÄTSORIENTIERTE FRAKTIONIERUNG VON KAROTTEN UND KAROTTENPRODUKTEN UND IDENTIFIZIERUNG VON BITTERSTOFFEN | 15 |
| 2.1.1 | Analyse der Hexanextrakte..... | 17 |
| 2.1.1.1 | Bitterstoff-Screening mittels Gelpermeationschromatographie/Ge- schmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA) | 18 |
| 2.1.1.2 | Identifizierung von Bitterstoffen in der GPC-Fraktion H-VIII..... | 21 |
| 2.1.1.3 | Quantitative Bestimmung von 6-Methoxymellein | 30 |
| 2.1.1.4 | Diskussion | 32 |
| 2.1.2 | Analyse der Ethanolextrakte | 35 |
| 2.1.2.1 | Bitterstoff-Screening mittels Gelpermeationschromatographie/Ge- schmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA) | 35 |
| 2.1.2.2 | Identifizierung von Bitterstoffen in GPC-Fraktion E-VI | 37 |
| 2.1.2.3 | Diskussion | 56 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2 | QUANTIFIZIERUNG AUSGEWÄHLTER BITTERSTOFFE UND DOSIS/AKTIVITÄTS- KORRELATION IN KAROTTEN UND KAROTTENPRODUKTEN..... | 58 |
| 2.2.1 | Synthese des internen Standards [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diol-3,8- diol..... | 58 |
| 2.2.2 | Gehalte an Bitterstoffen und Bestimmung von Bitteraktivitätswerten..... | 60 |
| 2.2.2.1 | Bitterstoffe in frischen Karotten..... | 62 |
| 2.2.2.2 | Bitterstoffe in Karottenbrei | 65 |
| 2.2.2.3 | Bitterstoffe in Karottensaft | 68 |
| 2.2.3 | Diskussion | 70 |
| 2.3 | QUANTITATIVE STUDIEN ZUM EINFLUSS DER SORTE, DER MORPHOLOGIE UND DER VERARBEITUNG AUF DEN GEHALT AN BITTERSTOFFEN IN KAROTTEN | 72 |
| 2.3.1 | Abhängigkeit des Bitterstoffgehaltes von der Karottensorte | 72 |
| 2.3.2 | Untersuchungen zum Einfluss der Morphologie auf die Bitterstoff- verteilung sowie zum Einfluss technologischer Prozesse auf den Polyacetylen- und 6-Methoxymelleingehalt | 76 |
| 2.3.2.1 | Einfluss der Morphologie | 76 |
| 2.3.2.2 | Einfluss der industriellen Karottenbreiherstellung..... | 78 |
| 2.3.2.3 | Einfluss des Blanchierens..... | 81 |
| 2.3.3 | Diskussion | 82 |
| 3 | EXPERIMENTELLER TEIL | 85 |
| 3.1 | UNTERSUCHUNGSMATERIAL..... | 85 |
| 3.2 | CHEMIKALIEN | 86 |
| 3.3 | LÖSUNGSMITTELEXTRAKTION DER KAROTTEN UND KAROTTENPRODUKTE | 87 |
| 3.3.1 | Frische Karotten und bitterinduzierte Karotten | 87 |
| 3.3.2 | Karottenbrei..... | 87 |
| 3.4 | CHROMATOGRAPHISCHE FRAKTIONIERUNG DER LÖSUNGSMITTELEXTRAKTE | 88 |
| 3.4.1 | Gelpermeationschromatographie..... | 88 |
| 3.4.2 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie..... | 88 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.5 | ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON BITTERSTOFFEN..... | 90 |
| 3.5.1 | 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin (6-Methoxymellein) | 90 |
| 3.5.2 | 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon (Eugenin) und 2,4,5-Tri- methoxybenzaldehyd (Gazarin)..... | 91 |
| 3.5.3 | [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol), [Z]-Heptadeca-1,9- dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol) und [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9- dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat) | 92 |
| 3.6 | SYNTHESE VON [E]-HEPTADECA-1,9-DIEN-4,6-DIIN-3,8-DIOL..... | 96 |
| 3.6.1 | 1-Penten-4-in-3-ol..... | 96 |
| 3.6.2 | [E]-4-Dodecen-1-in-3-ol | 97 |
| 3.6.3 | [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol..... | 97 |
| 3.7 | QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN..... | 100 |
| 3.7.1 | Quantitative Bestimmung von 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4- dihydroisocumarin (6-Methoxymellein) in gelagerten Karotten | 100 |
| 3.7.2 | Simultane quantitative Bestimmung von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6- diin-3-ol, [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol, [Z]-3-Acetoxy- heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol und 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy- 3,4-dihydroisocumarin | 101 |
| 3.8 | ANALYTISCH-INSTRUMENTELLE METHODEN | 103 |
| 3.8.1 | Kapillargaschromatographie: HRGC/FID..... | 103 |
| 3.8.2 | Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie | 103 |
| 3.8.3 | Kernresonanzspektrometrie (NMR) | 104 |
| 3.8.3.1 | ¹ H-NMR-Spektroskopie | 104 |
| 3.8.3.2 | ¹³ C-NMR-Spektroskopie | 104 |
| 3.8.3.3 | ¹³ C-DEPT-(135°)-NMR-Spektroskopie..... | 105 |
| 3.8.3.4 | Doppelquantengefilterte H,H-Verschiebungskorrelation (DQF-COSY) | 105 |
| 3.8.3.5 | Heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (HMQC) | 106 |
| 3.8.3.6 | Heteronukleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC)... | 106 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.9 | HUMAN-SENSORISCHE UNTERSUCHUNGEN | 107 |
| 3.9.1 | Sensorische Analyse von Karotten und Karottenprodukten..... | 107 |
| 3.9.2 | Bestimmung der Bitterschwellenwertkonzentrationen von Lösungsmittlextrakten | 107 |
| 3.9.3 | Bestimmung der Bittergeschmacksschwellenwerte von Reinsubstanzen... | 108 |
| 3.9.4 | Geschmacksverdünnungsanalysen (GVA) | 109 |
| 3.9.4.1 | Gelchromatographie/Geschmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA) | 109 |
| 3.9.4.2 | HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA) | 109 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG | 110 |
| 5 | LITERATUR | 114 |

Abkürzungen und Trivialnamen

| | |
|--------------------|---|
| ASU | Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG |
| BA | Bitteraktivität |
| COSY | H,H-Homonuclear Correlation Spectroscopy |
| CI | Chemische Ionisation |
| d | Dublett |
| dd | Doppeldublett |
| DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| DQF | Doppelquantengefiltert |
| EI | Elektronenstoßionisation |
| Eugenin | 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon |
| Falcarindiol | [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol |
| Falcarindiolacetat | [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol |
| Falcarinol | [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| Gazarin | 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd |
| GC | Gaschromatographie |
| GC/MS | Gaschromatographie/Massenspektroskopie |
| GPC | Gelpermeationschromatographie |
| GVA | Geschmacksverdünnungsanalyse |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HRGC | High Resolution Gaschromatographie (Kapillargaschromatographie) |
| i.D. | innen Durchmesser |
| LMBG | Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz |
| Methoxymellein | 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin |
| MS | Massenspektroskopie |
| n.b. | nicht bestimmt |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| q | Quartett |

| | |
|---------|------------------------|
| s | Singulett |
| RP-HPLC | Umkehrphasen-HPLC |
| t | Triplett |
| TD | Taste Dilution |
| TMS | Tetramethylsilan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |

1 Einleitung

1.1 Die Karotte

Die Karotte (*Daucus carota* L.) kommt ursprünglich als Wildpflanze in Mitteleuropa vor und bildet eine relativ dünne weissliche, verholzte Pfahlwurzel. Die heute bekannte Kulturform dürfte aber nicht direkt von ihr abstammen. Vielmehr wird angenommen, dass sie aus einer Kreuzung der wilden Karotte mit der im Mittelmeergebiet heimischen Riesenmöhre, *Daucus maximus*, hervorging, wobei als neues Merkmal die fleischig verdickte, gelb bis orangerot gefärbte Rübe entstand (*Franke, 1997*).

Die Karotte ist eine zweijährige Pflanze, die im ersten Jahr eine Rosette aus doppelt bis dreifach gefiederten Blättern bildet. Die Assimilate werden in der fleischigen Bastrübe gespeichert, die aus einem kurzen Hypokotylabschnitt und der Hauptwurzel besteht und durch frühzeitiges Dickenwachstum gekennzeichnet ist. Wird die marktreife Karotte im ersten Jahr nicht geerntet, wächst der Spross im zweiten Jahr unter Auflösung der Rosette und unter Verbrauch der Nährstoffe der Rübe zu einem mehrfach verzweigten beblätterten Infloreszenzspross heran. Aus den weissen Blüten der Doppeldolden gehen Doppelachänen als Saatgut hervor (*Franke, 1997*).

Die Karotte wurde bereits sehr früh medizinisch genutzt, ihr Anbau als Kulturpflanze erfolgte aber wahrscheinlich erst im zehnten Jahrhundert nach Christus. Durch Züchtung sind zahlreiche, heute weltweit angebaute Sorten und Formen entstanden. Morphologisch wird zwischen dem härteren Holzteil, dem Xylem, und dem zarteren Bastmantel, dem Phloem unterschieden. Beide Teile sind durch das Kambium verbunden (**Abbildung 1**).

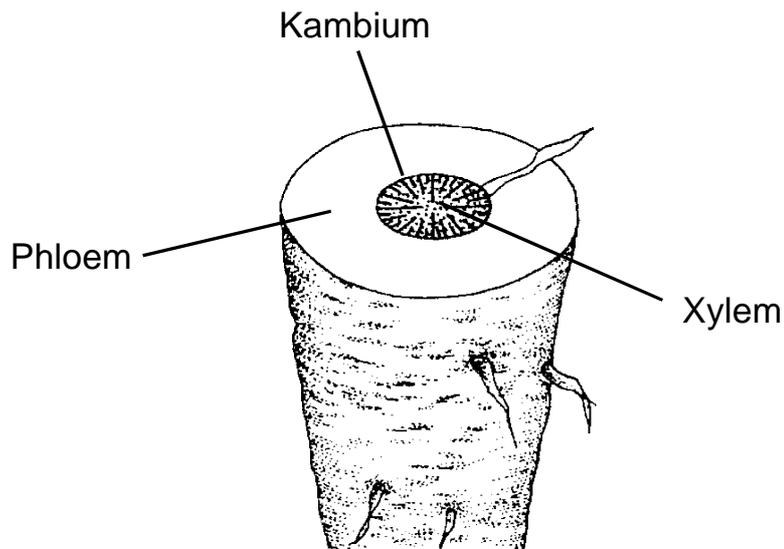


Abbildung 1 Querschnitt durch die Karotte

Die wichtigsten Inhaltsstoffe der Karotte sind in **Tabelle 1** zusammenfassend dargestellt. Neben dem Hauptbestandteil Wasser sind überwiegend lösliche Kohlenhydrate und Ballaststoffe mengenmäßig dominierend. Unter den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen ist insbesondere der hohe Anteil des Farbstoffs β -Carotin erwähnenswert.

Tabelle 1 Inhaltsstoffe der Karotte in 100 g essbarem Anteil (*Souci, Fachmann, Kraut*)

| Inhaltsstoff | Menge in g / 100 g essbarem Anteil |
|------------------------|------------------------------------|
| Wasser | 88,2 |
| Lösliche Kohlenhydrate | 4,8 |
| Ballaststoffe | 3,4 |
| Proteine | 1,0 |
| Mineralstoffe | 0,9 |
| Organische Säuren | 0,3 |
| Lipide | 0,2 |
| β -Carotin | 0,012 |

1.2 Bitterer Fehlgeschmack in Karotten

Aufgrund des süßlich-milden Geschmacks und der leichten Verarbeitbarkeit, nehmen Karotten heute eine zentrale Stellung bei der Herstellung von Babynahrung ein. Jedoch gibt ein sporadisch auftretender Bittergeschmack in den Karottenprodukten des öfteren Anlass für Verbraucherreklamationen. Dieser Bittergeschmack kann z.T. bereits beim Lagern der Rohware auftreten, z.T. können sich entsprechende Bitternoten aber auch erst bei der Verarbeitung von ursprünglich als nicht bitter eingestufte Rohware entwickeln. Aufgrund der weltweit großen wirtschaftlichen Bedeutung von Karottenprodukten ist daher bislang eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt worden, um diejenigen Verbindungen zu identifizieren, die diesen bitteren Fehlgeschmack ursächlich hervorrufen.

Bereits in den Fünfziger Jahren wurde in der Literatur über das sporadische Auftreten von Bittergeschmack in kalt gelagerten Karotten berichtet. Die damals von *Yamaguchi et al.* (1955) durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass diese Bitterkeit hauptsächlich im Phloem und weniger im Xylem des Karottengewebes lokalisiert war. Beim Vergleich der quantitativen Gehalte an verschiedenen Inhaltsstoffen stellten die Autoren jedoch kaum Unterschiede zwischen bitteren und nicht bitteren Karotten fest. Allein das α -Carotin lag in bitteren Karotten in deutlich geringeren Mengen vor, als dies bei nicht bitteren Karotten der Fall war. Da die Bitterstoffe zusätzlich in Petrolether löslich waren und eine starke Adsorption bei der Chromatographie an Magnesiumoxid aufwiesen, folgerten die Autoren, dass die Bitterkeit von Abbauprodukten der Carotinoide verursacht werden könnte.

Mit dem Ziel, die an der Bitterkeit von Karotten beteiligten Verbindungen zu identifizieren, isolierten *Sondheimer et al.* (1955) nach Petroletherextraktion von eingedosten, kaltgelagerten Karotten eine bitter schmeckende orangefarbene Fraktion, deren UV-Spektrum im Vergleich zu dem entsprechender Isolate nicht bitter schmeckender Karotten eine erhöhte UV-Absorption bei 265 sowie 290 nm aufwies. Die sensorisch ermittelte Bitterintensität der Karotten stieg dabei proportional mit der Absorption bei 265 nm an. In Einklang mit *Yamaguchi*

et al. (1955) fanden die Autoren weiterhin höhere Absorptionswerte bei 265 nm und eine höhere Bitterintensität in Isolaten aus eingedostem, gelagerten Phloem als in entsprechenden Isolaten aus dem Xylem. Da allerdings einige Proben trotz deutlich unterschiedlicher Bitterintensitäten nahezu identische Absorptionen bei 265 nm aufwiesen, vermuteten die Autoren, dass es sich hierbei nicht um die einzige vorhandene Bittersubstanz sondern um eine Indikatorverbindung handelt, die in vielen Fällen eine Abschätzung der Bitterintensität zulässt. Weiterhin konnte von den Autoren nicht geklärt werden, ob es sich bei dem Isolat um eine oder mehrere Substanzen handelte.

Dodson et al. (1956) gelang es kurz darauf nach Acetonextraktion von bitteren Karotten eine bittere Substanz zu erhalten, die nach Kristallisation aus wässrigem Methanol einen Schmelzpunkt von 77 °C und ein Molekulargewicht von 268 Dalton aufwies. Die quantitative Elementaranalyse ließ die Autoren auf die Summenformel $C_{15}H_{15}O_5$ schließen, eine eindeutige Strukturidentifizierung gelang jedoch nicht.

In folgenden Arbeiten gelang es *Sondheimer* (1956) nach Hexanextraktion von bitteren Karotten eine farblose, kristalline Substanz in Mengen bis zu 50 mg/100 g Karotten zu isolieren, deren UV-Spektrum mit der aus der Petroletherextraktion isolierten Verbindung (*Sondheimer et al.*, 1955) identisch war. Es handelte sich dabei um eine bitter schmeckende, fluoreszierende Verbindung mit einem Schmelzpunkt von 76 °C. Eine 0,01 %-ige wässrige Lösung dieser Verbindung schmeckte deutlich bitter. Nach Bestimmung der quantitativen Elementarzusammensetzung und der Molekülmasse schlug er für diese Verbindung die Summenformel $C_{11}H_{12}O_4$ vor und bezeichnete sie als „Verbindung A“. Weitere Untersuchungen zur Strukturaufklärung ließen auf eine Alkoxygruppe, ein aktiviertes Wasserstoffatom, ein oder zwei Methylgruppen und eine phenolische Hydroxylgruppe schließen. Zusätzlich erhielt der Autor nach Wasserdampfdestillation von bitteren Karotten ein bitteres Öl, das ein anderes UV-Spektrum als Verbindung A besaß und diese nicht enthielt. Er folgerte daher, dass der Bittergeschmack von Karotten von verschiedenen Verbindungen, die einer wasserdampfllüchtigen bzw. einer nicht-flüchtigen Fraktion zugeordnet werden können, verursacht wird und dass Verbindung A

eine dieser am Bittergeschmack beteiligten Substanzen ist. Kurz darauf gelang es ihm, durch Kombination der Ergebnisse aus IR-Spektroskopie, Iodoformreaktion, Kaliumpermanganatoxidation, Reaktion mit Diazomethan, Verseifung mit Kaliumhydroxid und quantitativer Bromierung, die Struktur von Verbindung A als 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin (6-Methoxymellein) zu identifizieren.

Mit dem Ziel, die im Wasserdampf-Destillat bitter schmeckender Karotten enthaltenen Bitterstoffe zu untersuchen, isolierten *Shallenberger et al.* (1960) nach Ether-Extraktion eines aus 122 kg Karotten erhaltenen Destillates ein schwach gelbes, stark bitteres Öl. Durch fraktionierte Destillation dieses Isolates erhielten die Autoren eine stark bittere Fraktion, die das gleiche UV-Spektrum wie das von *Sondheimer* durch Wasserdampf-Destillation gewonnene Öl aufwies. Eine zuerst vermutete Identität mit Carotol (1,7-Dimethyl-4-isopropyl-naphthalin) oder Daucol konnte von den Autoren nicht bestätigt werden. Ihre weiteren Untersuchungen machten vielmehr die Anwesenheit eines Sesquiterpens oder einer Mischung von Sesquiterpenen wahrscheinlich. Die genaue Struktur eines Bitterstoffes konnte allerdings nicht geklärt werden.

Hingegen gelang es *Haddad et al.* (1958) aus Karottensamen das bitter schmeckende „Gazarin“ zu isolieren, das wenig später von *Starkovsky* (1962) als 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd in der Struktur geklärt werden konnte. Daten über den Bitterschwellenwert dieser Verbindung sowie dessen Beitrag zur Bitterkeit von Karotten existieren bislang jedoch nicht.

Coxon et al. (1973) fanden, dass Karotten, die in Gegenwart sehr kleiner Ethylenkonzentrationen gelagert wurden, eine Reihe ungewöhnlicher phenolischer Verbindungen bilden, die sonst nicht in Karotten vorkommen. Als solche konnten die Autoren 6-Hydroxymellein, 6-Methoxymellein, 5,7-Dihydroxy-2-methylchromon, 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon (Eugenin) und Scopoletin identifizieren.

In Langzeitlagerungsversuchen untersuchte *Müller* (1978) den Einfluss von Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur, Verletzungsgrad und des davon

abhängigen Pilzbefalls auf die 6-Methoxymelleinbildung in Karotten. Mittels einer speziell dafür entwickelten fluoreszenzspektroskopischen Methode konnte er in verletzten Karotten unterschiedlicher Reifestadien 6-Methoxymellein in Gehalten von bis zu 113 µg/g bestimmen. Nach einer Lagerungszeit von 5-10 Wochen durchlief die 6-Methoxymelleinbildung ein Maximum. Neben dem freien Methoxymellein gelang es dem Autor erstmals, glucosidisch gebundenes 6-Methoxymellein in Mengen von bis zu 15 µg/g nachzuweisen. Eine Infektion der Karotten mit dem Pilz *Ceratocystis fimbriata* führte schon nach einer Lagerung von nur 10 Tagen bei Raumtemperatur zu den höchsten ermittelten Gehalten von 610 µg/g bzw. 20 µg/g an freiem bzw. glucosidisch gebundenem 6-Methoxymellein. Sensorische Untersuchungen ergaben allerdings keine Korrelation zwischen den 6-Methoxymelleingehalten und der Intensität des Bittergeschmacks der Karotten, auch nicht bei Einbezug des glucosidisch gebundenen Anteils. Stattdessen trat bei Karotten, in denen neben dem 6-Methoxymellein noch 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon (Eugenin) in größeren Mengen enthalten war, ein verstärkter Bittergeschmack auf. Der Autor vermutete daher, dass die von *Coxon et al.* (1973) in Karotten gefundenen stress-induzierten Verbindungen ebenfalls zum Bittergeschmack beitragen.

Sarkar und Phan (1979) untersuchten den Einfluss von Ethylen auf die Bildung von phenolischen Verbindungen in Karotten sowie ihre Auswirkung auf die Ausbildung von Fehlgeschmack und Oberflächenbräunung. Bei Begasung von Karotten mit Ethylenkonzentrationen von 100 ppm beobachteten sie eine Zunahme des Gesamtgehaltes an phenolischen Verbindungen in der Karotte, insbesondere von Isochlorogensäure. Bei längerer Begasung der Karotten mit 100 ppm Ethylen bzw. bei kurzer Begasung mit höheren Konzentrationen (2000 und 50000 ppm) konnten die Autoren vier neue phenolische Verbindungen nachweisen, die in unter Luft gelagerten Karotten nicht vorkamen. Zwei dieser Verbindungen konnten sie als 6-Methoxymellein und Eugenin identifizieren. Darüber hinaus stellten sie fest, dass 85 % der phenolischen Substanzen in der Oberflächenschicht der Karotten lokalisiert waren und dass die Zunahme dieser Verbindungen mit einer enzymatischen Oberflächenbräunung einherging. Ein dadurch auftretender Bittergeschmack konnte von den Autoren allerdings nicht festgestellt werden.

Neuere Untersuchungen befassten sich mit dem Zusammenhang des 6-Methoxymelleingehaltes und dem Geschmack von frisch geernteten Winterkarotten (*Yoshino et al. (1993)*). Die Autoren entwickelten hierzu eine Schnellmethode zur Quantifizierung von 6-Methoxymellein mittels HPLC und bestimmten erstmals einen Schwellenwert für den Fehlgeschmack bzw. den Bittergeschmack dieser Verbindung. Da diese Schwellenwerte bei 60 bzw. 100 mg/kg lagen, 6-Methoxymellein allerdings nur in Konzentrationen von bis zu 11,1 mg/kg gefunden werden konnte, sollte das 6-Methoxymellein jedoch kaum einen Einfluss auf den Geschmack der untersuchten Winterkarotten haben.

Um den Einfluss von Umweltstress auf die chemischen und sensorischen Eigenschaften von Karottenprodukten zu erforschen, wurde von *Talcott und Howard (1999)* kürzlich eine Untersuchung an verarbeiteten, pürierten Karotten verschiedener Sorten durchgeführt. Hierzu verwendeten sie sowohl Karotten, die durch Hagel während des Wachstums stark verletzt wurden, als auch unverletzte Karotten. Die Autoren untersuchten die Karotten auf pH-Wert, Wassergehalt und Gehalt an löslichen phenolischen Verbindungen, Carotinoiden, Zuckern, organischen Säuren und 6-Methoxymellein. Zusätzlich wurden sensorische Analysen durchgeführt, um Zusammenhänge zwischen chemischen und sensorischen Eigenschaften festzustellen. Darüber hinaus wurden den Karotten zunehmende Mengen an 6-Methoxymellein zugesetzt und diese anschließend sensorisch bewertet. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die verletzten Karotten Substanzen produziert hatten, die die Wahrnehmung von Bitter- und Sauergeschmack verstärkten. In ihnen wurden größere Mengen an 6-Methoxymellein und phenolischen Verbindungen gefunden. Zusätzlich wurden sie als weniger süß und stärker bitter als die unverletzten Karotten bewertet. Unerwünschte sensorische Eigenschaften wurden dem Vorhandensein von 6-Methoxymellein und hohen Gehalten an phenolischen Verbindungen zugeschrieben, wie sie in den in verletzten Karotten gefunden worden waren. Die Wahrnehmung von Bitter- und Sauergeschmack nahm mit den Gehalten an phenolischen Verbindungen und 6-Methoxymellein zu, während der Süßgeschmack abnahm. Weiterhin konnten die Autoren keine Korrelation zwischen Süßgeschmack und hohen Zuckergehalten finden. Die Wahrnehmung des

Süßgeschmacks korrelierte vielmehr negativ mit hohen Konzentrationen an phenolischen Verbindungen und 6-Methoxymellein. Die Zugabe von 6-Methoxymellein zu Karotten beeinflusste ebenfalls den Süß-, Bitter- und Sauergeschmack. Mit zunehmender Zugabe nahm der Süßgeschmack ab, während Bitterkeit und Sauergeschmack zunahmen. Desweiteren gaben die Autoren die Geschmacksschwelle des 6-Methoxymelleins mit 94 mg/kg an und bestimmten einen Wert für die „gerade erkennbare Unterscheidung“ zweier 6-Methoxymelleinkonzentrationen in Karotten von 48-71 mg/kg.

Nach Zugabe von phenolischen Säuren zu verarbeiteten, pürierten Karotten und sensorischer Prüfung stellten *Talcott et al.* (2001) fest, dass diese Verbindungen dem Brei einen sauren, aber keinen bitteren Geschmack verliehen. Darüber hinaus berichteten sie über einen negativen Einfluss von löslichen phenolischen Verbindungen auf den Süßgeschmack sowie über eine direkte Verknüpfung des 6-Methoxymelleingehaltes mit der Bitterkeit.

Seljasen et al. (2000) untersuchten den Einfluss von Ethylen auf die sensorische Qualität von Karotten und deren Gehalte an Terpenen, 6-Methoxymellein und Zuckern. Im Vergleich zum Kontrollexperiment (Luftatmosphäre) führte eine Ethylenbehandlung von Karotten zu einem Anstieg des 6-Methoxymelleingehaltes und zur Inversion der Saccharose zu Glucose und Fructose. Zudem wurde ein verstärkter Bittergeschmack und geringerer Süßgeschmack festgestellt. Die Autoren fanden einen Zusammenhang zwischen Süßgeschmack und dem Gehalt an Saccharose, nicht aber zwischen Bittergeschmack und dem Gehalt an 6-Methoxymellein. Stattdessen beschrieben sie signifikante Korrelationen zwischen Bittergeschmack und den Gehalten der Terpene γ -Terpinen, α -Pinen, Limonen und p-Cymen. Da sie allerdings die Zunahme des Fehlgeschmacks in den mit Ethylen behandelten Karotten nicht alleine mit den Änderungen im 6-Methoxymellein- und Terpengehalt erklären konnten, folgerten sie, dass der Fehlgeschmack in luftgelagerten Karotten durch einen höheren Zuckergehalt verdeckt wird.

Seljasen et al. (2001) untersuchten sowohl die Auswirkungen von mechanischem Stress auf die Produktion von Ethylen als auch den Gehalt an

ausgewählten Inhaltsstoffen in Karotten und die Beeinflussung der sensorischen Qualität durch Veränderungen dieser Parameter. Der mechanische Stress wurde hierzu mit einer Schüttelmaschine simuliert. Die geschüttelten Karotten wiesen u.a. eine stärkere Ethylenproduktion, höhere 6-Methoxymelleingehalte und niedrigere Terpen- und Zuckergehalte als ungeschüttelte Karotten auf. Dies resultierte u.a. in einer Verstärkung des Bitter- und Terpengeschmacks sowie einer Verringerung des Sauer- und Süßgeschmacks. Die Autoren konnten zwar eine Korrelation zwischen Ethylenproduktion und 6-Methoxymelleingehalt sowie Ethylenproduktion und Bitterkeit, nicht aber zwischen 6-Methoxymelleingehalt und Bitterkeit nachweisen. Sie vermuteten somit, dass die Zunahme der Bitterkeit in den behandelten Karotten durch die Produktion weiterer Bitterstoffe verursacht wird. Da die Produktion der Substanzen Eugenin, Chlorogensäure und Isochlorogensäure ebenfalls durch Ethylen induziert wird (Coxon *et al.*, 1973; Sarkar und Phan, 1979), schlugen die Autoren diese Verbindungen als mögliche Ursache vor.

Rosenfeld *et al.* (2002) untersuchten den Einfluss der Temperatur und Bepflanzungsdichte auf die sensorische Qualität und den Gehalt an flüchtigen Terpenen in Karotten. Hierzu züchteten sie Karotten in Klimakammern bei 9, 12, 15, 18 und 21 °C und bei zwei unterschiedlichen Bepflanzungsdichten. Die Sensoriker bewerteten die Karotten, die bei der tiefsten Temperatur gewachsen waren mit der höchsten Süßintensität, obwohl der Gesamtgehalt an Zuckern mit steigender Wachstumstemperatur anstieg. Höhere Wachstumstemperaturen (18 und 21 °C) führten weiterhin zu höheren Gehalten an flüchtigen Terpenen sowie zu verstärkt wahrnehmbarem Bittergeschmack. Die Bepflanzungsdichte hatte nahezu keinen Einfluss auf die sensorische Qualität und den Terpengehalt. Die Autoren beschrieben eine Korrelation zwischen den Terpenen α -Terpinen, β -Pinen, β -Myrcen, *trans*-Caryophyllen, Farnesen und α -Humulen mit den sensorischen Deskriptionen „Terpenflavour“, „grüner Flavour“, „erdiger Flavour“, „Bittergeschmack“ und „Nachgeschmack“. Daraus folgerten sie, dass diese Terpene am Bittergeschmack von Karotten beteiligt sind.

Die Literaturübersicht zeigt, dass in den letzten 50 Jahren eine Reihe an Untersuchungen zur Klärung des Bittergeschmacks von Karotten durchgeführt worden sind. Gesicherte Kenntnisse über die Beteiligung einzelner Inhaltsstoffe am Bittergeschmack liegen bislang jedoch nicht vor. Es ist demnach noch völlig offen, welche Geschmacksstoffe ursächlich zum bitteren Fehlgeschmack von Karotten bzw. Karottenprodukten beitragen.

1.3 Methoden zur Bewertung geschmacksaktiver Verbindungen

1.3.1 Das Geschmackswert-Konzept

Das Geschmackswert-Konzept stellt ein objektives Auswahlverfahren dar, anhand dessen die geschmacksaktiven Inhaltsstoffe eines Lebensmittels von den übrigen, nicht schmeckenden Bestandteilen unterschieden werden können. Da zur Bewertung von Geschmacksstoffen in Lebensmitteln sowohl die Geschmacksschwelle als auch die vorhandene Menge der Verbindung außerordentlich wichtig sind, basiert das Konzept auf analytisch ermittelte und auf sensorisch bestimmte Daten. Der hierbei von *Warmke et al.* (1996) eingeführte Geschmackswert ist analog des Aromawertes (*Rothe und Thomas*, 1963) als der Quotient aus der Konzentration eines Stoffes und seines Schwellenwertes definiert:

$$\text{Geschmackswert} = \frac{\text{Konzentration [mg/kg]}}{\text{Geschmacksschwelle [mg/kg]}}$$

Der Geschmackswert gibt an, um das Wievielfache ein Geschmacksstoff über seinem Schwellenwert vorliegt. Somit stellt er ein Maß für die Geschmacksintensität einer Verbindung dar und lässt folglich eine Abschätzung des Beitrags einer Verbindung zum Geschmack des Lebensmittels zu.

Der tatsächliche Beitrag hängt jedoch noch von weiteren Faktoren ab. So erfolgt die Bestimmung der Geschmacksschwellenkonzentration in der Regel in Wasser und nicht in der betreffenden Lebensmittelmatrix. Im Lebensmittel enthaltene Inhaltsstoffe wie z. B. Proteine, Kohlenhydrate und Lipide können mit den Geschmacksstoffen in Wechselwirkung treten und somit den Schwellenwert eines Geschmacksstoffes beeinflussen. Auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Geschmacksqualität von Säuren und Salzen ist nicht zu vernachlässigen (*Bartoshuk et al.*, 1980, *Warendorf et al.*, 1992).

Dennoch stellt das Konzept zum Vergleich der Geschmacksintensitäten von Lebensmittelinhaltsstoffen ein effektives Instrument dar. So wurden z.B. durch Anwendung des Geschmackswert-Konzeptes die Geschmacksintensitätswerte von Aminosäuren, organischen Säuren, Salzen und Nucleotiden in Emmentaler Käse (*Warmke et al.*, 1996) sowie in Rinderbratensaft (*Schlichterle-Cerny et al.*, 1998) erfolgreich bestimmt.

Das Geschmackswert-Konzept eignet sich naturgemäß jedoch nur zur Bewertung von Substanzen, deren Geschmackseigenschaften und chemische Strukturen bereits bekannt sind. Zum Aufspüren bislang unbekannter geschmacksaktiver Inhaltsstoffe müssen komplex zusammengesetzte Lebensmittel erst aktivitätsorientiert fraktioniert werden.

1.3.2 Die Geschmacksverdünnungsanalyse

Als eine einfache und objektive Methode, um die sensorischen Eigenschaften komplex zusammengesetzter Lebensmittel wie z.B. Gewürze und Kaffee zu charakterisieren, beschrieb *Tilgner* (1962) das Verfahren der Verdünnungsprofil-Analyse. Das Verdünnungsprofil ermöglicht die Erfassung der verschiedenen Geschmacks- und Aromanoten, die in einem Lebensmittel nebeneinander vorliegen, aber nur bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen getrennt wahrnehmbar sind. Zur Ermittlung des Verdünnungsprofils wird das gesamte Lebensmittel in gleichmäßigen Schritten solange verdünnt, bis kein Aroma oder Geschmack mehr wahrnehmbar ist. Die Verdünnung, bei der gerade noch ein

bestimmter Geruchs- bzw. Geschmackseindruck sensorisch erkannt wird, ist der sog. Verdünnungsindex dieser Aroma- bzw. Geschmacksnote.

Eine Fortentwicklung stellt die von *Hofmann et al.* (2001) entwickelte Geschmacksverdünnungsanalyse, ein Screeningverfahren zur Beurteilung komplexer Mischungen aus bis dato unbekanntem geschmacksaktiven und geschmacksinaktiven Verbindungen in Bezug auf deren Geschmacksintensitäten, dar. Um die geschmacksaktiven Substanzen eines Lebensmittels in ihren relativen Geschmacksintensitäten zu gewichten, wird zunächst ein Extrakt hergestellt und dieser anschließend chromatographisch in einzelne Fraktionen getrennt. Diese Fraktionen werden dann vom Lösungsmittel befreit, in einer definierten Menge Wasser aufgenommen und solange schrittweise im Verhältnis 1:2 mit Wasser verdünnt, bis eine bestimmte Geschmackseigenschaft im Triangeltest im Vergleich zu zwei Wasserproben gerade noch wahrgenommen werden kann. Diese Verdünnungsstufe wird als Taste Dilution (TD-) Faktor definiert. Da dieser TD-Faktor definitionsgemäß der Geschmacksschwelle der jeweiligen Substanz in Wasser entspricht, besitzt eine geschmacksaktive Fraktion einen TD-Faktor von ≥ 1 . Anhand der TD-Faktoren ist daher eine vergleichende Bewertung der Geschmacksintensitäten der einzelnen Fraktionen innerhalb des Extraktes möglich. Dadurch können anschließende Identifizierungsexperimente auf diejenigen Substanzen fokussiert werden, die den größten Beitrag zum Geschmack der entsprechenden Mischung liefern.

Mit dieser Methode gelang es, bisher unbekannte geschmacksaktive Verbindungen aus komplexen Mischungen von Substanzen zu identifizieren, die bei der Verarbeitung und Zubereitung von Lebensmitteln entstehen. Beispiele hierfür sind etwa die intensiv bittere Verbindung [E]-2-[(2-Furyl)methyliden]-7-[(2-furyl)-methyl]-3,8-bis(hydroxymethyl)-1-oxo-1*H*,2*H*,3*H*-indolizinium-6-olat (*Frank et al.*, 2003) oder die kühlenden Verbindungen 5-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)- und 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (*Ottinger et al.*, 2001) (**Abbildung 2**).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit zunächst die Identifizierung und Quantifizierung der maßgeblich am Bittergeschmack von Karotten beteiligten Verbindungen. Hierzu sollen zuerst die Bitterstoffe durch Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität aus bitteren Karotten sowie aus handelsüblichem Karottenbrei extrahiert werden. Um die Identifizierungsarbeiten auf Verbindungen mit hoher Bitterkeit zu fokussieren, sollen durch Anwendung des Geschmacksaktivitätskonzepts diese Extrakte anschließend in deren relativen Bitterintensität gewichtet werden. Die mit hohen Bitteraktivitäten bewerteten Fraktionen werden dann für die Identifizierungsexperimente herangezogen. Dazu sollen diese zunächst chromatographisch getrennt und die erhaltenen Fraktionen durch die Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse in deren Bitterkeit gewichtet werden. Nach chromatographischer Reinigung sollen die Strukturen einiger bitterer Indikatorverbindungen mittels MS- und NMR-Experimenten eindeutig geklärt werden.

Nach der Charakterisierung der am Bittergeschmack von Karotten maßgeblich beteiligten Verbindungen sollen diese in authentischen Proben quantitativ erfasst werden. Hierzu soll eine quantitative Schnellmethode zur sicheren Qualitätsbewertung von Karotten und Karottenprodukten entwickelt werden. Mit dem Quantifizierungsverfahren sollen dann Erkenntnisse zum Einfluss der Karottensorte sowie der technologischen Verarbeitung auf die Gehalte der Bitterstoffe erarbeitet werden.

2 Ergebnisse

2.1 Aktivitätsorientierte Fraktionierung von Karotten und Karottenprodukten und Identifizierung von Bitterstoffen

Zur aktivitätsorientierten Fraktionierung wurden sowohl handelsübliche frische Karotten als auch Karottenbrei herangezogen, der von Verbrauchern aufgrund intensiver Bitterkeit reklamiert worden war. Zudem wurden frische Karotten an der Oberfläche angeritzt und kühl gelagert, wobei sich im Laufe der Lagerung ein bitterer Fehlgeschmack entwickelte. Zur Isolierung von Bitterstoffen wurden diese sog. "bitterinduzierten" Karotten (BIK), die frischen Karotten (FK) sowie der Karottenbrei (KB) zunächst jeweils sequentiell mit Hexan, Ethanol und Wasser extrahiert. Durch diese aufeinander folgende Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität wurde eine erste Fraktionierung der Bitterstoffe nach deren Hydrophobität erreicht. Die erhaltenen Extrakte wurden anschließend vom Lösungsmittel befreit und die Extraktionsausbeuten durch Auswiegen der Rückstände bestimmt (**Tabelle 2**).

Tabelle 2 Ausbeuten der Lösungsmittlextrakte aus frischen Karotten (FK), bitterinduzierten Karotten (BIK) und Karottenbrei (KB)

| Extrakte | Ausbeute (g/kg) in | | |
|----------------|--------------------|------------------|-------|
| | FK | BIK ^a | KB |
| Hexanextrakt | 0,33 | 0,37 | 0,90 |
| Ethanolextrakt | 80,86 | 60,82 | 9,16 |
| Wasserextrakt | 13,39 | 11,41 | 74,83 |

^a frische Karotten wurden mit einem Messer an der Oberfläche mehrfach über Kreuz angeritzt und anschließend 5 Tage bei 3 °C gelagert

Zur Bewertung der Intensität des Bittergeschmacks sollten für die einzelnen Extrakte Geschmacksaktivitätswerte für den Bittergeschmack, sog. Bitteraktivitätswerte, aus dem Quotient der Ausbeute und des Bittergeschmack-

schwollenwertes bestimmt werden. Hierzu wurden für die Lösungsmittelextrakte zunächst die Schwellenwerte mittels Reihentest sensorisch ermittelt und anschließend die Bitteraktivitäten berechnet (**Tabelle 3**).

Tabelle 3 Schwellenwert und Bitteraktivitätswert der Extrakte aus frischen bzw. bitterinduzierten Karotten und Karottenbrei

| | Konzentration [g/kg] | Schwellenwert [g/kg] | Bitteraktivitäts- wert ^a |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| FrISCHE KarOTTen | | | |
| Hexanextrakt | 3,3 | 2,1 | 1,6 |
| Ethanolextrakt | 808,6 | 180,1 | 4,5 |
| Wasserextrakt | 133,9 | 72,4 | 1,8 |
| Bitterinduzierte KarOTTen | | | |
| Hexanextrakt | 3,7 | 1,1 | 3,4 |
| Ethanolextrakt | 608,2 | 70,9 | 8,6 |
| Wasserextrakt | 114,1 | 46,3 | 2,5 |
| KarOTTenbrei | | | |
| Hexanextrakt | 9,0 | 0,8 | 11,3 |
| Ethanolextrakt | 91,6 | 4,5 | 20,4 |
| Wasserextrakt | 748,3 | 83,3 | 9,0 |

^a Der Bitteraktivitätswert berechnet sich aus dem Quotienten der Konzentration und des Schwellenwerts einer Fraktion

Die Ergebnisse in **Tabelle 3** zeigen, dass in den frischen Karotten der Hexanextrakt mit 2,1 g/kg den deutlich niedrigsten Bitterschwellenwert aufwies. Dieser lag um Faktor 85 unterhalb des Schwellenwertes des Ethanolextraktes. Aufgrund der geringen Konzentration der hexanlöslichen Anteile der Karotte (3,3 g/kg) lag die Bitteraktivität des Ethanolextraktes mit einem Wert von 4,5 jedoch um Faktor 2,8 über der Bitteraktivität des Hexanextraktes. Die Bitterkeit des Wasserextraktes war mit einem Wert von 1,8 mit der des Hexanextraktes vergleichbar.

Auch für die bitterinduzierten Karotten wies der Hexanextrakt mit einem Wert von 1,1 g/kg im Vergleich zum Ethanol- und dem Wasserextrakt den mit

Abstand geringsten Schwellenwert auf (**Tabelle 3**). Jedoch lag der hexanlösliche Anteil mit einer Konzentration von 3,7 g/kg um den Faktor 164 bzw. 31 unterhalb der Konzentrationen des Ethanol- bzw. Wassereextraktes. Somit war die größte Bitteraktivität auch in den bitterinduzierten Karotten im Ethanolextrakt lokalisiert. Es folgten der Hexanextrakt und der Wassereextrakt mit vergleichbaren Bitteraktivitäten von 3,4 und 2,5.

Die gleiche Beobachtung konnte auch beim Karottenbrei gemacht werden. Auch hier wies der Ethanolextrakt mit einem Wert von 20,4 eine um etwa Faktor 2 höhere Bitteraktivität als der Hexan- bzw. Wassereextrakt auf.

Ein Vergleich der Bitteraktivitätswerte der aus frischen Karotten gewonnenen Extrakte mit den bitterinduzierten Karotten zeigte eine Intensivierung der Bitteraktivitäten der drei Extrakte um Faktor 2. So wies z.B. der Ethanolextrakt aus frischen Karotten eine Bitteraktivität von 4,5, der Ethanolextrakt der bitterinduzierten Karotten dagegen eine Bitteraktivität von 8,6 auf. Durch Anritzen der Karottenschale und anschließende kühle Lagerung war es somit möglich, die Bildung von Bitterstoffen zu induzieren. Für die aus bitter schmeckendem Karottenbrei isolierten Extrakte wurden etwa um Faktor 3 höhere Bitteraktivitätswerte bestimmt als für die bitterinduzierten Karotten. Hier lag beispielsweise der entsprechende Ethanolextrakt mit einem Faktor von 20,4 oberhalb der Geschmacksschwelle vor.

Zur Lokalisierung der Bitterstoffe sollten in den folgenden Untersuchungen nun die Lösungsmittelextrakte weiter aufgetrennt werden. Da der Wassereextrakt in der Regel die niedrigsten Bitteraktivitäten aufwies, wurden die folgenden Fraktionierungen auf die Hexan- und Ethanolextrakte fokussiert.

2.1.1 Analyse der Hexanextrakte

Obwohl die Ethanolextrakte grundsätzlich die höchsten Bitteraktivitäten besaßen, wurden zunächst die Hexanextrakte näher untersucht, da in diesen Extrakten die in der Literatur beschriebene, lipophile Verbindung 6-Methoxymellein vermutet wurde. Aufgrund der widersprüchlichen Literaturaussagen zur

Bedeutung dieser Verbindung als Ursache des bitteren Fehlgeschmacks von Karotten, sollte zunächst deren Beitrag zur Gesamtbitterkeit der Karotten evaluiert werden.

2.1.1.1 Bitterstoff-Screening mittels Gelpermeationschromatographie/Geschmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA)

Zur Abtrennung der Carotinoide sowie zur Auftrennung der Bitterstoffe wurden die bitter schmeckenden Hexanextrakte mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 mit Ethanol als Eluent getrennt. Wie in **Abbildung 3** am Beispiel der bitterinduzierten Karotten dargestellt, wurde das Eluat in 10 Fraktionen (H-I bis H-X) gesammelt, das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und anschließend die Rückstände jeweils in einer definierten Menge Wasser aufgenommen.

Um die Identifizierungsarbeiten auf die Verbindungen mit hoher Bitterkeit zu fokussieren, wurden in einem Screening-Verfahren diese wässrigen Lösungen der GPC-Fraktionen durch eine Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) in deren relativen Bitterintensitäten gewichtet. Dazu wurden die Fraktionen schrittweise mit Wasser im Verhältnis 1:2 soweit verdünnt, bis ein Bittergeschmack im Vergleich zu einem Blindwert (Wasser) im Triangeltest gerade noch festgestellt werden konnte, d.h. der Bitterschwellenwert erreicht war. Die Größe dieser Verdünnungsfaktoren, der sogenannten TD (Taste Dilution)-Faktoren, stellt somit ein relatives Maß für die Bitterintensität der einzelnen Fraktionen dar und ermöglicht damit den Vergleich der relativen Bitterintensitäten der einzelnen Fraktionen (*Hofmann, 1998*).

Die GPC/GVA des Hexanextraktes der bitterinduzierten Karotten zeigte, dass die Bitterkeit dieses Extraktes in den drei Fraktionen H-V, H-VI und H-VIII lokalisiert war (**Abbildung 3**). Die Hauptbitterkeit verteilte sich dabei auf die Fraktionen H-VI und H-VIII, die jeweils mit einem TD-Faktor von 4 als bitter

bewertet wurden. Die Fraktion H-V lag dagegen mit einem TD-Faktor von nur 1 gerade an der Geschmacksschwelle vor.

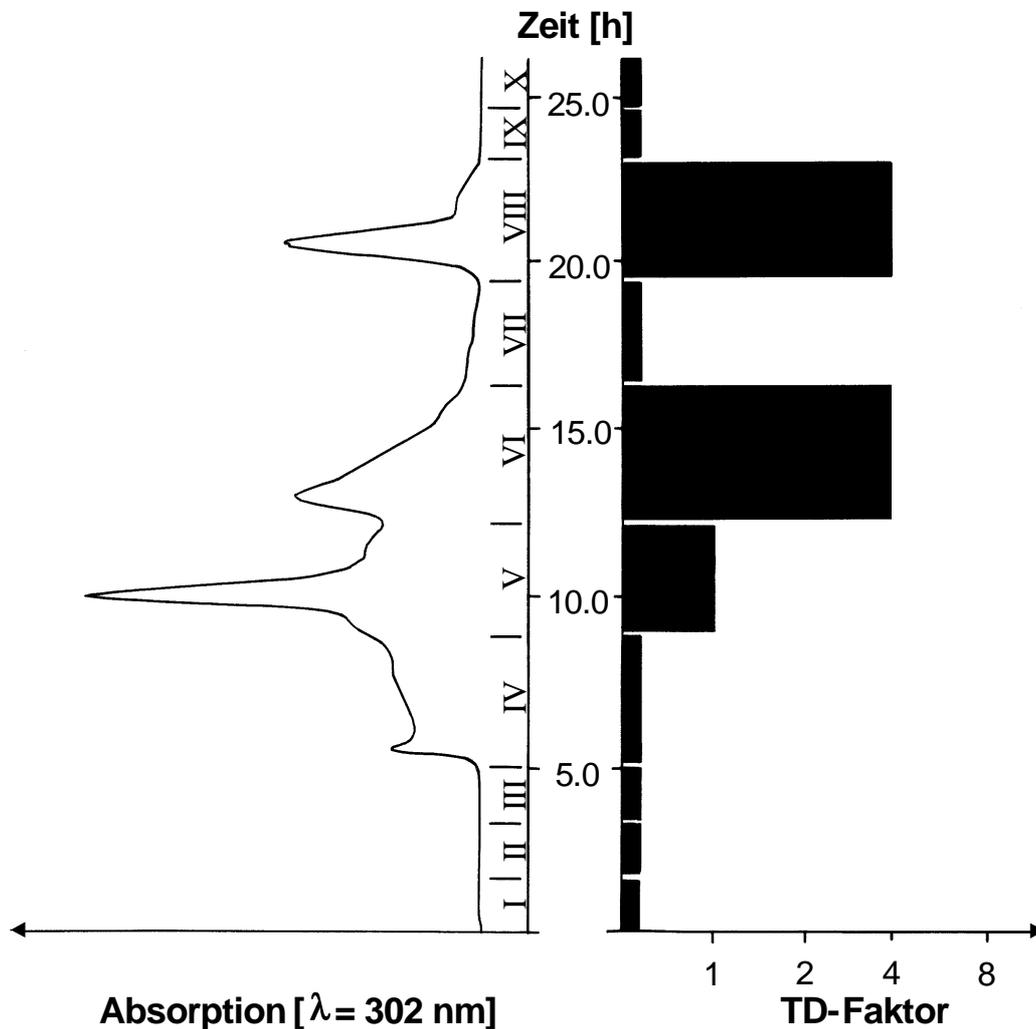


Abbildung 3 GPC/GVA des Hexanextraktes der bitterinduzierten Karotten (*BIK*). GPC-Chromatogramm (links), TD-Chromatogramm (rechts)

Im Hexanextrakt der frischen Karotten konnte durch Anwendung der GPC/GVA nur die Fraktion H-VI als bitter bewertet werden. Für diese wurde mit Hilfe der Verdünnungsanalyse ein TD-Faktor von 4 ermittelt (**Tabelle 4**). Die TD-Faktoren aller übrigen Fraktionen lagen unterhalb der Geschmacksdetektionsschwellen vor.

Die Untersuchung des Hexanextraktes des Karottenbreis mit Hilfe der GPC/GVA ergab, dass sich die Bitterkeit dieses Extraktes auf zwei Fraktionen verteilte. Die Hauptbitterkeit war hierbei in der Fraktion H-VI lokalisiert, die mit einem TD-Faktor von 4 als bitter bewertet wurde (**Tabelle 4**). Daneben wurde noch ein Bittergeschmack in der Fraktion H-V sensorisch nachgewiesen. Allerdings wurde diese Fraktion nur mit einem TD-Faktor von 1 als bitter bewertet (**Tabelle 4**).

Tabelle 4 GPC/Geschmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA) der Hexanextrakte von frischen Karotten (*FK*), bitterinduzierten Karotten (*BIK*) und Karottenbrei (*KB*)

| Fraktion | TD-Faktor (<i>Geschmacksqualität</i>) | | |
|----------|---|--------------------------|--------------------------|
| | <i>FK</i> | <i>BIK</i> | <i>KB</i> |
| H-I | <1 | <1 | <1 |
| H-II | <1 | <1 | <1 |
| H-III | <1 | <1 | <1 |
| H-IV | <1 | <1 | <1 |
| H-V | <1 | 1 (<i>bitter</i>) | 1 (<i>bitter</i>) |
| H-VI | 4 (<i>bitter</i>) | 4 (<i>bitter</i>) | 4 (<i>bitter</i>) |
| H-VII | <1 | <1 | <1 |
| H-VIII | <1 | 4 (<i>bitter</i>) | <1 |
| H-IX | <1 | <1 | <1 |
| H-X | <1 | <1 | <1 |
| H-XI | <1 | <1 | <1 |

Beim Vergleich der GPC/GVA der Hexanextrakte aus den einzelnen Probenmaterialien fällt auf, dass der Extrakt aus den bitterinduzierten Karotten drei bittere Fraktionen, der Extrakt aus dem Karottenbrei zwei bittere Fraktionen und der Extrakt aus den frischen Karotten nur eine bittere Fraktion enthielt. Sowohl im Hexanextrakt der bitterinduzierten Karotten als auch im Hexanextrakt des Karottenbreis wurde jeweils die Fraktion H-V mit einem TD-Faktor von 1 als leicht bitter bewertet. Weiterhin wies in den Extrakten aller drei Proben-

materialien jeweils die Fraktion H-VI einen bitteren Geschmack auf, der in allen Extrakten mit einem TD-Faktor von 4 bewertet wurde.

Zusätzlich dazu enthielt der Hexanextrakt der bitterinduzierten Karotten noch die bittere Fraktion H-VIII, die bei der GVA einen TD-Faktor von 4 erreichte. Da diese Fraktion nur im Extrakt der bitterinduzierten Karotten einen Bittergeschmack aufwies, müssen die dort enthaltenen Verbindungen während der Lagerung der angeritzten Karotten entstanden sein. Um welche Verbindungen es sich hierbei handelt, sollte im nächsten Schritt geklärt werden.

2.1.1.2 Identifizierung von Bitterstoffen in der GPC-Fraktion H-VIII

HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA)

Zur Lokalisierung der in Fraktion H-VIII enthaltenen bitteren Verbindungen wurde zunächst eine HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse durchgeführt. Dazu wurde die aus den bitterinduzierten Karotten isolierte Fraktion mittels RP-HPLC aufgetrennt (**Abbildung 4**), das Eluat in einzelnen Fraktionen aufgefangen und diese Fraktionen stufenweise im Verhältnis 1:2 mit Wasser bis zum Erreichen der Geschmacksdetektionsschwelle verdünnt. Der dabei bestimmte TD-Faktor ermöglicht eine Gewichtung der Fraktionen in deren relativen Geschmacksintensitäten und lässt somit einen Vergleich der Bitterkeiten innerhalb der gesammelten Fraktionen zu (**Abbildung 4**).

Von acht untersuchten Fraktionen wiesen lediglich die beiden Fraktionen H-VIII/5 und H-VIII/6 bitteren Geschmack auf. Der hohe TD-Faktor der Fraktion H-VIII/5 ließ den Schluss zu, dass diese Fraktion ursächlich am Bittergeschmack der Gelfraktion H-VIII beteiligt ist. Fraktion H-VIII/6 dürfte aufgrund des um Faktor 16 geringeren TD-Faktors hingegen kaum signifikanten Beitrag zum Bittergeschmack leisten.

Im Folgenden sollte nun die Identität der bitteren Verbindungen in den Fraktionen H-VIII/5 und H-VIII/6 geklärt werden.

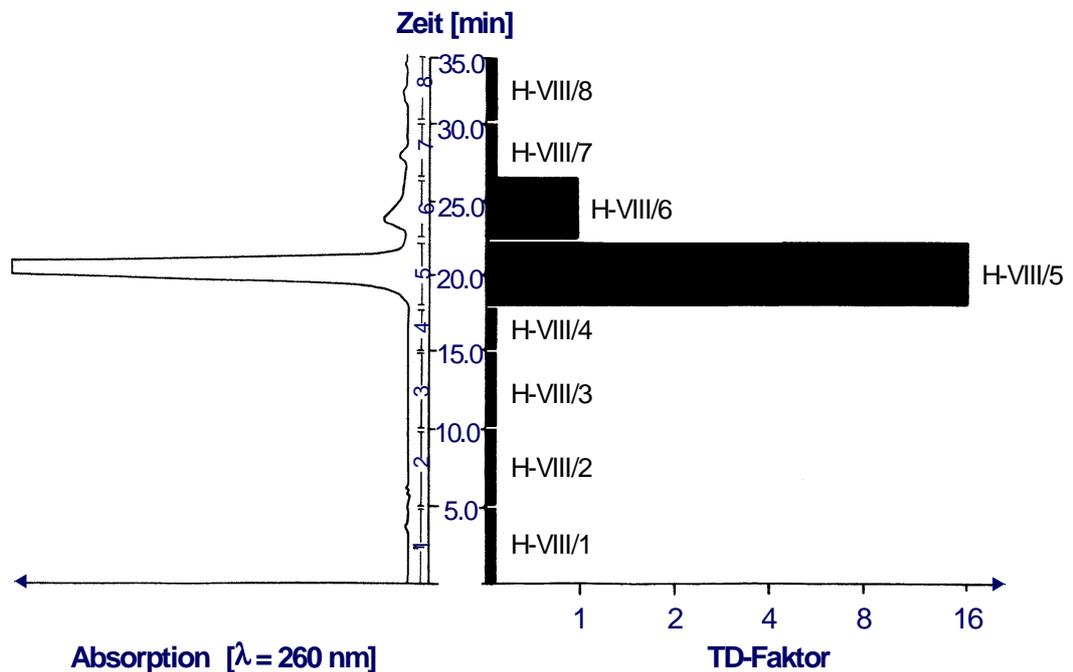


Abbildung 4 HPLC/GVA der Fraktion H-VIII aus bitterinduzierten Karotten

Identifizierung von Bitterstoffen

Zur Identifizierung der bitteren Verbindung in Fraktion H-VIII/5 wurde diese durch präparative Dünnschichtchromatographie aufgereinigt und dadurch eine weisse, kristalline Substanz erhalten. Zur Strukturidentifizierung wurden GC/MS- sowie NMR-Experimente durchgeführt.

Das GC/MS(EI)-Spektrum dieser Verbindung zeigte einen Molekülpeak bei 208 Da und einen Basispeak bei 164 Da (**Abbildung 5**). Die Integration der Protonensignale des ^1H -NMR-Spektrums (**Abbildung 6**) lieferte 12 Wasserstoffatome und das ^{13}C -NMR-Spektrum (**Abbildung 7**) ließ auf 11 Kohlenstoffatome schließen.

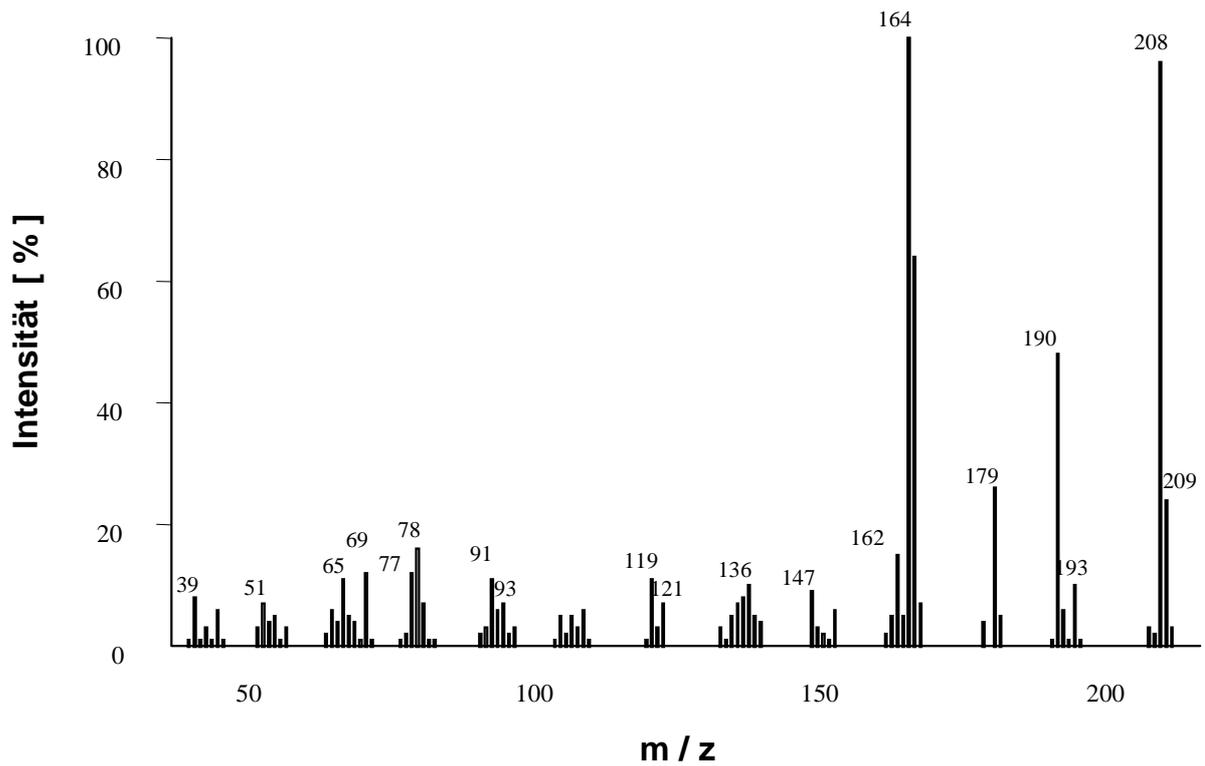


Abbildung 5 Massenspektrum (EI) der aus Fraktion H-VIII/5 isolierten bitteren Verbindung

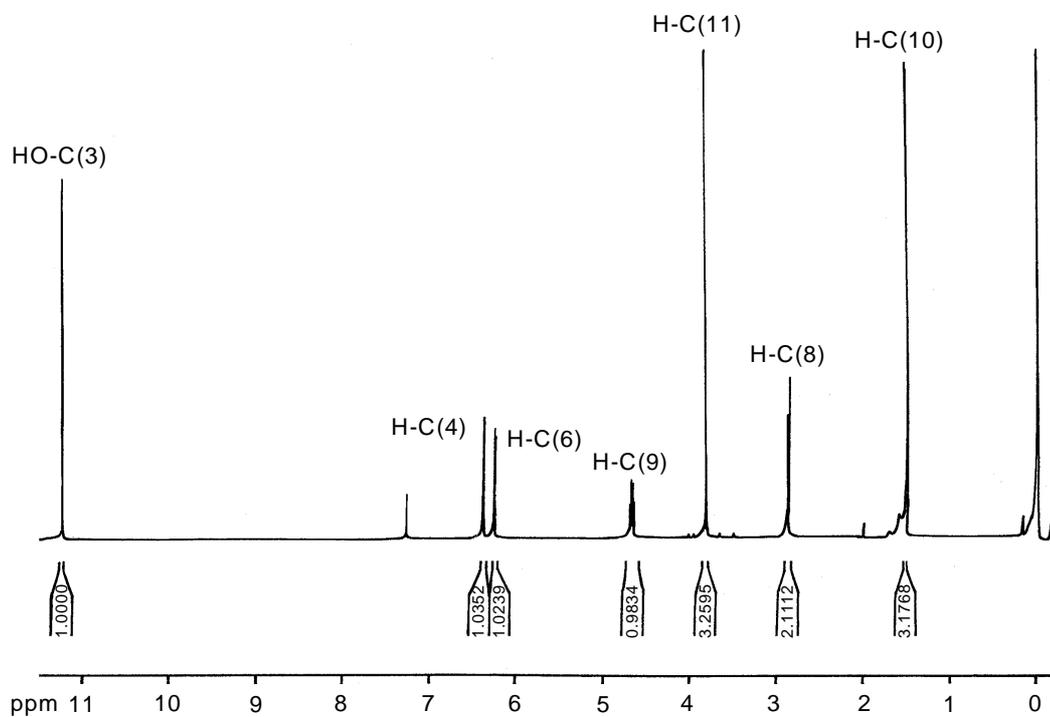


Abbildung 6 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (360 MHz, CDCl_3) der aus Fraktion H-VIII/5 isolierten bitteren Verbindung

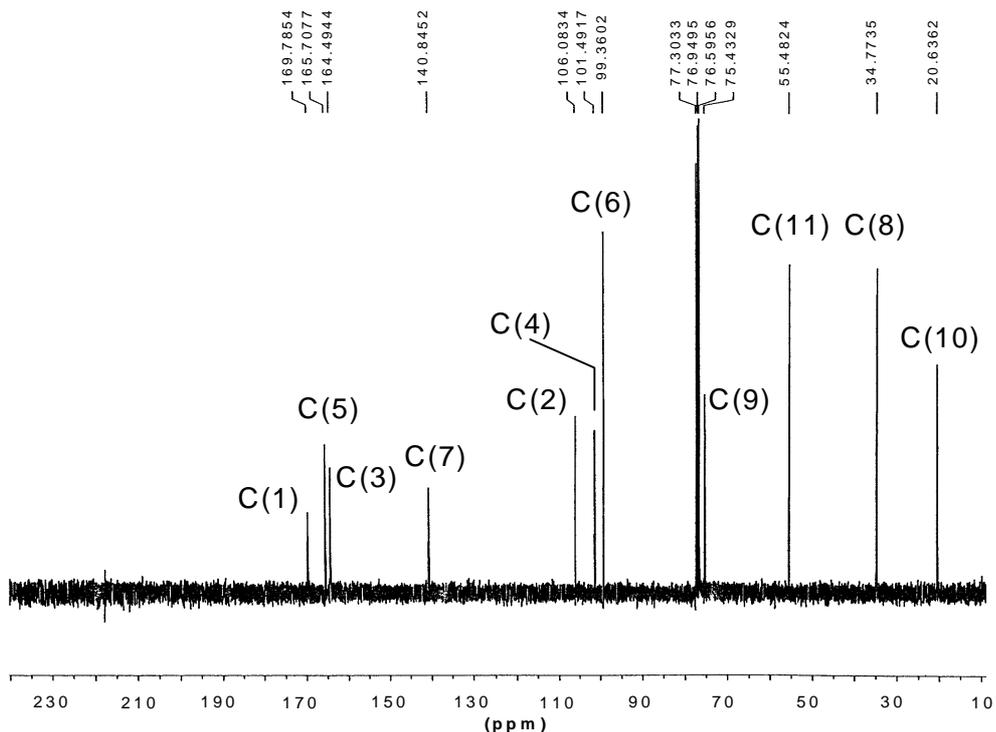


Abbildung 7 ^{13}C -NMR-Spektrum (360 MHz, CDCl_3) der aus Fraktion H-VIII/5 isolierten bitteren Verbindung

Aus den Daten der Massenspektrometrie sowie der NMR-Experimente wurde auf die Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ geschlossen. Das Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 3,85 ppm und einer Integration von drei Protonen im ^1H -NMR-Spektrum (**Abbildung 6**) wies auf eine Methoxygruppe, das Singulett bei δ 11,25 ppm und einer Integration von einem Proton auf eine Hydroxygruppe hin. Das bei δ 1,51 ppm auftretende Dublett mit einer Integration von drei Protonen ließ eine Methylgruppe mit nur einem benachbarten Wasserstoffatom, die an einem Ring gebunden vorliegt, vermuten. Die Verschiebungen zweier einzelner Protonen von δ 6,25 ppm bzw. δ 6,37 ppm wiesen auf Doppelbindungen bzw. ein aromatisches System hin. Das ^{13}C -Signal mit einer Verschiebung von 169,8 ppm ließ den Schluss auf eine Ester- bzw. Lactongruppe zu (**Abbildung 7**). Auf Basis dieser ^1H - und ^{13}C -NMR- sowie der massenspektroskopischen Daten wurde die Struktur des Bitterstoffs als das 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin, das

sogenannte 6-Methoxymellein, aufgeklärt (**Abbildung 8**). Eine daraufhin durchgeführte Literaturrecherche führte zu dem Ergebnis, dass die erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ und MS-spektroskopischen Daten mit den von *Coxon et al.* (1973) publizierten Spektren des 6-Methoxymelleins identisch waren.

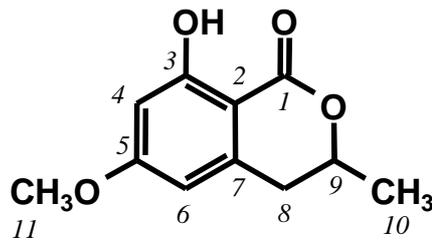


Abbildung 8 Struktur von 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin (6-Methoxymellein)

Die Hauptverbindung der bitteren GPC-Fraktion H-VIII/6 der GPC/Geschmacksverdünnungsanalyse (**Abbildung 4**) lag nach der Aufarbeitung ebenfalls als weisses Pulver vor. Das MS-Spektrum in **Abbildung 9** zeigte einen Molekülpeak bei 206 Da und die Integration der Protonensignale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums lieferte 10 Wasserstoffatome (**Abbildung 10**). Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (**Abbildung 11**) ließ auf 11 Kohlenstoffatome schließen, so dass die Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$ berechnet wurde. Diese Summenformel ließ die Struktur des Bitterstoffs 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon (Eugenin) vermuten. Ein Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ -, des $^{13}\text{C-NMR}$ - sowie des MS-Spektrums mit den von *Ali et al.* (1990) publizierten Spektren des Eugenins bestätigte die Identität der vermuteten Struktur (in **Abbildung 10** dargestellt).

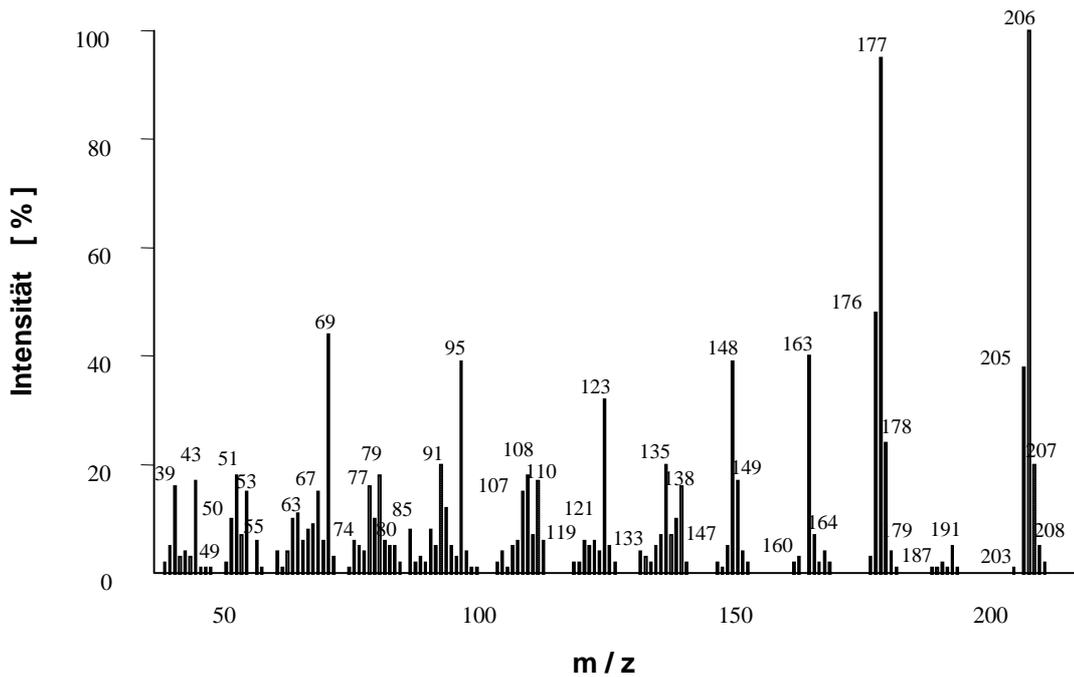


Abbildung 9 Massenspektrum (EI) der aus Fraktion H-VIII/6 isolierten bitteren Verbindung

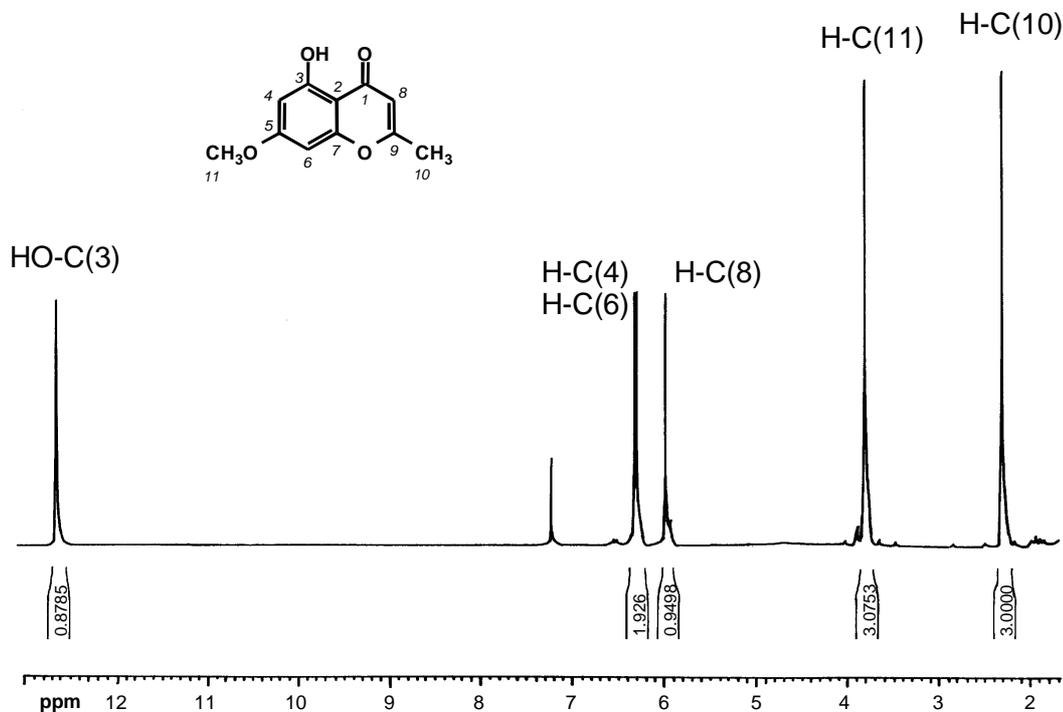


Abbildung 10 ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der aus Fraktion H-VIII/6 isolierten bitteren Verbindung und Struktur von Eugenin

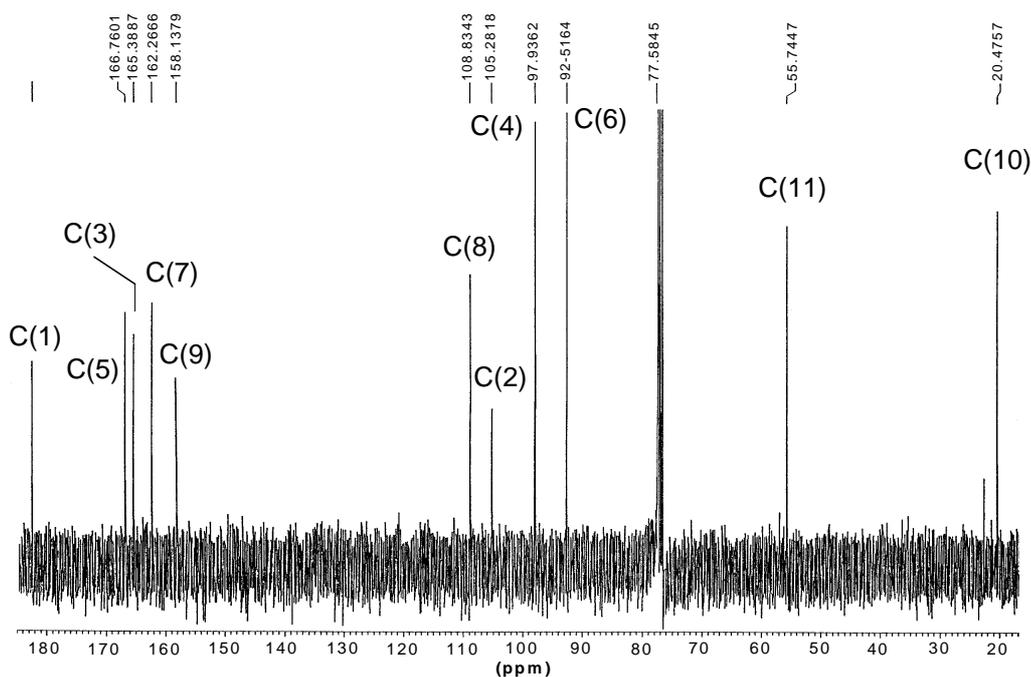


Abbildung 11 ¹³C-NMR-Spektrum (360 MHz, CDCl₃) der aus Fraktion H-VIII/6 isolierten bitteren Verbindung

Aus der Literatur (*Haddad et al. (1958), Momin und Nair (2002)*) war bekannt, dass die bittere Verbindung 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (Gazarin) mittels Hexanextraktion aus Karottensamen isoliert werden konnte. Anhand der entsprechenden Referenzsubstanz sollte geprüft werden, ob diese Verbindung auch in der Karotte selbst vorkommt und einen Beitrag zur Bitterkeit leistet. Aufgrund der apolaren Struktur und eines ähnlichen Molekulargewichtes wie 6-Methoxymellein wurde vermutet, dass sich Gazarin nach gelchromatographischer Trennung des Hexanextraktes aus Karotten ebenfalls in der GPC-Fraktion H-VIII befinden müsste. Diese Annahme konnte durch Chromatographie der Reinsubstanz an Sephadex LH-20 unter den für die Hexanextrakte verwendeten Trennbedingungen bestätigt werden. Daraufhin wurde die Substanz in die HPLC injiziert und unter identischen Bedingungen wie Fraktion H-VIII analysiert. Gazarin wies dabei eine Retentionszeit von 14 Minuten auf und müsste somit im Chromatogramm in **Abbildung 4** in Fraktion H-VIII/3 eluieren. Da diese Fraktion bei der Geschmacksverdünnungsanalyse allerdings nicht als bitter bewertet wurde, kann eine Beteiligung der Verbindung Gazarin

an der Bitterkeit von Karotten ausgeschlossen werden. Die GC/MS-Analyse der Fraktion H-VIII/3 aus bitterinduzierten Karotten bestätigte, dass das Gazarin in Karotten nur in Spurenkonzentrationen enthalten ist. **Abbildung 12** zeigt das Massenspektrum der bitteren Verbindung.

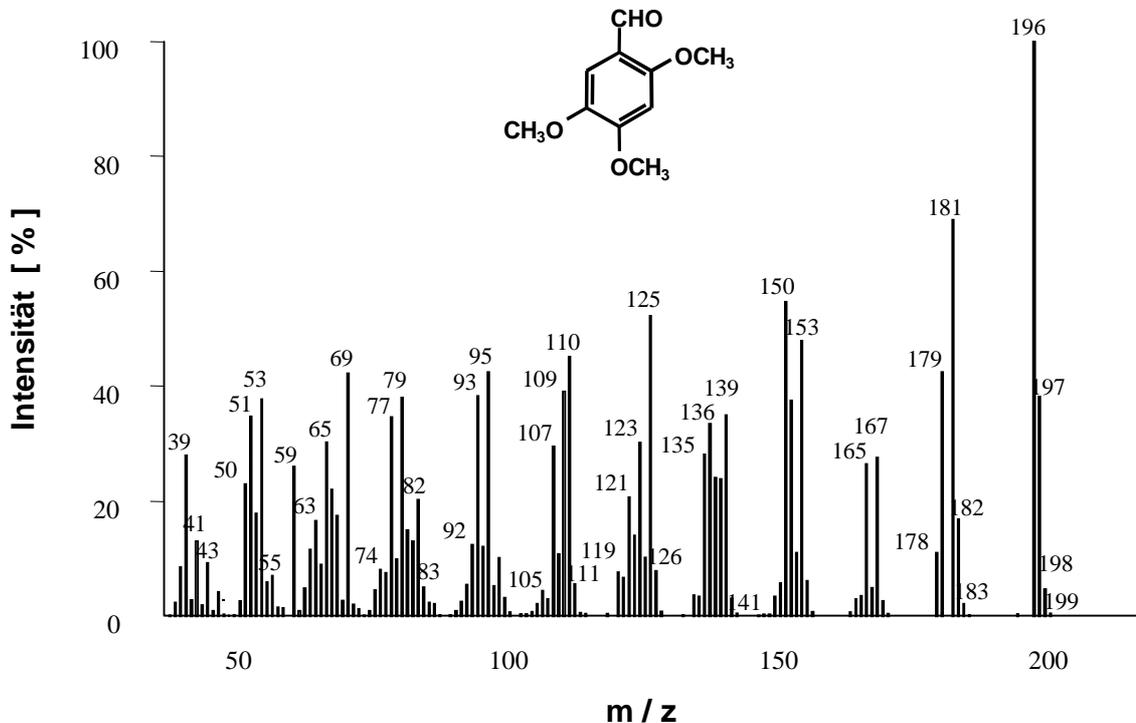


Abbildung 12 Massenspektrum (EI) und Strukturformel von 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (Gazarin)

Bestimmung von Geschmacksschwellenwerten

Nach der Identifizierung der bitteren Verbindungen in GPC-Fraktion H-VIII wurden die Geschmacksschwellen dieser Substanzen in wässriger Lösung bestimmt. Dazu wurden die Verbindungen in definierten, aufsteigenden Konzentrationen den Prüfern im Rahmen eines Triangeltests angeboten. Als Blindwerte fanden jeweils zwei Wasserproben Verwendung. Die niedrigste Geschmacksschwelle besaß dabei das 6-Methoxymellein mit einem Wert von 20 mg/kg (0,10 mmol/kg), gefolgt von der Verbindung Gazarin mit einer Schwelle von 36 mg/kg (0,18 mmol/kg). Für das Eugenin wurde ein Bitterschwellenwert von 72 mg/kg Wasser (0,35 mmol/kg) bestimmt. In **Tabelle 5**

sind die einzelnen Geschmacksschwellen zusammengefasst dargestellt. Zusätzlich ist zum Vergleich auch der Bitterschwellenwert der bitteren Standardsubstanz Coffein angegeben.

Tabelle 5 Bittergeschmacksschwellenwerte

| Substanz | Schwellenwert [mmol/kg] |
|------------------|--------------------------------|
| 6-Methoxymellein | 0,10 |
| Gazarin | 0,18 |
| Eugenin | 0,35 |
| Coffein | 0,50 |

Ein Vergleich der Schwellenwerte zeigt, dass alle drei in der Fraktion H-VIII enthaltenen Bitterstoffe eine niedrigere Geschmacksschwelle aufweisen als die bittere Standardverbindung Coffein. Selbst das Eugenin liegt mit einem Wert von 0,35 mmol/kg noch um einen Faktor von etwa 1,5 unterhalb des Bitterschwellenwertes des Coffeins.

Zur Bewertung einer bitteren Verbindung in Bezug auf ihren Beitrag zur Gesamtbitterkeit reicht die alleinige Kenntnis der Geschmacksschwelle jedoch nicht aus. Eine solche Bewertung kann nur vorgenommen werden, wenn neben dem Schwellenwert auch die Konzentration bekannt ist, in der die entsprechende Verbindung im Lebensmittel vorliegt. Aus diesem Grund wurden im Folgenden quantitative Studien durchgeführt. Da Eugenin im Vergleich zum 6-Methoxymellein bei der GPC/GVA nur einen sehr geringen TD-Faktor erreichte und eine deutlich höhere Geschmacksschwelle besaß und Gazarin in den Karotten über GC/MS nur in Spuren nachgewiesen werden konnte, wurden die folgenden Quantifizierungsexperimente auf das 6-Methoxymellein konzentriert.

2.1.1.3 Quantitative Bestimmung von 6-Methoxymellein

Um den Beitrag des 6-Methoxymelleins am Bittergeschmack der Karotten genauer zu untersuchen, wurden quantitative Studien zum Einfluss einer Lagerung von Karotten auf die sensorisch wahrnehmbare Bitterkeit sowie auf die Gehalte des Isocumarins durchgeführt. Als interner Standard für die Bestimmungen wurde die Verbindung 7-Methoxycumarin verwendet. Zur Quantifizierung fanden sowohl frische Karotten als auch bitterinduzierte Karotten, die 4, 6, 8, 10 und 12 Tage bei 3 °C gelagert wurden, sowie handelsüblicher Karottenbrei mit bitterem Fehlgeschmack Verwendung.

Zur quantitativen Bestimmung wurde das Probenmaterial zunächst mit definierten Mengen des internen Standards versetzt, mit Hexan extrahiert und die Extrakte mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Die das Methoxymellein enthaltende Fraktion H-VIII wurde aufgefangen, durch analytische HPLC getrennt und 6-Methoxymellein über das UV-Signal mit Hilfe des internen Standards quantifiziert (**Abbildung 13**).

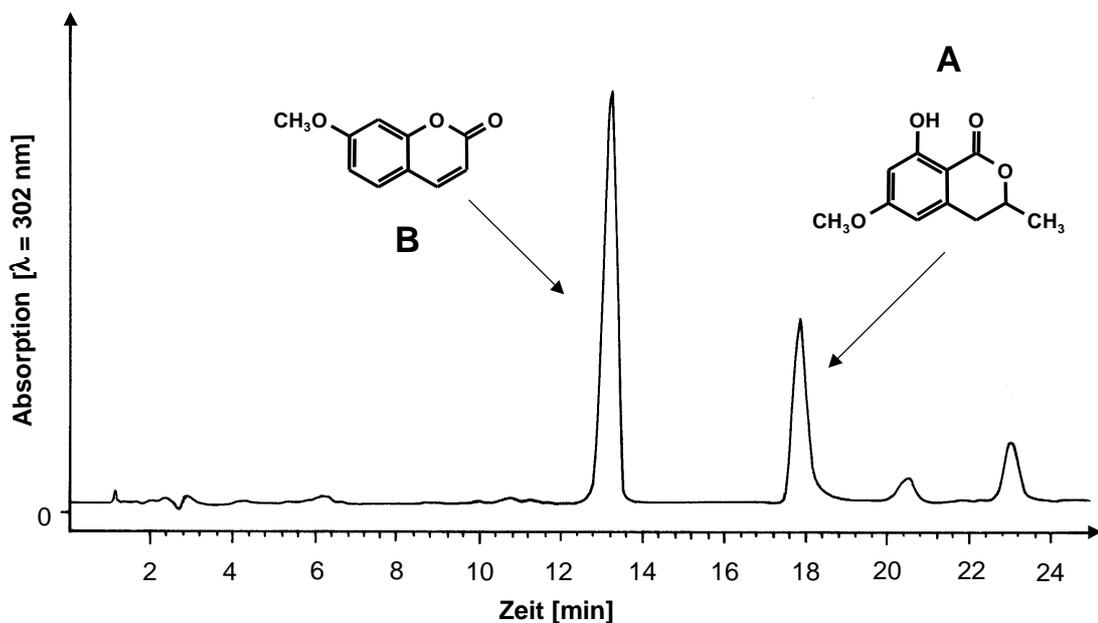


Abbildung 13 HPLC-Chromatogramm der Bestimmung von 6-Methoxymellein (Peak A) mit Hilfe des internen Standards 7-Methoxycumarin (Peak B)

Anschließend wurden die erhaltenen Werte zur Gesamtbitterkeit der Karotten in Relation gesetzt. Die Ergebnisse in **Tabelle 6** zeigen, dass während der Lagerung frischer Karotten die Bitterkeit zunächst von einer Intensität von 0,5 bis zum sechsten Tag auf eine maximale Intensität von 1,5 zunahm und anschließend mit zunehmender Lagerung wieder deutlich bis auf eine Bitterintensität von 0,9 abfiel. Vergleichsweise wiesen drei Chargen von handelsüblichem Karottenbrei jedoch mit Bewertungen von 1,5, 1,8 und 2,0 deutlich stärkere Bitterkeiten als die gelagerten Karotten auf.

Die quantitativen Daten des 6-Methoxymelleins machen dagegen deutlich, dass die Bildung dieser Verbindung, ausgehend von einer Konzentration von 1,1 mg/kg im frischen Zustand, nach bereits vier Tagen ein Maximum von 7,8 mg/kg durchlief. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Karotten jedoch nur mit einer Bitterkeit von 0,9 bewertet, während nach sechs Tagen Lagerung bereits eine Bewertung von 1,5 erfolgte, obwohl die Konzentration an 6-Methoxymellein zu diesem Zeitpunkt nur noch 3,6 mg/kg, also knapp die Hälfte betrug. Somit korrelierte der Konzentrations/Zeit-Verlauf des 6-Methoxymelleins nicht mit der zeitlichen Veränderung der Gesamtbitterkeit bei der Karottenlagerung. Zudem ist aus **Tabelle 6** ersichtlich, dass der Karottenbrei 2, der auf einer Skala von 0 (nicht bitter) bis 3 (stark bitter) mit einer Bitterintensität von 1,8 die doppelte Bitterkeit aufwies als die vier Tage gelagerten Karotten, mit einem Gehalt von 0,2 mg/kg nur eine sehr geringe Menge an 6-Methoxymellein enthielt. Diese Daten machen eine Schlüsselrolle des 6-Methoxymelleins als Verursacher der Bitterkeit von Karotten und daraus hergestellter Produkte unwahrscheinlich.

Um den Beitrag des 6-Methoxymelleins zur Bitterkeit zu bestimmen, wurde diese Verbindung anschließend in deren Bitteraktivitätswert (BA-Wert) auf Basis eines Dosis/Wirkungskonzeptes gewichtet (**Tabelle 6**). Die Bestimmung dieses Wertes aus dem Quotienten der Konzentration und des Bitterschwellenwertes von 6-Methoxymellein ergab unabhängig von der Lagerungszeit der Karotten durchweg Bitteraktivitätswerte < 1 , d.h. in keiner Probe lag das 6-Methoxymellein oberhalb der Geschmacksschwellenkonzentration vor. Auch in den als sehr bitter bewerteten Karottenbreis wurden nur geringe Bitteraktivitätswerte gemessen. Trotz der hohen Bitterintensität des Breis 2 von 1,8, lag z.B. die Konzentration des 6-Methoxymelleins um Faktor 100 unterhalb der Schwellen-

wertkonzentration vor und trug somit nicht zur Bitterkeit des Karottenproduktes bei.

Tabelle 6 Gesamtbitterkeit der Karotten sowie Konzentrationen und Bitteraktivitätswerte (BA) von 6-Methoxymellein

| Probe | | Gesamtbitterkeit ^a | 6-Methoxymellein | |
|--------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------|
| | Zeit (Tage) | | Konzentration [mg/kg] | BA ^b |
| Karotten, gelagert | 0 | 0,5 | 1,1 | 0,05 |
| | 4 | 0,9 | 7,8 | 0,38 |
| | 6 | 1,5 | 3,6 | 0,18 |
| | 8 | 1,4 | 1,1 | 0,05 |
| | 10 | 1,3 | 1,4 | 0,07 |
| | 12 | 0,9 | 0,3 | 0,01 |
| Karottenbrei 1 | | 1,5 | 1,1 | 0,05 |
| Karottenbrei 2 | | 1,8 | 0,2 | 0,01 |
| Karottenbrei 3 | | 2,0 | 2,0 | 0,10 |

^a Die Gesamtbitterkeit wurde in einem Triangeltest auf einer Skala von 0 (nicht bitter) bis 3 (stark bitter) bestimmt.

^b Der Bitteraktivitätswert (BA) ist definiert als Quotient der Konzentration und des Bitterschwellenwertes einer Verbindung.

Somit konnte mit diesen systematischen Studien anhand von Dosis/Aktivitäts-Korrelationen erstmals gezeigt werden, dass das 6-Methoxymellein nicht ursächlich am Bittergeschmack von Karotten sowie Karottenprodukten beteiligt sein kann.

2.1.1.4 Diskussion

Sensorische Untersuchungen an Hexan-, Ethanol- und Wasserextrakten von frischen Karotten, bitterinduzierten Karotten und Karottenbrei ergaben, dass die Hauptbitterstoffe in diesen Probenmaterialien lipophile Eigenschaften besitzen

und somit hauptsächlich in den Hexan- und Ethanolfraktionen lokalisiert sind. Durch Bewertung des Bittergeschmacks der einzelnen Extrakte auf Basis einer Dosis/Aktivitätsbeziehung konnten die höchsten Bitteraktivitäten jeweils in den Ethanolfraktionen gefunden werden, gefolgt von den Hexan- und den Wasserextrakten. Beim Vergleich der Bitterkeiten der einzelnen Probenmaterialien untereinander erreichten die Fraktionen aus dem Karottenbrei jeweils die höchsten Bitteraktivitäten. Darauf folgten die Extrakte der bitterinduzierten Karotten. Die Extrakte der frischen Karotten wiesen jeweils die geringsten Bitteraktivitäten auf.

Durch Auftrennung der Hexanfraktionen mittels Gelpermeationschromatographie und Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse wurde die Hauptbitterkeit der Extrakte aus frischen Karotten, bitterinduzierten Karotten und Karottenbrei jeweils in der gleichen Fraktion (GPC-Fraktion H-VI) lokalisiert. Weiterhin konnte in den bitterinduzierten Karotten eine bittere Fraktion (GPC-Fraktion H-VIII) identifiziert werden, die in den frischen Karotten und im Karottenbrei nicht vorkam und deren Bitterstoffe somit während der Lagerung gebildet worden sind. Nach präparativer HPLC-Trennung gelang es, aus dieser Fraktion die Bitterstoffe 6-Methoxymellein und Eugenin zu isolieren und zu identifizieren. Die Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse ergab für die Verbindung Eugenin einen um den Faktor 16 geringeren TD-Faktor als für das 6-Methoxymellein. Müller (1978) berichtete über semi-quantitative Studien von phenolischen Verbindungen in Karotten und beobachtete, dass in Karotten mit Bittergeschmack stets Eugenin nachgewiesen werden konnte. Aufgrund des sehr geringen TD-Faktors dieser Verbindung bei der HPLC/GVA konnte eine Schlüsselrolle dieser Substanz am Bittergeschmack von Karotten jedoch ausgeschlossen werden.

Zur Bewertung des Beitrags des 6-Methoxymelleins zur Gesamtbitterkeit wurden quantitative Studien zur Bildung dieser Verbindung in Form eines Lagerungsversuches durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten zunächst einen Anstieg der 6-Methoxymelleinkonzentration zu Beginn der Lagerung und einen Rückgang des Gehaltes mit zunehmender Lagerungszeit. Dieser erst ansteigende und dann wieder abfallende Kurvenverlauf der 6-Methoxymellein-

Konzentration während der Lagerung wurde auch bereits von *Müller* (1978), *Kurosaki et al.* (1983) und *Marinelli et al.* (1994) beobachtet. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem 6-Methoxymelleingehalt und der sensorisch bestimmten Gesamtbitterkeit in Karotten und Karottenprodukten gefunden werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von *Müller* (1978), *Yoshino* (1993) und *Seljasen et al.* (2000) durchgeführten Untersuchungen, widerspricht allerdings den Erkenntnissen von *Sondheimer* (1956), *Talcott und Howard* (1999) und *Talcott et al.* (2001), die der 6-Methoxymellein-Konzentration einen direkten Einfluss auf die Gesamtbitterkeit zuschreiben.

Um zu untersuchen, ob das 6-Methoxymellein überhaupt einen Beitrag zur Bitterkeit leisten kann, wurde anschließend der Bitterschwellenwert der Verbindung in wässriger Lösung mittels Triangeltest bestimmt. Dabei ergab sich ein Wert von 20 mg/kg Wasser (0,1 mmol/kg). Dieser für 6-Methoxymellein ermittelte Schwellenwert liegt deutlich unterhalb der Schwellenwerte, die von *Yoshino et al.* (1993) (100 mg/kg Karotten) und *Talcott und Howard* (1999) (94 mg/kg Karottenbrei) bestimmt wurden.

Die anschließende Bestimmung der Bitteraktivitätswerte aus den Quotienten der Konzentration und des Bitterschwellenwertes von 6-Methoxymellein ergab durchweg Bitteraktivitäten < 1 , d.h. in keiner der gelagerten Proben lag das 6-Methoxymellein oberhalb der Geschmacksschwellenkonzentration vor.

Obwohl das 6-Methoxymellein bereits vor mehr als 45 Jahren von *Sondheimer* (1956) isoliert wurde und seitdem als Hauptursache für den Bittergeschmack in Karotten angesehen wird, konnte mit diesen systematischen Studien im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass diese Verbindung nicht ursächlich am Bittergeschmack von Karotten sowie Karottenprodukten beteiligt ist.

2.1.2 Analyse der Ethanolextrakte

2.1.2.1 Bitterstoff-Screening mittels Gelpermeationschromatographie/Geschmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA)

Vergleichsweise zu den Hexanextrakten wurden auch die Ethanolextrakte der frischen und bitterinduzierten Karotten (**Abbildung 14**) sowie des Karottenbreis mittels Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 aufgetrennt und durch GPC/GVA die erhaltenen Fraktionen in deren Bitteraktivität gewichtet (**Tabelle 7**).

Tabelle 7 GPC/Geschmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA) der Ethanolextrakte von frischen Karotten (*FK*), bitterinduzierten Karotten (*BIK*) und Karottenbrei (*KB*)

| Fraktion | TD-Faktor (Geschmacksqualität) | | |
|----------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| | <i>FK</i> | <i>BIK</i> | <i>KB</i> |
| E-I | <1 | <1 | <1 |
| E-II | <1 | <1 | <1 |
| E-III | <1 | <1 | <1 |
| E-IV | <1 | <1 | <1 |
| E-V | <1 | <1 | <1 |
| E-VI | 4 (bitter) | 8 (bitter) | 8 (bitter) |
| E-VII | <1 | <1 | <1 |
| E-VIII | <1 | <1 | <1 |
| E-IX | <1 | 2 (bitter) | <1 |
| E-X | <1 | 1 (bitter) | <1 |

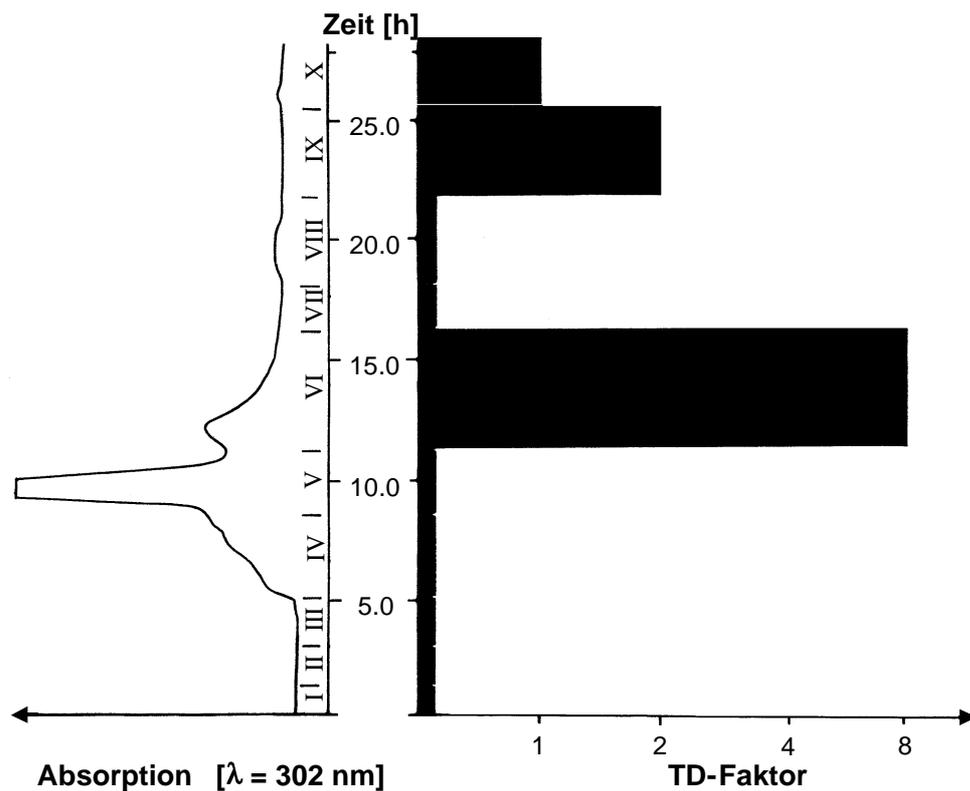


Abbildung 14 GPC/GVA des Ethanolextraktes der bitterinduzierten Karotten (BIK)

Beim Vergleich der Geschmacksverdünnungsanalysen der Ethanolextrakte von frischen und gelagerten Karotten bzw. Brei untereinander ist ersichtlich, dass die Fraktion E-VI in allen drei Probenmaterialien mit den höchsten TD-Faktoren bewertet wurde und demnach die intensivsten Bitterstoffe enthielt (**Tabelle 7**). Dabei wurden der Karottenbrei sowie die bitterinduzierten Karotten mit doppelter Bitterintensität bewertet als die frischen Karotten.

Da nach gelchromatographischer Trennung der Hexanextrakte der stärkste Bittergeschmack auch jeweils in der Fraktion VI lokalisiert war (**Tabelle 4**), eluieren die Bitterstoffe der Hexan- und der Ethanolfraktionen offensichtlich in der gleichen GPC-Fraktion (Fraktion VI).

Aufgrund der starken Bitterkeit des Karottenbreis und des hohen TD-Faktors der Fraktion E-VI, sollte im Folgenden diese GPC-Fraktion des Karottenbreis durch Anwendung der HPLC/GVA näher untersucht werden.

2.1.2.2 Identifizierung von Bitterstoffen in GPC-Fraktion E-VI

HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA)

Bei der Durchführung der HPLC/GVA der Fraktion E-VI des Karottenbreis wurden 49 Fraktionen einzeln gesammelt und nach Entfernen des Lösungsmittels auf Bittergeschmack geprüft (**Abbildung 15**). Hierbei war festzustellen, dass davon 26 Fraktionen einen bitteren Geschmack besaßen. Die Fraktionen E-VI/5, E-VI/6, E-VI/8, E-VI/15, E-VI/16, E-VI/22, E-VI/23, E-VI/30 und E-VI/42 wurden dabei mit TD-Faktoren zwischen 4 und 16 als bitter bewertet. Somit leisteten diese Verbindungen den größten Beitrag zur Bitterkeit der Gesamtfraktion. Der Beitrag der übrigen 17 bitteren Fraktionen war als geringer einzustufen.

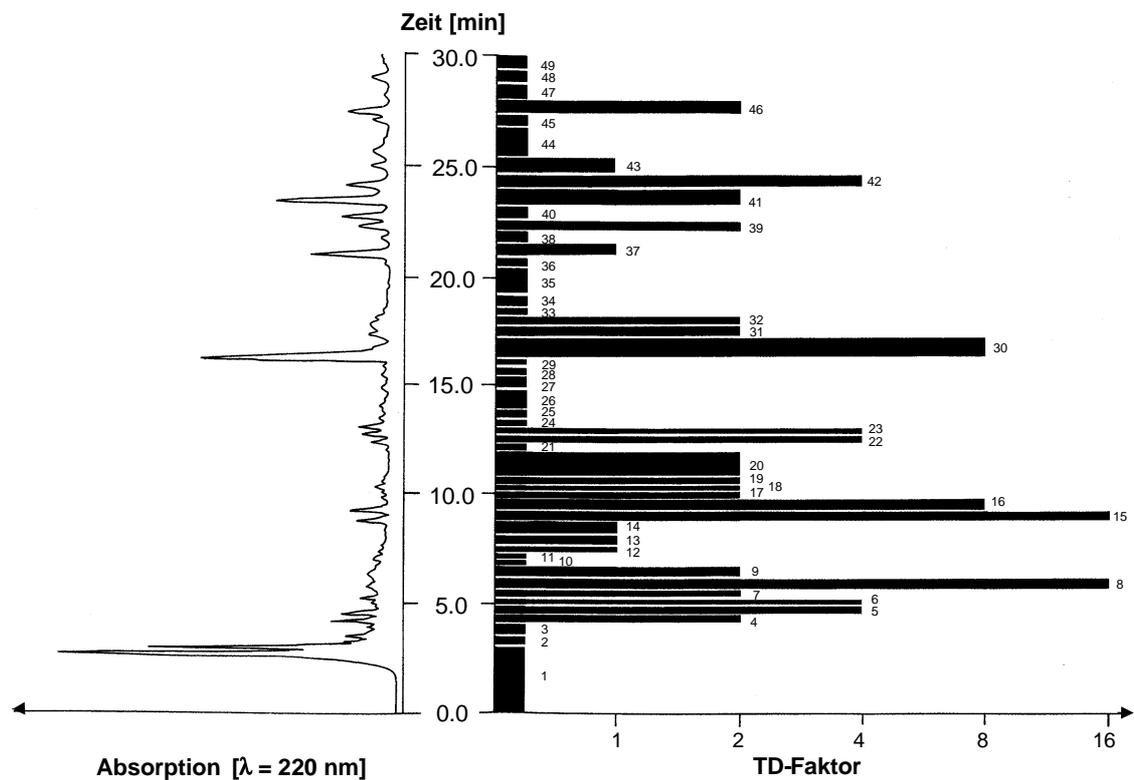


Abbildung 15 HPLC/GVA der GPC-Fraktion E-VI des Ethanolextraktes des Karottenbreis

Aus dem Ergebnis der Geschmacksverdünnungsanalyse ist ersichtlich, dass die Bitterkeit von Karottenprodukten offenbar nicht, wie in der Literatur angenommen, durch einen einzigen Hauptbitterstoff, sondern durch das Zusammenspiel vieler bitterer Einzelkomponenten verursacht wird. Da bei der Aufarbeitung kleinerer Mengen des Karottenbreis (≤ 1 kg) nach der GPC- und HPLC-Trennung in die einzelnen Fraktionen in keiner Fraktion ein Bittergeschmack wahrnehmbar war, ist es wahrscheinlich, dass sich die Gesamtbitterkeit des Produktes additiv aus dieser Vielzahl an bitteren Einzelkomponenten zusammensetzte. Ziel der folgenden Untersuchungen war es daher, aus dieser Gruppe an Bitterstoffen eine bittere Schlüsselsubstanz, die mit der Gesamtbitterkeit korreliert, zu identifizieren und diese als chemische Messgröße zur analytischen Objektivierung des Bittergeschmacks von Karotten und Karottenprodukten heranzuziehen.

Identifizierung von Bitterstoffen

Um genügend Material für eine spektroskopische Strukturaufklärung der Bitterstoffe zu erhalten, wurden 24 kg Karottenbrei sequentiell mit Hexan und Ethanol extrahiert, die Extrakte über Gelpermeationschromatographie aufgetrennt, die bittere Fraktion E-VI über eine RP-18 Kartusche vorfraktioniert und über eine Kieselgelsäule in 13 Fraktionen getrennt. Die in Degustationsexperimenten als bitter bewerteten Fraktionen wurden anschließend durch präparative HPLC aufgetrennt und die Peaks, die in ihren chromatographischen und sensorischen Eigenschaften mit den bitteren Fraktionen der HPLC/GVA (**Abbildung 15**) identisch waren, gesammelt.

Somit gelang es die in der HPLC-Fraktion E-VI/30 (**Abbildung 15**) enthaltene Verbindung, die mit einem TD-Faktor von 8 bewertet wurde, als farbloses Öl zu gewinnen und mittels GC/MS- sowie NMR-Experimenten in deren chemischer Struktur zu analysieren. Die Bestimmung der Molekülmasse mittels GC/MS erwies sich als schwierig, da das Molekül im EI- und im CI-Modus selbst bei Verwendung von Isobutan als Reaktandgas fragmentierte und somit das Spektrum kein Molekülion, sondern ausschließlich eine Reihe von Fragmentationen zeigte (**Abbildung 16** und **Abbildung 17**). Erst bei Verwendung von

Ammoniak konnte eine Molekülmasse von 260 Da bestimmt werden (**Abbildung 18**).

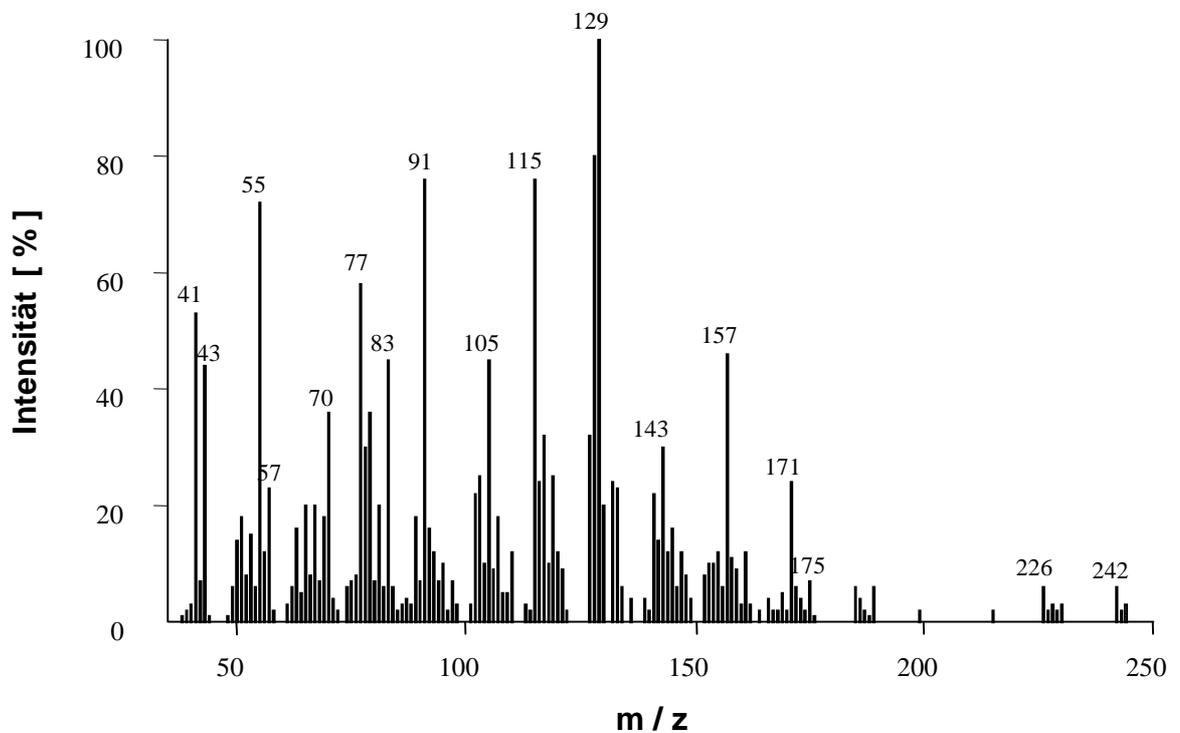


Abbildung 16 MS(EI)-Spektrum der aus Fraktion E-VI/30 isolierten bitteren Verbindung

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte 17 Signale und die Integration der Protonensignale des ^1H -NMR-Spektrums lieferte 24 Wasserstoffatome. Unter Berücksichtigung der Molekülmasse von 260 Da wurde damit die Summenformel $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$ berechnet und die Strukturformel in **Abbildung 19** vorgeschlagen.

Das Triplet bei 0,91 ppm mit einer Integration von drei Protonen im ^1H -Spektrum und das Kohlenstoffatom bei 14,1 ppm im ^{13}C -Spektrum wurden eindeutig im HMQC-Spektrum als die Methylgruppe H-C(17) identifiziert (**Tabelle 8** und **Tabelle 9**).

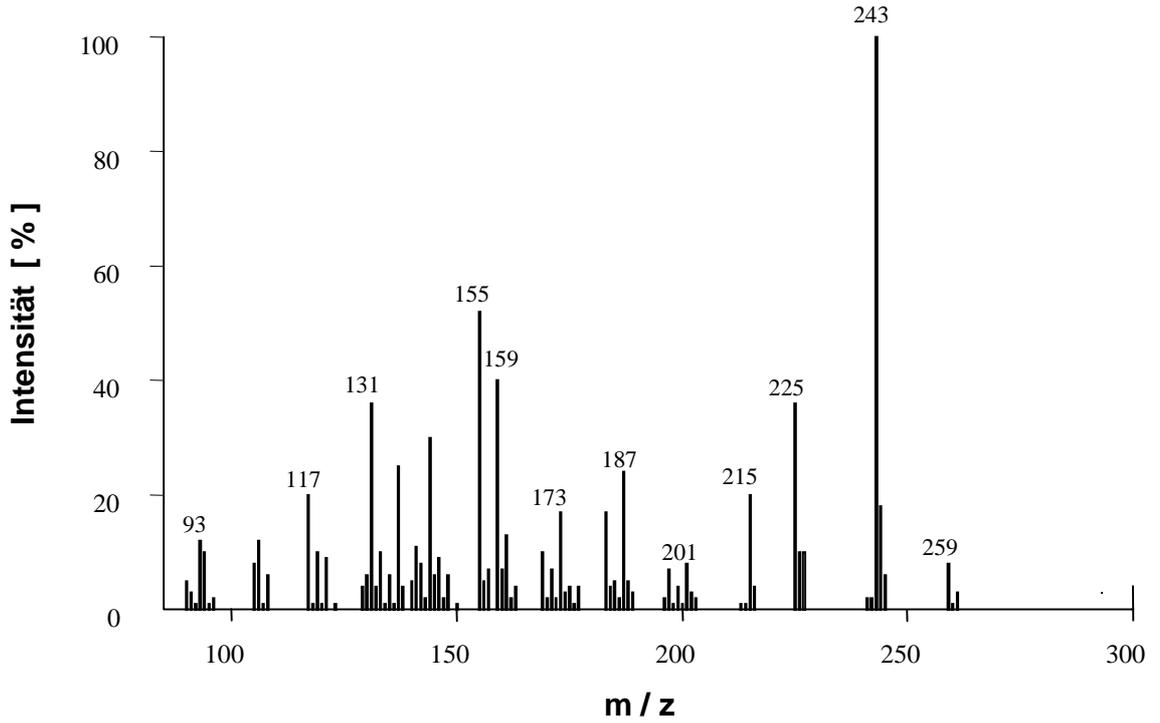


Abbildung 17 MS(Cl, Isobutan)-Spektrum der aus Fraktion E-VI/30 isolierten bitteren Verbindung

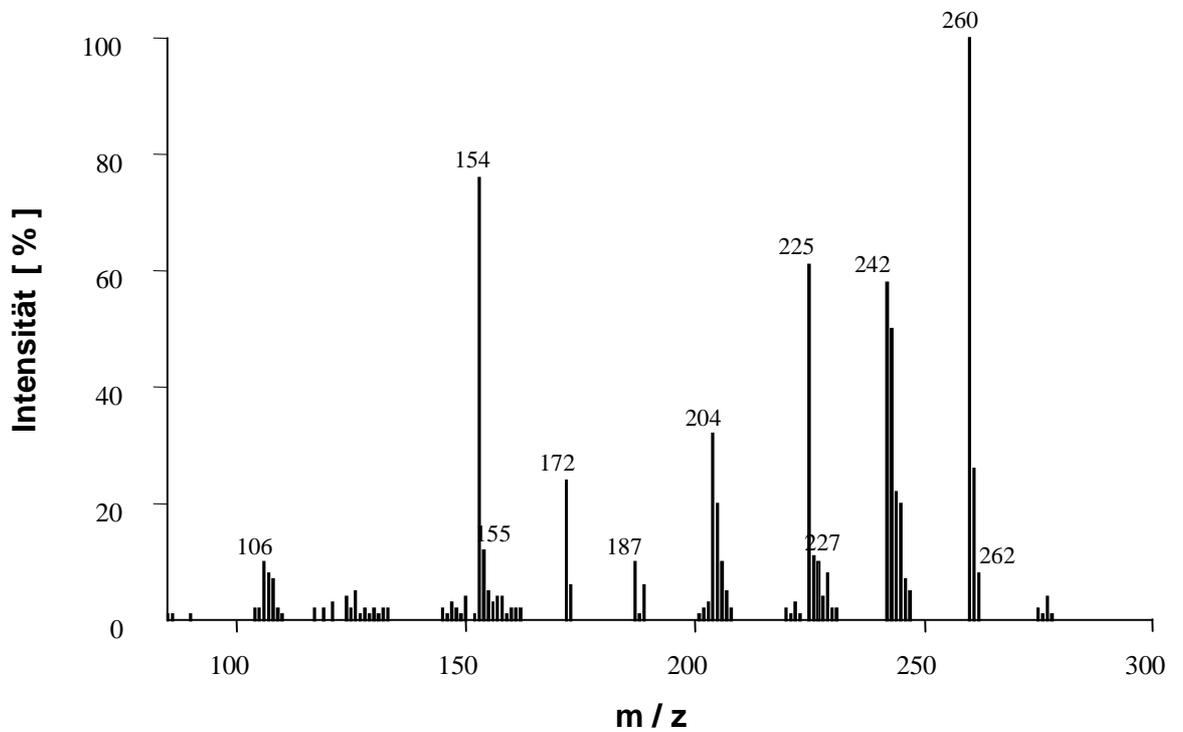


Abbildung 18 MS(Cl, NH₃)-Spektrum der aus Fraktion E-VI/30 isolierten bitteren Verbindung

Das HMQC-Spektrum und das DEPT-135 Experiment erlaubten weiterhin die Zuordnung der Multipletts bei 1,17 und 1,28 ppm mit einer Integration von acht und zwei Protonen zu den Methylengruppen C(12)-C(15) bzw. C(16) (**Tabelle 8** und **Tabelle 9**). Dies wurde durch ein homonukleares δ,δ -Korrelations-experiment (COSY-Experiment) bestätigt, das starke Kopplungen zwischen diesen Methylenprotonen zeigte und eine weitere Kopplung zwischen dem Multiplett bei 1,17 ppm und dem Multiplett der Methylengruppe H-C(11) bei 1,86 ppm aufwies (**Abbildung 20**). Weiterhin war im COSY-Spektrum eine Kopplung von H-C(11) mit dem Methinproton H-C(10) bei 5,33 ppm und zwischen letztgenanntem Proton und dem Methinwasserstoffatom H-C(9) bei 5,48 ppm ersichtlich. Aufgrund der hohen Kopplungskonstante von 10,6 Hz wurde auf eine [Z]-Konfiguration der Doppelbindung C(9)=C(10) geschlossen. Ferner wurde noch ein Doppeldublett für das Proton H-C(8) detektiert, das sowohl mit dem Multiplett bei 5,48 ppm als auch mit dem Hydroxyproton HO-C(8) bei 1,41 ppm koppelte. Das Verschwinden des Signals bei 1,41 ppm durch H/D-Austausch bei Zugabe von Spuren an D₂O bestätigte die Identität der Hydroxygruppe. Da das Kohlenstoffatom C(8) keine weiteren Kopplungen im COSY-Spektrum zeigte, musste dieses Kohlenstoffatom mit einem der vier quartären Kohlenstoffatome bei 68,8, 70,3, 78,3 und 79,9 ppm verbunden sein. Eine eindeutige Zuordnung dieser quartären Kohlenstoffatome konnte durch ein HMBC-Experiment erreicht werden. Das HMBC-Experiment zeigte weiterhin Korrelationen zwischen dem Proton H-C(8) und den Kohlenstoffatomen bei 79,9 und 68,8 ppm, die den Kohlenstoffatomen mit der Dreifachbindung C(6)≡C(7) zugeordnet werden konnten.

Außerdem waren in den HMBC-Experimenten noch heteronukleare Kopplungen zwischen dem Proton H-C(3) bei 4,51 ppm und den acetylenischen Kohlenstoffatomen C(4) und C(5) ersichtlich. Das Proton H-C(3) zeigte im COSY-Experiment eine homonukleare Kopplung mit HO-C(3) und dem olefinischen Proton H-C(2), sowie eine heteronukleare Korrelation im HMBC-Spektrum mit den Kohlenstoffatomen bei 117,3 und 135,9 ppm. Aufgrund ihrer starken homonuklearen Kopplung wurden diese der terminalen Methylengruppe H-C(1) und der Methylengruppe H-C(2) zugeordnet.

Unter Einbezug aller dieser spektroskopischen Daten konnte die vorliegende Verbindung E-VI/30 eindeutig als [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol, dem sog. Falcarindiol (**Abbildung 19**) in der Struktur geklärt werden.

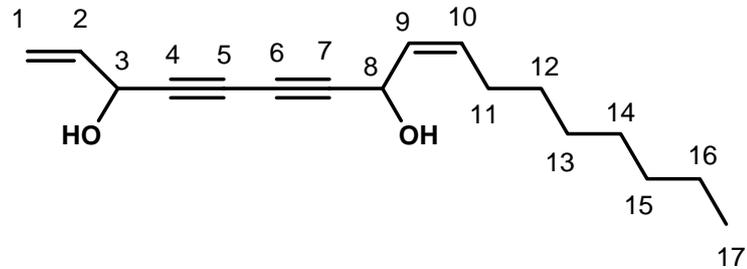


Abbildung 19 Struktur des aus Fraktion E-VI/30 isolierten [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol)

Um zu untersuchen, ob weitere bittere Strukturverwandte des Falcarindiols im Ethanolextrakt vorliegen, wurden die isolierten HPLC-Fractionen mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Verbindungen in den Fraktionen E-VI/39 und E-VI/46 ebenfalls die aliphatische Kette C(9)-C(17) sowie die konjugierten Dreifachbindungen des Falcarindiols aufwiesen.

Die bittere Verbindung in Fraktion E-VI/46 (s. **Abbildung 15**), die bei der HPLC-Geschmacksverdünnungsanalyse mit einem TD-Faktor von 2 bewertet wurde, lag nach der Isolierung ebenfalls als farbloses Öl vor. Die Bestimmung der Molekülmasse war mit den gleichen Schwierigkeiten verbunden, die auch schon beim Falcarindiol auftraten. Auch hier lieferte das MS-Spektrum bei der Verwendung von Isobutan als Reaktandgas keinen Molekülpeak, sondern ausschließlich Fragmentationen. Mit Hilfe von Ammoniak als Reaktandgas konnte allerdings die molare Masse mit einem Wert von 244 Da bestimmt werden (**Abbildung 21**).

Tabelle 8 Zuordnung der ^1H -NMR-Signale (400 MHz, C_6D_6) von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol)

| H am relevanten C-Atom ^a | δ ^b | I ^c | M ^c | J ^c | Homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplung ^d |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------|---|
| H-C(17) | 0,91 | 3 | t | 7,1 | H-C(16) |
| H-C(12,13,14,15) | 1,17 | 8 | m | | H-C(11), H-C(16) |
| H-C(16) | 1,28 | 2 | m | | H-C(15), H-C(17) |
| HO-C(3) | 1,32 | 1 | d | 6,3 | H-C(3) |
| HO-C(8) | 1,41 | 1 | d | 4,5 | H-C(8) |
| H-C(11) | 1,86 | 2 | m | | H-C(10), H-C(12) |
| H-C(3) | 4,51 | 1 | dd | 6,3; 7,6 | H-C(2), HO-C(3) |
| H _a -C(1) | 4,89 | 1 | m | 1,4; 10,2 | H _b -C(1), H-C(2) |
| H-C(8) | 5,00 | 1 | dd | 4,5; 8,0 | HO-C(8), H-C(9) |
| H _b -C(1) | 5,23 | 1 | m | 1,4; 17,0 | H _a -C(1), H-C(2) |
| H-C(10) | 5,33 | 1 | m | 7,5; 10,6 | H-C(9), H-C(11) |
| H-C(9) | 5,48 | 1 | m | 8,0; 10,6 | H-C(8), H-C(10) |
| H-C(2) | 5,65 | 1 | ddd | 7,6; 10,2; 17,0 | H _a -C(1), H _b -C(1), H-C(3) |

^a Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf **Abbildung 19**

^b Die chemischen ^1H Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen

^c Aus dem 1D-Spektrum bestimmt

^d Homonucleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplungen wurden im COSY-Experiment erhalten

Tabelle 9 Zuordnung der ^{13}C -NMR Signale (360 MHz, C_6D_6) von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol)

| C-Atom ^a | δ ^b | DEPT ^c | via $^1\text{J}(\text{C,H})$ ^d | via $^{2,3}\text{J}(\text{C,H})$ ^e |
|---------------------|-----------------------|-------------------|---|---|
| C(17) | 14,1 | CH | H-C(17) | H-C(16) |
| C(16) | 22,6 | CH ₂ | H-C(16) | H-C(14,15), H-C(17) |
| C(11) | 27,2 | CH ₂ | H-C(11) | H-C(9), H-C(10) |
| C(14) | 29,1 | CH ₂ | H-C(14) | H-C(11), H-C(12,13,15) |
| C(13) | 29,2 | CH ₂ | H-C(13) | H-C(11), H-C(12,14,15) |
| C(12) | 29,3 | CH ₂ | H-C(12) | H-C(11), H-C(13,14) |
| C(15) | 31,8 | CH ₂ | H-C(15) | H-C(13,14), H-C(16), H-C(17) |
| C(8) | 58,7 | CH | H-C(8) | HO-C(8), H-C(9), H-C(10) |
| C(3) | 63,5 | CH | H-C(3) | H-C(1), H-C(2), HO-C(3) |
| C(6) | 68,8 | C | | H-C(8) |
| C(5) | 70,3 | C | | H-C(3) |
| C(4) | 78,3 | C | | H-C(2), HO-C(3), H-C(3) |
| C(7) | 79,9 | C | | HO-C(8), H-C(8), H-C(9) |
| C(1) | 117,3 | CH ₂ | H-C(1) | H-C(3) |
| C(9) | 127,7 | CH | H-C(9) | H-C(2), HO-C(8), H-C(8), H-C(10), H-C(11) |
| C(10) | 134,7 | CH | H-C(10) | H-C(8), H-C(9), H-C(11), H-C(12) |
| C(2) | 135,9 | CH | H-C(2) | H-C(1), HO-C(3), H-C(3) |

^a Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf **Abbildung 19**

^b Die chemischen ^{13}C Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen

^c 135° -DEPT-Spektroskopie

^d Zuordnung basiert auf HMQC (^1J) Experiment

^e Zuordnung basiert auf HMBC ($^{2,3}\text{J}$) Experiment

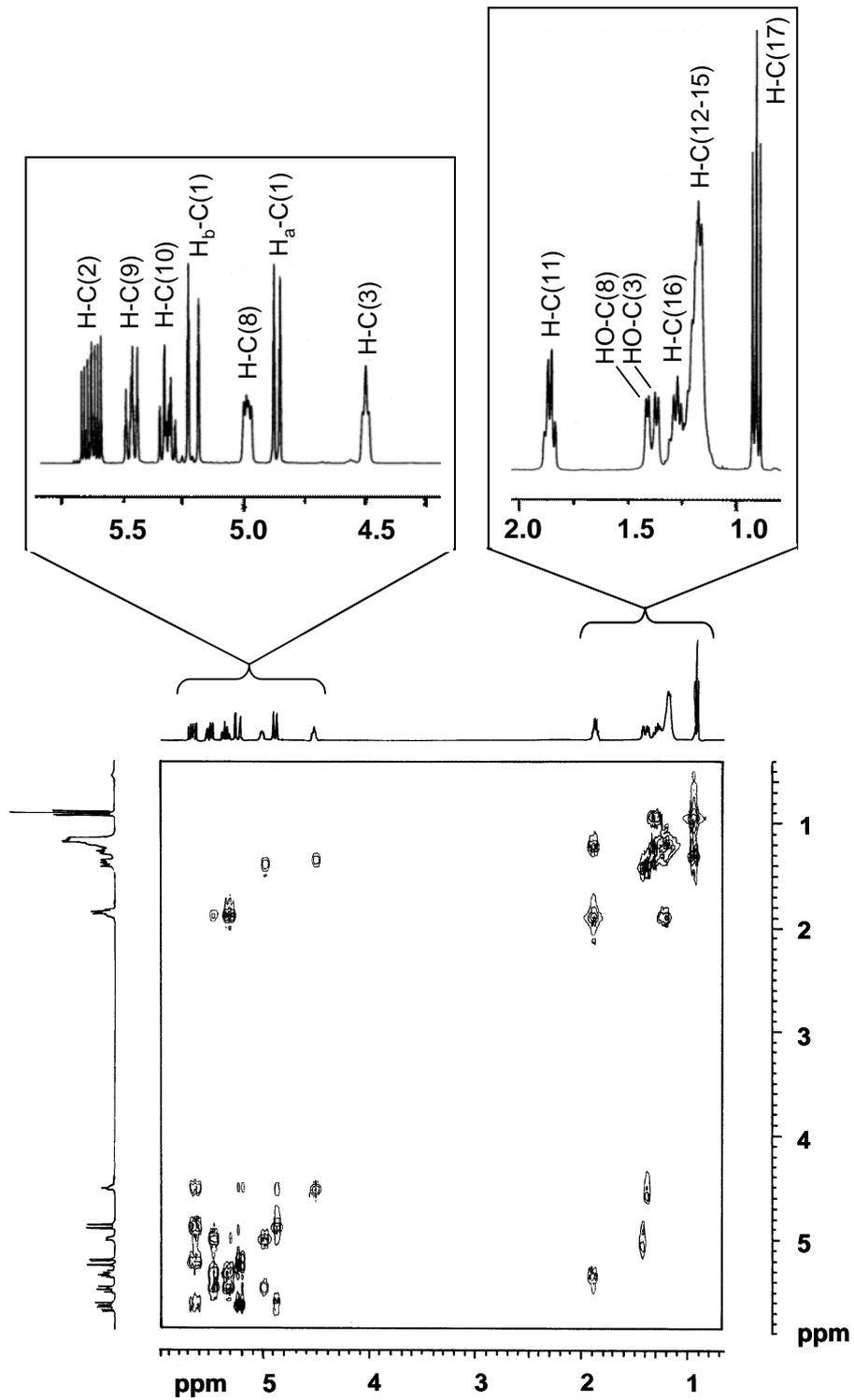


Abbildung 20 COSY-Spektrum (400 MHz, C_6D_6 der aus Fraktion E-VI/30 isolierten bitteren Verbindung

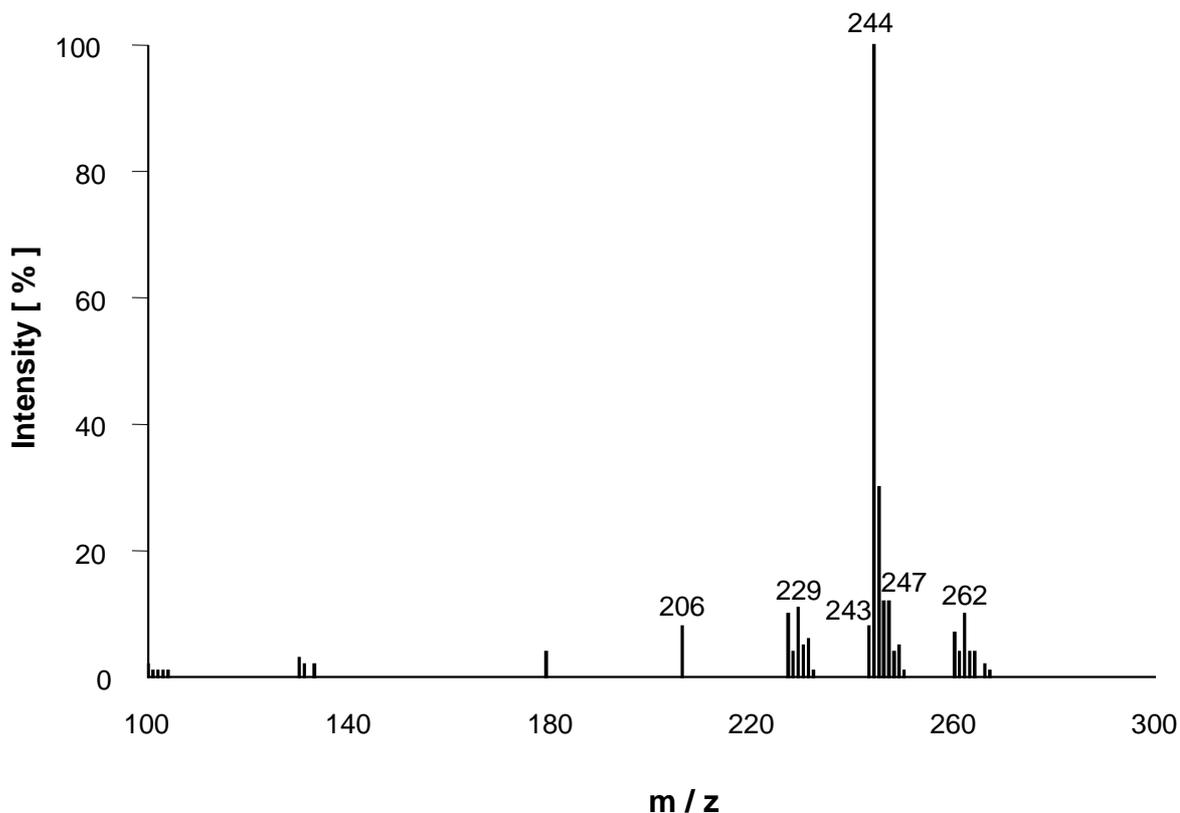


Abbildung 21 MS(Cl, NH₃)-Spektrum der aus Fraktion E-VI/46 isolierten bitteren Verbindung

Die Integration der Protonensignale des ¹H-NMR-Spektrums ließ auf 24 Protonen schließen (**Tabelle 10**) und das ¹³C-NMR-Spektrum zeigte 17 Signale (**Tabelle 11**). Damit wurde die Summenformel C₁₇H₂₄O errechnet. Beim Vergleich des ¹H-NMR-Spektrums der aufzuklärenden Verbindung mit dem entsprechenden Spektrum des Falcarindiols fiel auf, dass die beiden Spektren bis auf wenige Unterschiede fast identisch waren.

Im ¹H-NMR-Spektrum der unbekannt Substanz fehlte lediglich das Signal der zweiten Hydroxygruppe in 8-Stellung sowie das Doppeldublett bei δ 5,00 ppm. Dafür trat im Spektrum ein neues Dublett bei einer Verschiebung von 3,03 ppm auf (**Tabelle 10**). Auch das ¹³C-NMR-Spektrum war nahezu identisch mit dem des Falcarindiols. Es fehlte lediglich das Signal bei δ 58,7 ppm, dafür war ein neues Signal bei einer Verschiebung von 17,7 ppm vorhanden (**Tabelle 11**). Dieses Signal ließ sich im HMQC-Spektrum dem neuen Dublett bei δ 3,03 ppm

im ^1H -Spektrum zuordnen. Die Kopplungen und Zuordnungen aller übrigen Signale waren identisch mit den oben beschriebenen des Falcarindiols. Die Strukturelemente C(1) bis C(7) und C(9) bis C(17) mussten somit mit denen des Falcarindiols identisch sein. Im COSY-Spektrum war eine Kopplung zwischen den Protonen am Kohlenstoffatom C(9) und den Protonen des neuen Signals bei δ 3,03 ppm zu erkennen. Da dieses Signal zu einem Dublett aufgespalten war, eine Intensität von zwei Protonen aufwies und im COSY-Spektrum keine weiteren Kopplungen zeigte, musste es sich hierbei um eine Methylengruppe handeln, die mit der noch freien Bindung mit einem quartären Kohlenstoffatom oder einem Wasserstoff-freien Heteroatom verknüpft war. Aufgrund der berechneten Summenformel und der bereits aufgeklärten Strukturteile musste eine Verknüpfung mit dem quartären Kohlenstoffatom C(7) vorliegen. Diese Zuordnung wurde durch das HMBC-Experiment bestätigt, das eine heteronukleare Kopplung zwischen dem Protonensignal bei δ 3,03 ppm und dem Kohlenstoffatom C(7) bei δ 80,3 ppm zeigte (**Abbildung 22**).

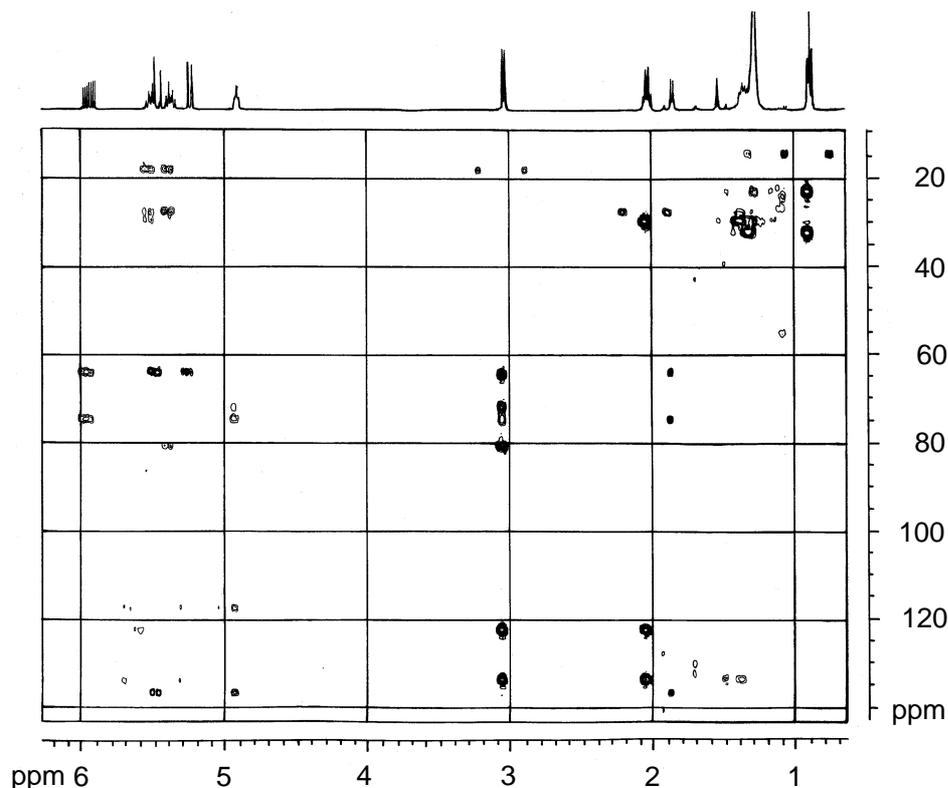


Abbildung 22 HMBC-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der aus Fraktion E-VI/46 isolierten bitteren Verbindung

Demnach handelte es sich bei der unbekanntem Substanz um ein dem Falcarindiol analoges Molekül, dem lediglich die Hydroxygruppe an 8-Position fehlte. Die Struktur der aus Fraktion E-VI/46 isolierten Verbindung wurde somit als [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol, **Abbildung 23**) aufgeklärt.

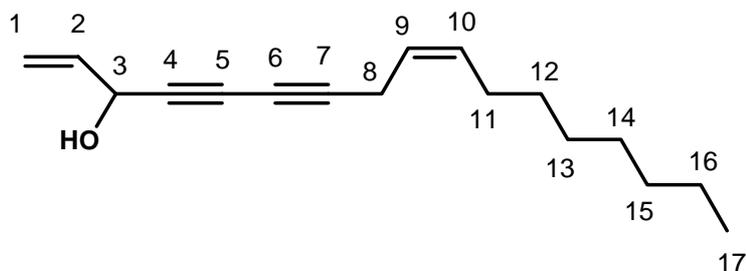


Abbildung 23 Struktur des aus Fraktion E-VI/46 isolierten [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ols (Falcarinol)

Tabelle 10 Zuordnung der ^1H -NMR-Signale (400 MHz, CDCl_3) von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol)

| H am relevanten C-Atom ^a | δ ^b | I ^c | M ^c | J ^c | Homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplung ^d |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------|---|
| H-C(17) | 0,88 | 3 | t | 7,0 | H-C(16) |
| H-C(13,14,15,16) | 1,28 | 8 | m | | H-C(12), H-C(17) |
| H-C(12) | 1,35 | 2 | m | | H-C(11), H-C(13) |
| HO-C(3) | 1,85 | 1 | d | 6,5 | H-C(3) |
| H-C(11) | 2,02 | 2 | m | | H-C(10), H-C(12) |
| H-C(8) | 3,03 | 2 | d | 6,9 | H-C(9) |
| H-C(3) | 4,91 | 1 | m | | H-C(2), HO-C(3) |
| H _a -C(1) | 5,24 | 1 | m | 10,2 | H-C(2) |
| H-C(9) | 5,38 | 1 | m | 6,9; 10,6 | H-C(8), H-C(10) |
| H _b -C(1) | 5,46 | 1 | m | 17,5 | H-C(2) |
| H-C(10) | 5,52 | 1 | m | 7,4; 10,5 | H-C(9), H-C(11) |
| H-C(2) | 5,94 | 1 | ddd | 5,3; 10,2; 17,0 | H _a -C(1), H _b -C(1), H-C(3) |

^a Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf **Abbildung 23**

^b Die chemischen ^1H Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen

^c Aus dem 1D-Spektrum bestimmt

^d Homonucleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplungen wurden im COSY-Experiment erhalten

Tabelle 11 Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale (360 MHz, CDCl_3) von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol)

| C-Atom ^a | δ ^b | DEPT ^c | via $^1\text{J}(\text{C,H})$ ^d | via $^{2,3}\text{J}(\text{C,H})$ ^e |
|---------------------|-----------------------|-------------------|---|---|
| C(17) | 14,1 | CH | H-C(17) | H-C(15,16) |
| C(8) | 17,7 | CH ₂ | H-C(8) | H-C(9), H-C(10) |
| C(16) | 22,7 | CH ₂ | H-C(16) | H-C(14,15), H-C(17) |
| C(11) | 27,2 | CH ₂ | H-C(11) | H-C(9), H-C(10) |
| C(14) | 29,2 | CH ₂ | H-C(14) | H-C(12), H-C(13,15,16) |
| C(13) | 29,2 | CH ₂ | H-C(13) | H-C(12), H-C(14,15) |
| C(12) | 29,3 | CH ₂ | H-C(12) | H-C(11), H-C(13,14) |
| C(15) | 31,8 | CH ₂ | H-C(15) | H-C(13,14,16), H-C(17) |
| C(3) | 63,6 | CH | H-C(3) | H-C(1), H-C(2), HO-C(3), |
| C(6) | 64,0 | C | | H-C(8) |
| C(5) | 71,4 | C | | H-C(3), H-C(8) |
| C(4) | 74,3 | C | | H-C(2), HO-C(3), H-C(3) |
| C(7) | 80,3 | C | | H-C(8), H-C(9) |
| C(1) | 117,0 | CH ₂ | H-C(1) | H-C(3) |
| C(9) | 121,9 | CH | H-C(9) | H-C(8), H-C(11) |
| C(10) | 133,1 | CH | H-C(10) | H-C(8), H-C(11) |
| C(2) | 136,2 | CH | H-C(2) | H-C(1), HO-C(3), H-C(3) |

^a Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf **Abbildung 23**

^b Die chemischen ^{13}C Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen

^c $^{135^\circ}$ -DEPT-Spektroskopie

^d Zuordnung basiert auf HMQC (^1J) Experiment

^e Zuordnung basiert auf HMBC ($^{2,3}\text{J}$) Experiment

Die dritte in reiner Form isolierte Substanz war die Verbindung E-VI/39 (s. **Abbildung 15**), die bei der HPLC-Geschmacksverdünnungsanalyse mit einem TD-Faktor von 2 bewertet wurde. Auch hier lag ein farbloses Öl vor, dessen Masse wiederum nur durch die Verwendung von Ammoniak als Reaktandgas

bestimmt werden konnte. Das erhaltene Massenspektrum (**Abbildung 24**) lieferte einen Molekülpeak bei 302 Da und somit eine um 42 Da höhere Masse als für das Falcarindiol. Daher wurde das Monoacetat des Falcarindiols vermutet. Dies wurde durch NMR-Spektroskopie weiter bestätigt, die im ^{13}C -Spektrum auf 19 Kohlenstoffatome und im ^1H -Spektrum (**Abbildung 25**) auf 26 Protonen schließen ließ (**Tabelle 12**). Weiterhin zeigte die Verbindung analog dem Falcarindiol sowohl die aliphatische Kette C(9)-C(17) (**Abbildung 26**), als auch die konjugierten Dreifachbindungen. Im HMQC-Spektrum (**Abbildung 26**) war außerdem ersichtlich, dass das Protonensignal bei 2,09-2,10 ppm durch die Überlagerung von zwei Signalen zustande kam, die sich den Kohlenstoffatomen C(11) und einem neuen Kohlenstoffatom bei 20,9 ppm zuordnen ließen.

Das DEPT-135 Experiment zeigte, im Gegensatz zum Falcarindiol, eine zusätzliche Methylgruppe bzw. ein quartäres Kohlenstoffatom bei 20,9 bzw. 169,4 ppm (**Tabelle 13**). Zusätzlich waren im HMBC-Experiment starke heteronukleare Kopplungen zwischen dem Kohlenstoffatom bei 169,4 ppm und den Wasserstoffatomen bei 2,09 ppm sowie H-C(3) ersichtlich, die die vermutete Acetatstruktur bestätigten. Das Fehlen der homonuklearen Kopplung zwischen H-C(3) und HO-C(3) im COSY-Spektrum wies darauf hin, dass die Acetylgruppe mit dem Kohlenstoffatom C(3) verknüpft sein musste. Aufgrund dieser Daten konnte die aus Fraktion E-VI/39 isolierte Verbindung eindeutig als [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-dien-8-ol (Falcarindiol-3-acetat, **Abbildung 27**) identifiziert werden.

Um die identifizierten Verbindungen in ihrem Bitterbeitrag zur Gesamtbitterkeit zu bewerten, wurden sie analog den Untersuchungen zum 6-Methoxymellein anhand des Bitteraktivitätswertes auf der Basis einer Dosis/Aktivitäts-Beziehung gewichtet. Hierzu mussten zunächst die Schwellenwerte der drei Verbindungen bestimmt werden.

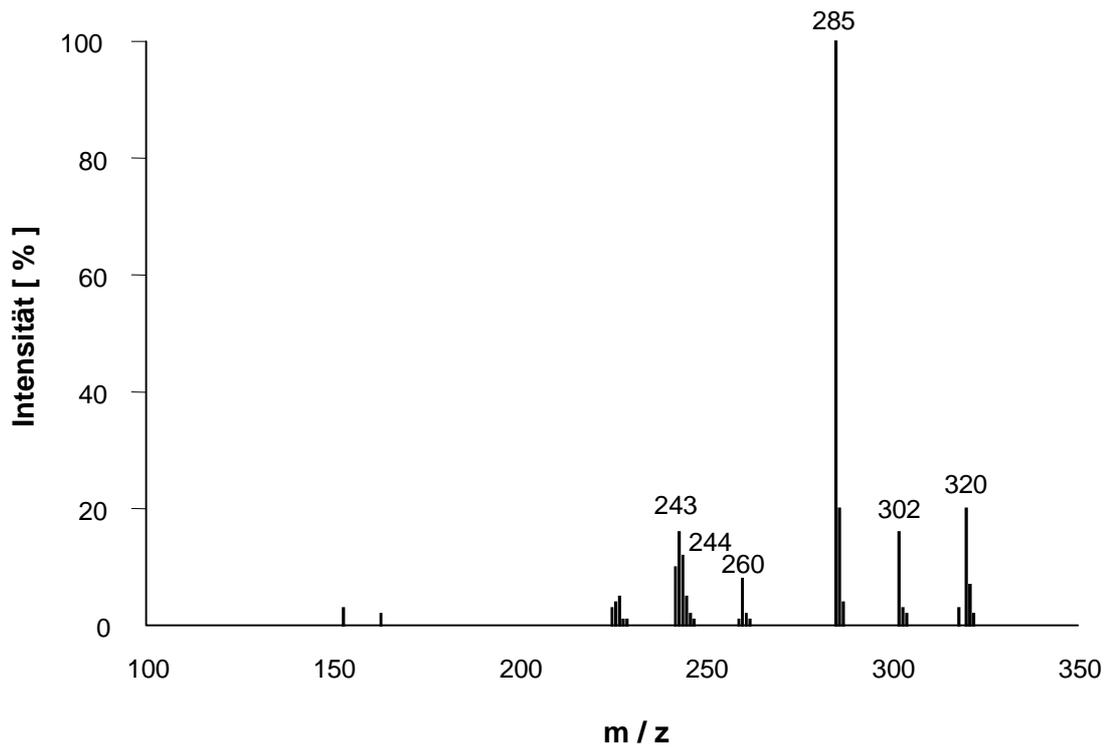


Abbildung 24 MS(Cl, NH₃)-Spektrum der aus Fraktion E-VI/39 isolierten bitteren Verbindung

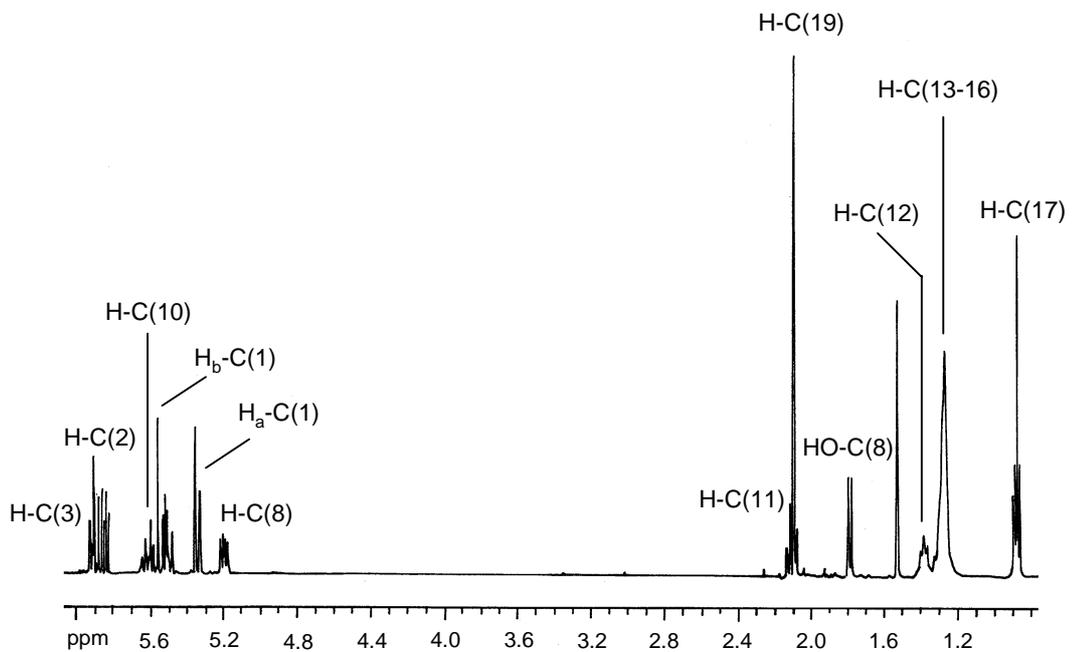


Abbildung 25 ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) der aus Fraktion E-VI/39 isolierten bitteren Verbindung

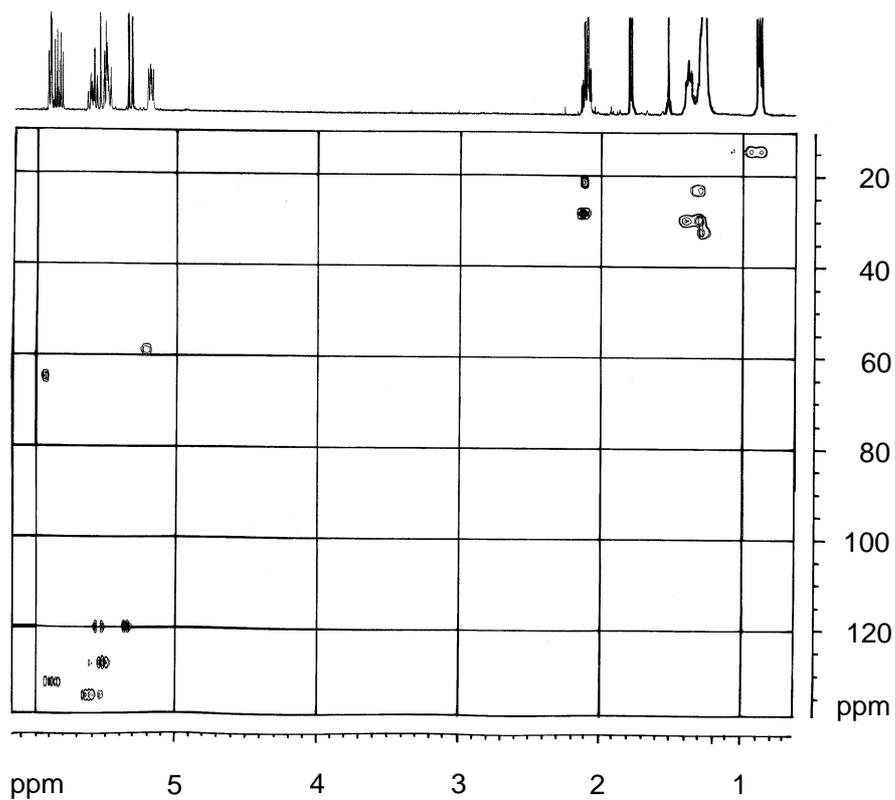


Abbildung 26 HMQC-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) der aus Fraktion E-VI/39 isolierten bitteren Verbindung

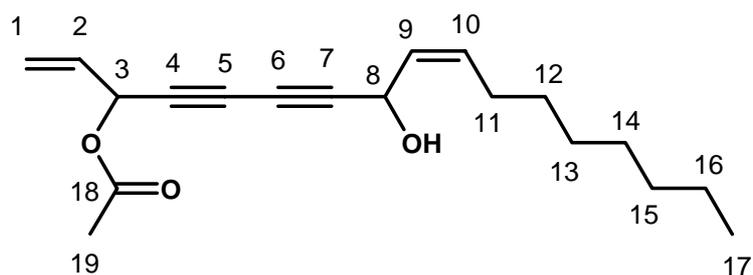


Abbildung 27 Struktur des aus Fraktion E-VI/39 isolierten [Z]-3-Acetoxyheptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat)

Tabelle 12 Zuordnung der ^1H -NMR-Signale (400 MHz, CDCl_3) von [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat)

| H am relevanten C-Atom ^a | δ^b | I ^c | M ^c | J ^c | Homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplung ^d |
|-------------------------------------|------------|----------------|----------------|-----------------|---|
| H-C(17) | 0,87 | 3 | t | 7,0 | H-C(16) |
| H-C(13,14,15,16) | 1,28 | 8 | m | | H-C(12), H-C(17) |
| H-C(12) | 1,39 | 2 | m | | H-C(11), H-C(13) |
| HO-C(8) | 1,79 | 1 | d | 5,3 | H-C(8) |
| H-C(19) | 2,09 | 3 | s | | |
| H-C(11) | 2,10 | 2 | m | | H-C(10), H-C(12) |
| H-C(8) | 5,16 | 1 | dd | 5,3; 8,2 | HO-C(8), H-C(9) |
| H _a -C(1) | 5,34 | 1 | m | 10,0 | H-C(2) |
| H-C(9) | 5,52 | 1 | m | 8,3; 10,7 | H-C(8), H-C(10) |
| H _b -C(1) | 5,53 | 1 | m | 16,7 | H-C(2) |
| H-C(10) | 5,61 | 1 | m | 7,3; 10,6 | H-C(9), H-C(11) |
| H-C(2) | 5,87 | 1 | ddd | 5,7; 10,0; 16,7 | H _a -C(1), H _b -C(1), H-C(3) |
| H-C(3) | 5,92 | 1 | m | | H-C(2) |

^a Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf **Abbildung 27**

^b Die chemischen ^1H Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen

^c Aus dem 1D-Spektrum bestimmt

^d Homonucleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ Kopplungen wurden im COSY-Experiment erhalten

Tabelle 13 Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale (360 MHz, CDCl_3) von
[Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-dien-8-ol
(Falcarindiol-3-acetat)

| C-Atom ^a | δ ^b | DEPT ^c | via $^1\text{J}(\text{C,H})$ ^d | via $^{2,3}\text{J}(\text{C,H})$ ^e |
|---------------------|-----------------------|-------------------|---|---|
| C(17) | 14,1 | CH | H-C(17) | H-C(15,16) |
| C(19) | 20,9 | CH | H-C(19) | |
| C(16) | 22,6 | CH ₂ | H-C(16) | H-C(14,15), H-C(17) |
| C(11) | 27,7 | CH ₂ | H-C(11) | H-C(10) |
| C(14) | 29,1 | CH ₂ | H-C(14) | H-C(12), H-C(13,15,16) |
| C(13) | 29,2 | CH ₂ | H-C(13) | H-C(12), H-C(14,15) |
| C(12) | 29,3 | CH ₂ | H-C(12) | H-C(11), H-C(13,14) |
| C(15) | 31,8 | CH ₂ | H-C(15) | H-C(17) |
| C(8) | 58,6 | CH | H-C(8) | HO-C(8) |
| C(3) | 64,5 | CH | H-C(3) | H-C(1), H-C(2) |
| C(6) | 68,6 | C | | |
| C(5) | 70,9 | C | | |
| C(4) | 74,8 | C | | H-C(3) |
| C(7) | 80,1 | C | | H-C(8) |
| C(1) | 119,7 | CH ₂ | H-C(1) | H-C(3) |
| C(9) | 127,7 | CH | H-C(9) | H-C(8), HO-C(8), H-C(11) |
| C(10) | 132,0 | CH | H-C(10) | H-C(11) |
| C(2) | 134,7 | CH | H-C(2) | H-C(1), H-C(3) |
| C(18) | 169,4 | C | | H-C(3), H-C(19) |

^a Nummerierung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf **Abbildung 27**

^b Die chemischen ^{13}C Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan bezogen

^c 135° -DEPT-Spektroskopie

^d Zuordnung basiert auf HMQC (^1J) Experiment

^e Zuordnung basiert auf HMBC ($^{2,3}\text{J}$) Experiment

Bestimmung von Bittergeschmacksschwellenwerten

Nach Reinigung der Substanzen Falcarinol, Falcarindiol und Falcarindiol-3-acetat durch präparative HPLC und Überprüfung deren Reinheit mittels GC/MS und ¹H-NMR-Spektroskopie, wurden deren Bitterschwellenwerte in wässriger Lösung mittels Triangeltest bestimmt (**Tabelle 14**). Die Verkostung der Verbindungen zeigte, dass diese nicht eine dem Coffein ähnliche Bitternote aufwiesen, sondern vielmehr eine kratzende Bitterkeit am hinteren Ende der Zunge und des Mund-Rachen-Raumes verursachten, die mit dem kratzenden Bittergeschmack der Karottenprodukte identisch war.

Die Schwellenwertbestimmung ergab für das [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol) einen Wert von 10 mg/kg Wasser (0,04 mmol/kg Wasser). Für das [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol) wurde ein Schwellenwert von 20 mg/kg Wasser (0,08 mmol/kg Wasser) bestimmt. Zusätzlich zur kratzenden Bitterkeit hinterließ diese Verbindung noch einen belegenden Effekt im Mundraum. Die höchste Bitterschwelle der drei Bisacetylene wurde für das [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat) mit einem Wert von 60 mg/kg Wasser (0,20 mmol/kg Wasser) gefunden. Allerdings verursachte diese Verbindung bereits ab einer Konzentration von 15 mg/kg Wasser eine deutlich wahrnehmbare brennende Empfindung auf der Zunge sowie im Mund- und Rachen-Raum.

Im Vergleich zu den zuvor isolierten Bitterstoffen 6-Methoxymellein, Eugenin und Gazarin liegt die Schwelle von Falcarindiol mit einem Wert von 0,04 mmol/kg Wasser deutlich niedriger (**Tabelle 14**). Das Falcarindiol besitzt somit den geringsten Schwellenwert der sechs isolierten Verbindungen, gefolgt vom Falcarinol mit einer Schwelle von 0,08 mmol/kg Wasser. Der Schwellenwert der Verbindung Falcarindiol-3-acetat liegt dagegen mit 0,20 mmol/kg Wasser deutlich höher und ist mit der Schwelle des Gazarins vergleichbar.

Tabelle 14 Schwellenwerte isolierter Verbindungen

| Substanz | Schwellenwert [mmol/kg] ^a |
|-----------------------|--------------------------------------|
| Falcarindiol | 0,04 |
| Falcarinol | 0,08 |
| 6-Methoxymellein | 0,10 |
| Gazarin | 0,18 |
| Falcarindiol-3-acetat | 0,20 |
| Eugenin | 0,35 |

^a Die Schwellenwerte wurden mittels Triangeltest in Trinkwasser bestimmt

2.1.2.3 Diskussion

Die aktivitätsorientierte Fraktionierung der Ethanolextrakte der frischen Karotten, der bitterinduzierten Karotten und des Karottenbreis durch Gel-permeationschromatographie und anschließende Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse zeigte, dass die Hauptbitterkeit der drei Probenmaterialien jeweils in der gleichen GPC-Fraktion (Fraktion E-VI) lokalisiert war. Da auch die Hauptbitterstoffe der Hexanextrakte in dieser Fraktion eluierten, ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um die gleichen bitteren Substanzen handelt.

Nach weiterer Auftrennung dieser bitteren Ethanolfraktion aus Karottenbrei durch HPLC und Durchführung der Geschmacksverdünnungsanalyse konnten 26 bittere Unterfraktionen mit jeweils ähnlich hohen TD-Faktoren lokalisiert werden. Aus dieser Vielzahl an Verbindungen gelang es durch GC/MS sowie ein- und zweidimensionale NMR-Experimente, drei bitter schmeckende Substanzen, das [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol), das [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol) und das [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat) zu identifizieren und ihre Geschmacksschwellen in wässriger Lösung zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass alle drei Verbindungen intensive Bitterstoffe sind. So liegt die Bitter-

schwelle von Falcarindiol z.B. um das Zehnfache unterhalb des Schwellenwertes der bitteren Standardverbindung Coffein.

Die Schlüsselrolle dieser Polyacetylene als Ursache eines Bittergeschmacks in Karotten und Karottenprodukten ist in der Literatur bislang nicht beschrieben worden. Trotzdem wurden deren Strukturen bereits in den späten Sechziger Jahren als Inhaltstoffe in Karotten (*Bentley und Thaller, 1967; Bentley et al., 1969*) sowie einigen *Apiaceae*, *Araliaceae* und *Asteraceae* beschrieben. *Garrod und Lewis (1979)* fanden bei mikroskopischen Untersuchungen Ansammlungen von extrazellulären Öltröpfchen im Periderm/Perizykelparenchym von Karotten, in denen sie als Hauptkomponente Falcarindiol identifizieren konnten. Diese Verbindung scheint somit in der Karotte extrazellulär in freier Form vorzuliegen. *Bentley und Thaller (1967)* gelang die Identifizierung des für Mäuse toxischen Carotatoxins als Falcarinol. In weiteren Untersuchungen zu den toxikologischen Eigenschaften der Polyacetylene fanden *Hansen und Boll (1986)*, dass die Verbindung Falcarinol beim Menschen eine allergene Kontaktdermatitis auslösen kann. In Studien zur Mutagenität von Falcarindiol konnten *Miyazawa et al. (1996)* für diese Verbindung eine antimutagene Aktivität nachweisen.

In weiteren Untersuchungen zur physiologischen Wirkung der polyacetylenischen Verbindungen als Phytoalexin fanden *Garrod et al. (1978)*, dass das Falcarindiol fungizide Eigenschaften gegen die für Lagerkrankheiten bei Karotten verursachenden Pilze *Mycocentrospora acerina* und *Cladosporium cladosporioides* besitzt. *Olsson und Svensson (1996)* bestätigten in ihren Untersuchungen die fungizide Wirkung des Falcarindiols gegenüber *Mycocentrospora acerina*. Zusätzlich konnten die Autoren auch eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* nachweisen.

Obwohl bislang eine Vielzahl an Untersuchungen zu den identifizierten Polyacetylenen durchgeführt wurden, ist die sensorische Qualität und die Bedeutung dieser Verbindungen als Bitterstoffe in Karotten und Karottenprodukten bisher nicht beschrieben worden. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals Verbindungen isoliert und identifiziert werden, die im Gegensatz

zum literaturbekannten 6-Methoxymellein maßgeblich an der Bitterkeit von Karotten und Karottenprodukten beteiligt sind.

2.2 Quantifizierung ausgewählter Bitterstoffe und Dosis/Aktivitäts-Korrelation in Karotten und Karottenprodukten

Um die Bedeutung der drei identifizierten Polyacetylene als Bitterstoffe in Karotten und Karottenprodukten zu evaluieren, sollten im Folgenden quantitative Bestimmungen erfolgen und die Gehalte der Verbindungen mit der sensorisch wahrgenommenen Bitterkeit von Karotten in Relation gebracht werden.

2.2.1 Synthese des internen Standards [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

Die Quantifizierung der identifizierten Bitterstoffe Falcarinol, Falcarindiol und Falcarindiol-3-acetat sollte mit der Methode des internen Standards durchgeführt werden. Bei der Auswahl eines geeigneten internen Standards für die drei Bisacetylene wurden an die zu verwendende Substanz folgende Voraussetzungen gestellt: sie sollte den Analyten in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften möglichst ähnlich, aber weiterhin von ihnen unterscheidbar sein und durfte weiterhin nicht bereits im Probenmaterial natürlich vorkommen. Da alle der identifizierten Polyacetylene in 9-Position eine *cis*-ständige Doppelbindung aufweisen und die entsprechenden *trans*-Verbindungen nicht gefunden werden konnten, erschien die Verbindung [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol ([E]-Falcarindiol) als interner Standard sehr geeignet. Das [E]-Falcarindiol wurde nach der in **Abbildung 28** dargestellten Synthesestrategie hergestellt:

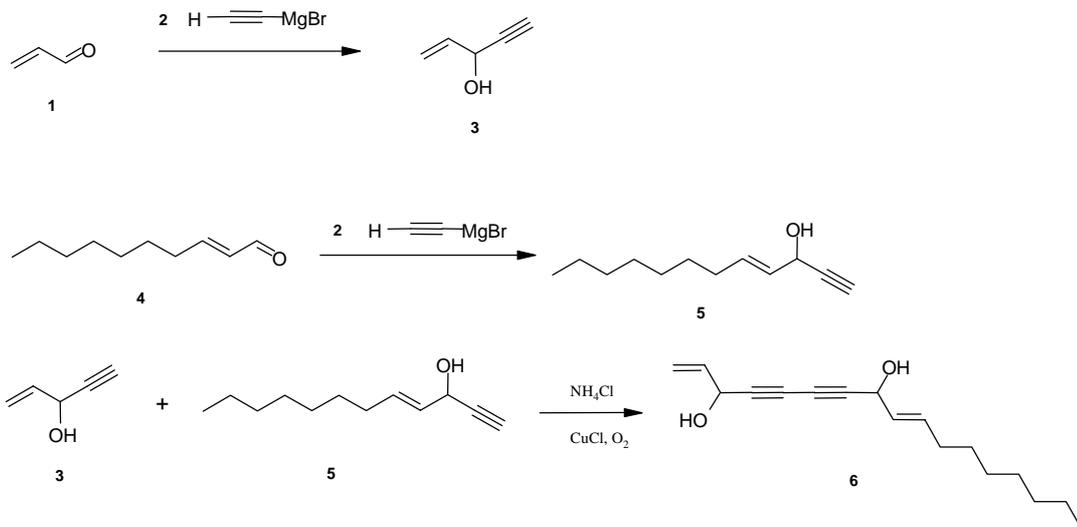


Abbildung 28 Synthese des internen Standards [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

Zunächst wurden frisch destilliertes Acrolein (1) und [E]-2-Decenal (4) in getrennten Ansätzen in einer Grignard-Reaktion jeweils mit Ethynylmagnesiumbromid (2) zu 1-Penten-4-yn-3-ol (3) bzw. [E]-4-Dodecen-1-yn-3-ol (5) umgesetzt. Diese beiden Produkte wurden anschließend durch Glaser-Kupplung zum Polyacetylen [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (6) verknüpft. Die Zielverbindung wurde danach durch Gelpermeationschromatographie von den entstandenen Nebenprodukten abgetrennt und über präparative HPLC in reiner Form gewonnen. Die Identität der Verbindung wurde mittels GC/MS und NMR-Spektroskopie überprüft.

Unter Verwendung des [E]-Falcarindiols als internem Standard sollten die Polyacetylene nun quantitativ bestimmt werden.

2.2.2 Gehalte an Bitterstoffen und Bestimmung von Bitteraktivitätswerten

Um die Bitterstoffe Falcarinol, Falcarindiol und Falcarindiol-3-acetat in Karotten und Karottenprodukten zu quantifizieren, musste zunächst ein geeignetes Analysenverfahren entwickelt werden. Mit dieser Methode sollte es zusätzlich möglich sein, den Gehalt an 6-Methoxymellein vergleichsweise mitzubestimmen.

Bei der daraufhin entwickelten Schnellmethode zur Quantifizierung (**Abbildung 29**) wurde das Untersuchungsmaterial (frische Karotten, Karottenbrei bzw. Karottensaft) zunächst genau eingewogen und die internen Standards [E]-Falcarindiol sowie 7-Methoxycumarin zugegeben. Der mit Natriumsulfat zu einem trockenen Pulver verriebene Brei bzw. die mit Hilfe des Ultra-Turrax zerkleinerten Karotten wurden anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Der Karottensaft wurde nach der Standardzugabe direkt mit Diethylether extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden über eine Kieselgelkartusche gereinigt und die Polyacetylene mittels HRGC/FID-Analyse (s. **Abbildung 30**) sowie 6-Methoxymellein mittels HPLC/UV quantifiziert. Mit diesem Schnellverfahren war es nun möglich, die Gehalte an 6-Methoxymellein sowie den drei Bisacetylenen in weniger als vier Stunden quantitativ zu bestimmen. In vergleichenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Schnellmethode mit dem unter 2.1.1.3 beschriebenen Quantifizierungsverfahren identische Methoxymelleinkonzentrationen lieferte.

Um die Gehalte der einzelnen Bitterstoffe mit der sensorisch wahrnehmbaren Bitterkeit der Karottenproben in Relation zu bringen, wurde im Folgenden die Bitterkeit der Proben von acht geschulten Prüfpersonen auf einer Skala von 0 (nicht bitter) bis 3 (stark bitter) bewertet und das sensorische Ergebnis mit den analytisch bestimmten Werten verglichen.

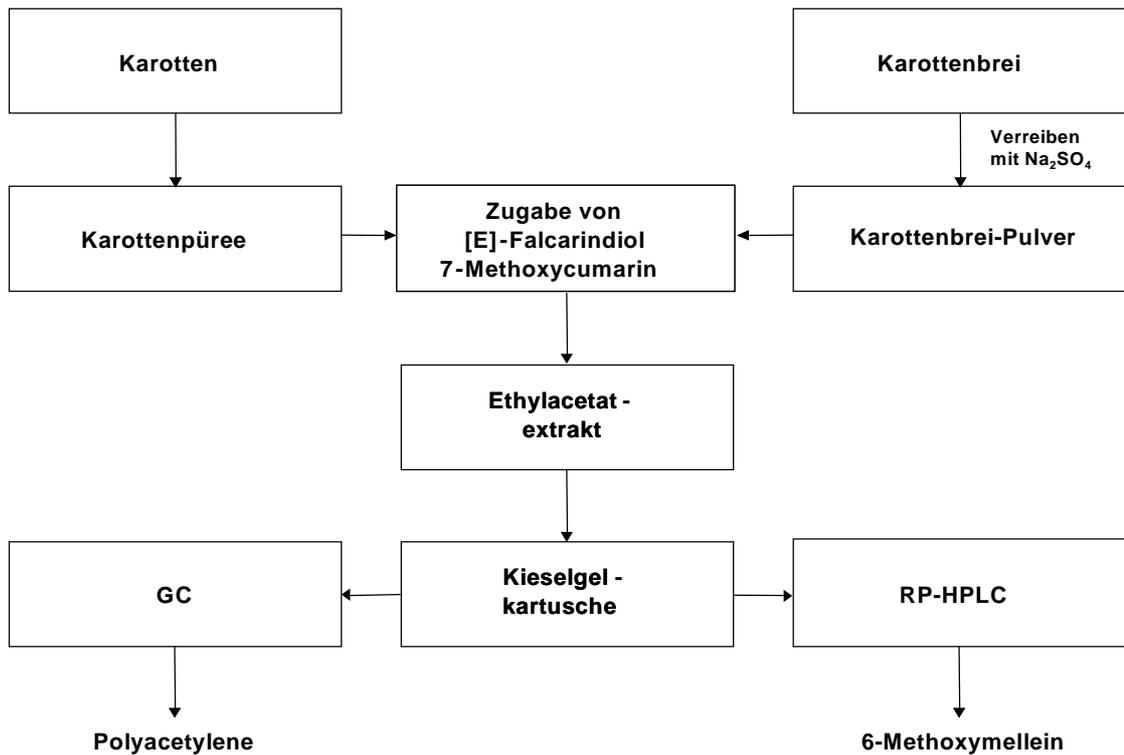


Abbildung 29 Aufarbeitungsschema für die Quantifizierung der Polyacetylene und des 6-Methoxymelleins in Karotten und Karottenbrei

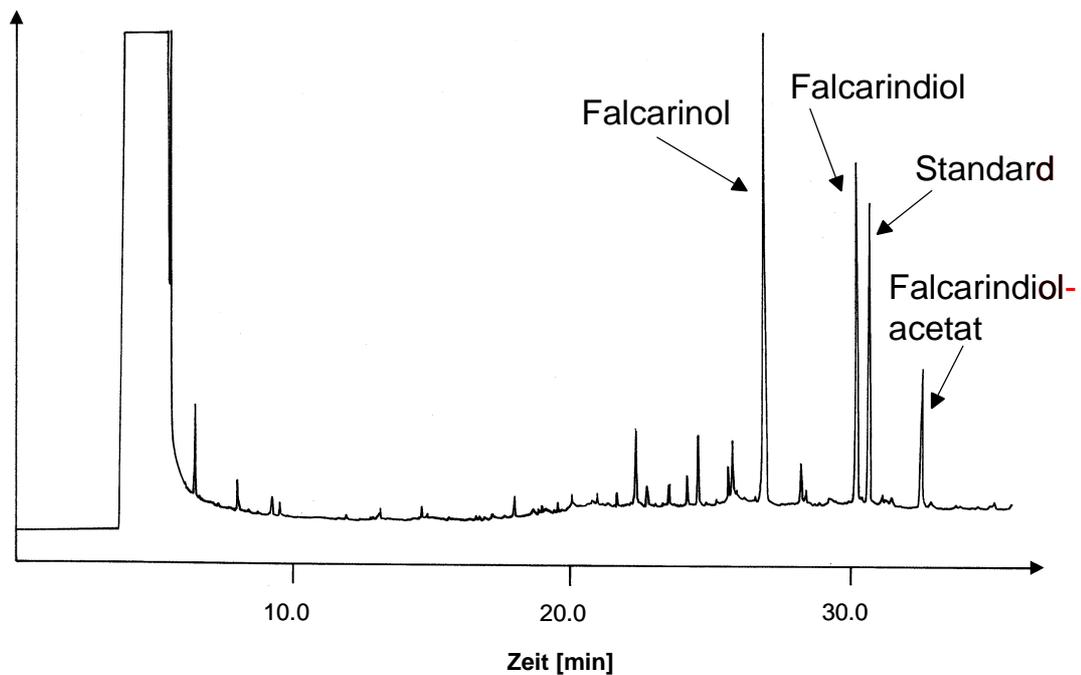


Abbildung 30 HRGC/FID-Chromatogramm der Bestimmung der Polyacetylene

2.2.2.1 Bitterstoffe in frischen Karotten

Unter Anwendung des entwickelten Bestimmungsverfahrens wurden in einer Warenkorbanalyse die Gehalte der Bitterstoffe Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein in sieben Karottenchargen aus dem Handel bestimmt.

Die Ergebnisse in **Tabelle 15** zeigen, dass die Verbindung Falcarinol in Konzentrationen zwischen 8,1 mg/kg und 27,5 mg/kg in den Karotten enthalten war. Die Verbindung Falcarindiol wurde in deutlich höheren Konzentrationen gefunden als das Falcarinol. Die Gehalte dieser Verbindung lagen zwischen 21,7 mg/kg und 84,3 mg/kg. Das Falcarindiol-3-acetat war in Konzentrationen zwischen 7,7 mg/kg und 40,8 mg/kg in den Karotten enthalten. Die mit Abstand geringsten Mengen wurden für die Verbindung 6-Methoxymellein bestimmt. Hier schwankten die Konzentrationen zwischen 0,1 mg/kg und 6,8 mg/kg. In den Proben 2 und 3 lag das 6-Methoxymellein sogar unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,1 mg/kg vor.

Tabelle 15 Gehalte an Polyacetylenen und 6-Methoxymellein in frischen Karotten

| Probe | Falcarinol [mg/kg] | Falcarindiol [mg/kg] | Falcarindiol- acetat [mg/kg] | Methoxy-mellein [mg/kg] | Bitterkeit (0-3) |
|-------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| 1 | 8,1 | 21,7 | 8,0 | 0,1 | 0,1 |
| 2 | 11,1 | 31,7 | 17,1 | <0,1 | 0,2 |
| 3 | 24,1 | 42,3 | 29,7 | <0,1 | 0,9 |
| 4 | 27,5 | 38,5 | 9,2 | 0,6 | 1,0 |
| 5 | 20,0 | 42,7 | 7,7 | 6,8 | 1,0 |
| 6 | 18,5 | 46,8 | 8,6 | 2,0 | 1,5 |
| 7 | 10,0 | 84,3 | 40,8 | 0,1 | 1,7 |

Bei Betrachtung der Bitteraktivitätswerte (**Abbildung 31**) fiel auf, dass die Gehalte an Falcarinol mit Ausnahme der Proben 3, 4 und 5 alle unterhalb der

Geschmacksschwelle von 20 mg/kg vorlagen und daher Bitteraktivitäten von < 1 besaßen. Das Falcarindiol lag dagegen unter Berücksichtigung der Geschmacksschwelle von 10 mg/kg in allen Karottenproben mit einem Bitteraktivitätswert von > 1 vor. Selbst bei der Probe 1 mit dem geringsten Gehalt von 21,7 mg/kg besaß diese bittere Verbindung bereits einen um Faktor 2,2 oberhalb der Geschmacksschwelle liegenden Aktivitätswert. In der Probe 7, bei der der höchste Gehalt an Falcarindiol gemessen wurde, lag die Bitteraktivität sogar bei 8,4. Da die Substanz Falcarindiol-3-acetat eine Geschmacksschwelle von 60 mg/kg besitzt, lagen alle Proben bezogen auf diese Verbindung deutlich unterhalb einer Bitteraktivität von 1 vor. Selbst die Probe 7, die mit 40,8 mg/kg die höchste Konzentration an Falcarindiol-3-acetat aufwies, erreichte nur eine Bitteraktivität von 0,7. Aufgrund der Geschmacksschwelle des 6-Methoxymelleins von 20 mg/kg, besaß diese Substanz in allen untersuchten Karottenproben eine Bitteraktivität, die deutlich < 1 lag. So erreichte z.B. die Probe 5 mit dem höchsten Methoxymelleingehalt von 6,8 mg/kg gerade mal eine Bitteraktivität von 0,3.

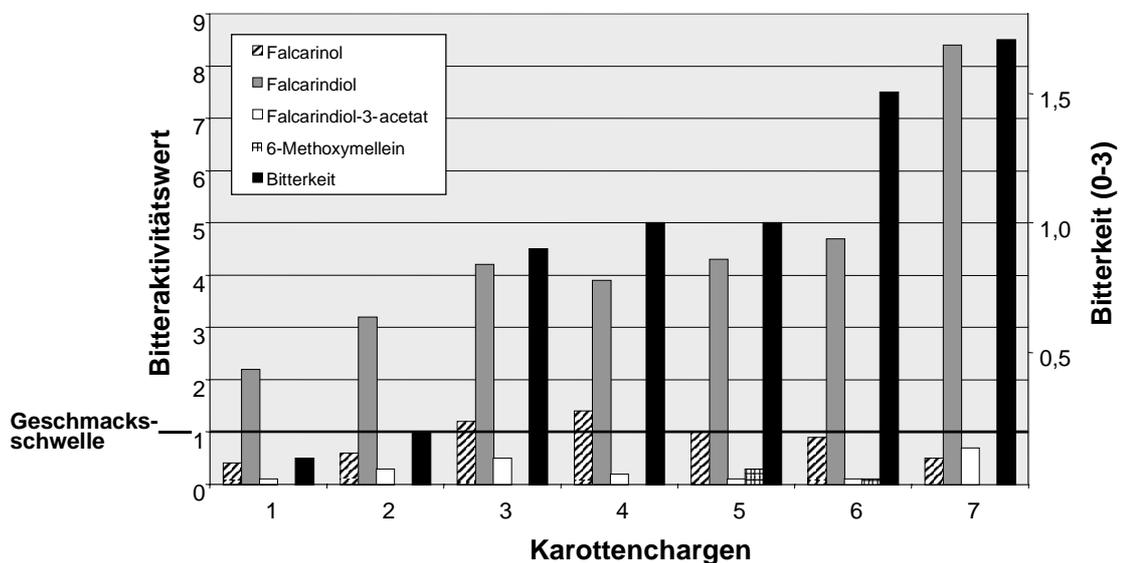


Abbildung 31 Bitteraktivitätswerte von Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein sowie sensorisch bestimmte Bitterintensität

Eine Korrelation zwischen Gesamtbitterkeit und dem quantitativen Vorkommen eines Bitterstoffes war beim Falcarindiol ersichtlich. Nur bei dieser Verbindung stieg die Konzentration in den Karotten mit der sensorisch bestimmten Bitterkeit gemeinsam an. Zur genaueren Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden aus diesem Grund weitere 28 Karottenproben auf den Gehalt an Falcarindiol untersucht und dieser graphisch gegen die Gesamtbitterkeit aufgetragen (**Abbildung 32**).

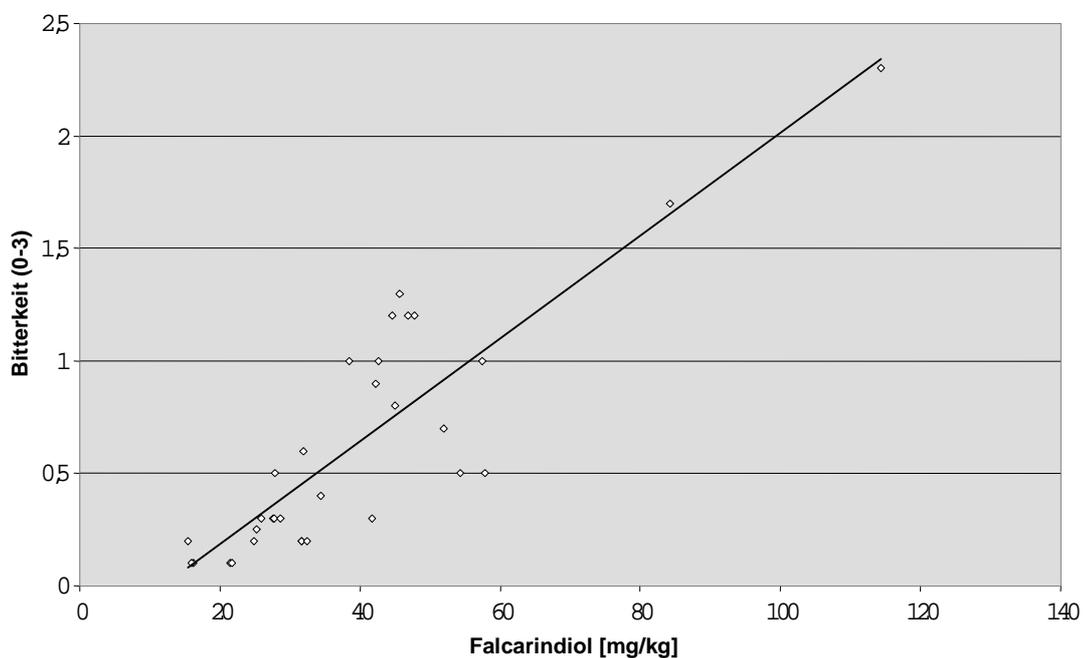


Abbildung 32 Korrelation zwischen Falcarindiolgehalt und Gesamtbitterkeit in Karotten

Wie in **Abbildung 32** dargestellt, zeigte die Quantifizierung von Falcarindiol für eine große Probenzahl eine gute Korrelation zwischen dem Bitterstoffgehalt und der sensorisch wahrnehmbaren Bitterintensität der Karotten auf. Somit ist es nun erstmals möglich, eine Substanz als Indikatormessgröße für die objektive Bewertung des Bittergeschmacks in Karotten zu nutzen.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob das Falcarindiol auch als Indikator für die Objektivierung der Bitterkeit von Karottenprodukten geeignet ist.

2.2.2.2 Bitterstoffe in Karottenbrei

Für die Quantifizierungen wurden acht unterschiedliche Karottenbrei-Proben verwendet.

Die quantitative Untersuchung der kommerziellen Karottenbreis ergab relativ stark schwankende Gehalte an Falcarindiol (**Tabelle 16**). So wurden in den vorliegenden Proben Gehalte zwischen 8,1 mg/kg und 21,6 mg/kg bestimmt. Die Verbindung Falcarinol konnte dagegen nur in recht geringen Konzentrationen zwischen 6,9 mg/kg und 11,4 mg/kg gefunden werden und die Substanz Falcarindiol-3-acetat lag in Konzentrationen zwischen 4,7 mg/kg und 8,9 mg/kg vor. Die mit Abstand geringsten Mengen wurden wiederum für die Verbindung 6-Methoxymellein bestimmt. Hier schwankten die Konzentrationen zwischen 0,3 mg/kg und 2,3 mg/kg.

Tabelle 16 Gehalte an Polyacetylenen und 6-Methoxymellein in Karottenbrei

| Probe | Falcarinol [mg/kg] | Falcarindiol [mg/kg] | Falcarindiol- acetat [mg/kg] | Methoxy- mellein [mg/kg] | Bitterkeit (0-3) |
|-------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| 1 | 7,1 | 8,1 | 5,2 | 0,3 | 0,5 |
| 2 | 7,9 | 10,9 | 4,7 | 0,3 | 1,0 |
| 3 | 9,8 | 13,2 | 5,8 | 0,8 | 1,0 |
| 4 | 6,9 | 13,8 | 6,9 | 0,3 | 1,0 |
| 5 | 10,3 | 14,0 | 6,3 | 0,5 | 1,0 |
| 6 | 11,4 | 16,9 | 8,9 | 1,2 | 1,5 |
| 7 | 7,4 | 21,0 | 5,0 | 0,2 | 2,0 |
| 8 | 7,9 | 21,6 | 7,2 | 2,3 | 2,0 |

Bei Betrachtung der Bitteraktivitätswerte war ersichtlich, dass die Verbindung Falcarindiol unter Berücksichtigung der Geschmacksschwelle von 10 mg/kg nur in Probe 1 mit einer Bitteraktivität von 0,8 knapp unterhalb ihrer Geschmacksschwelle vorlag (**Abbildung 33**). Alle übrigen Proben erreichten Bitteraktivitäten von 1,1 (Probe 2) bis 2,2 (Probe 8). Die ermittelten Konzentrationen an Falcarinol lagen dagegen alle unterhalb der Geschmacksschwelle dieser Substanz von 20 mg/kg vor. Selbst die Probe 6 erreichte mit einer Konzentration an Falcarinol von 11,4 mg/kg nur eine Bitteraktivität von 0,6. Da die Verbindung Falcarindiol-3-acetat eine Geschmacksschwelle von 60 mg/kg besitzt, lagen auch hier alle Proben deutlich unterhalb dieser Schwelle vor. Auch die Probe 6, die mit 8,9 mg/kg die höchste Konzentration an Falcarindiol-3-acetat aufwies, erreichte gerade einmal eine Bitteraktivität von 0,2. Die Probe 2, mit der geringsten Konzentration an Falcarindiol-3-acetat von 4,7 mg/kg, besaß sogar nur eine Bitteraktivität von 0,1. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch bei der Verbindung 6-Methoxymellein. Aufgrund ihrer Geschmacksschwelle von 20 mg/kg besaßen alle untersuchten Karottenproben eine Bitteraktivität, die deutlich < 1 lag. So erreichte z.B. die Probe 8 mit dem höchsten Methoxymelleingehalt von 2,3 mg/kg nur eine Bitteraktivität von 0,1. Die Substanz 6-Methoxymellein konnte daher nicht ursächlich am Bittergeschmack der vorliegenden Produkte beteiligt sein. Das Falcarindiol war somit im Karottenbrei die einzige der quantifizierten Verbindungen, die Bitteraktivitäten > 1 erreichte.

Der Vergleich der quantitativen Daten des Falcarindiols mit der Bitterkeit der Produkte zeigte erneut eine gute Korrelation der sensorisch wahrnehmbaren Bitterkeit mit den Gehalten dieser Verbindung (**Abbildung 33**).

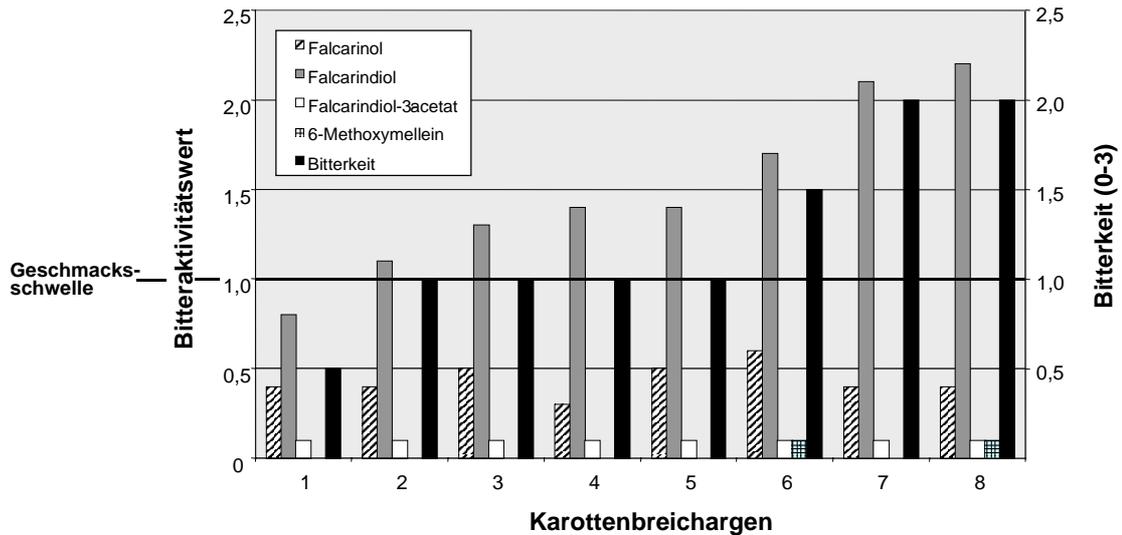


Abbildung 33 Bitteraktivitätswerte von Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und Methoxymellein sowie sensorisch bestimmte Bitterintensität in Karottenbrei

Da die Sensoriker alle Karottenbreis, die sie mit einer Bitterkeit von 1,5 und höher bewerteten als unangenehm bitter einstufen, war anhand des Falcarindiolgehalts eine Unterscheidung in die Gruppen „tolerierbare Bitterkeit“ (Proben 1 bis 5) und „nicht tolerierbare Bitterkeit“ (Proben 6 bis 8) beim Karottenbrei möglich. Proben, deren Gehalte an Falcarindiol $\geq 16,9$ mg/kg lagen, wurden stets mit einer nicht-tolerierbaren Bitterkeit bewertet. Bei den drei übrigen Bitterstoffen war dagegen keine Korrelation zwischen quantitativem Gehalt und Gesamtbitterkeit ersichtlich.

Zur weiteren Absicherung des Zusammenhangs zwischen Gesamtbitterkeit und Gehalt an Falcarindiol wurden weitere 15 Breiprobe auf den Gehalt dieses Bisacetyls untersucht (**Abbildung 34**). Zudem wurde wiederum die Bitterintensität der Karottenbreis auf einer Skala von 0 (nicht erkennbar) bis 3 (stark wahrnehmbar) sensorisch bestimmt. Das Sensorikpanel gab auch diesmal einstimmig an, dass bei einer Intensität von $\geq 1,5$ die Bitternote in den Proben sensorisch nicht mehr tolerierbar war.

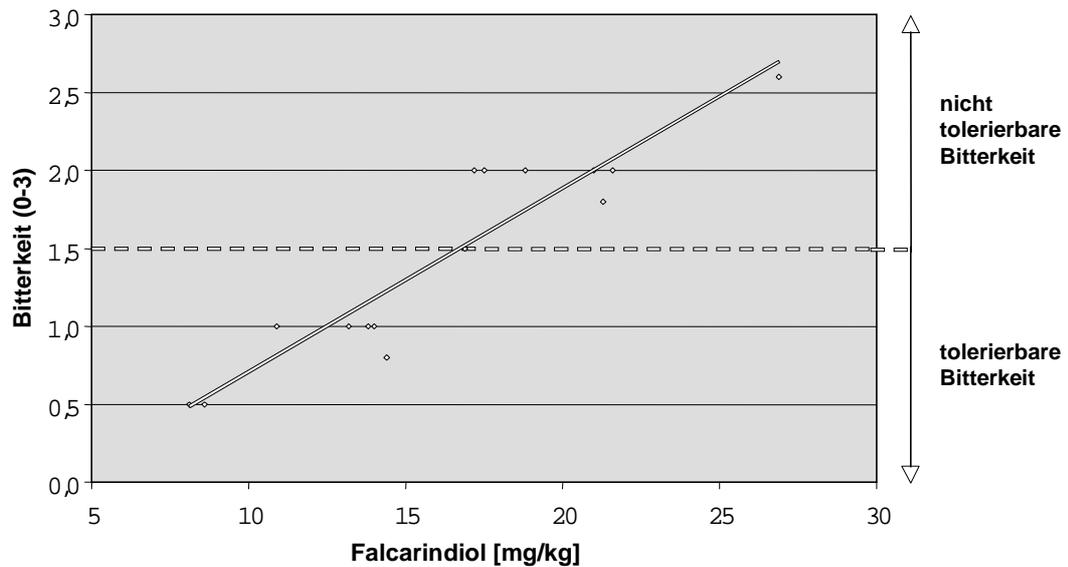


Abbildung 34 Korrelation zwischen Gesamtbitterkeit und Falcarindiolgehalt im Karottenbrei

Zusammengefasst zeigte die Gegenüberstellung der sensorischen und analytischen Daten somit erneut, dass mit zunehmender Bitterintensität der Proben auch der Gehalt an Falcarindiol anstieg.

2.2.2.3 Bitterstoffe in Karottensaft

Für die Quantifizierungen wurden sechs unterschiedliche Karottensäfte verwendet. Die Verbindung Falcarindiol wurde dabei in Konzentrationen zwischen 6,6 mg/kg und 20,6 mg/kg gefunden (**Tabelle 17**). Die Gehalte des Bitterstoffes Falcarinol lagen mit Werten zwischen 4,9 mg/kg und 12,7 mg/kg etwas unter den Konzentrationen, die für das Falcarindiol bestimmt wurden. Die Verbindung Falcarindiol-3-acetat konnte nur in sehr geringen Konzentrationen zwischen 3,5 mg/kg und 6,9 mg/kg gefunden werden. Die geringsten Mengen wurden jedoch wiederum für die Verbindung 6-Methoxymellein bestimmt. Hier schwankten die Konzentrationen zwischen 0,9 mg/kg und 3,8 mg/kg.

Tabelle 17 Gehalte an Polyacetylenen und 6-Methoxymellein in Karottensaft

| Probe | Falcarinol [mg/kg] | Falcarindiol [mg/kg] | Falcarindiol- acetat [mg/kg] | Methoxy- mellein [mg/kg] | Bitterkeit (0-3) |
|-------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| 1 | 5,5 | 6,6 | 3,5 | 2,1 | 0,3 |
| 2 | 6,2 | 8,1 | 3,9 | 2,2 | 0,3 |
| 3 | 4,9 | 11,4 | 3,8 | 0,9 | 0,5 |
| 4 | 7,5 | 14,3 | 5,7 | 3,8 | 0,5 |
| 5 | 12,7 | 17,6 | 5,9 | 2,7 | 0,5 |
| 6 | 7,2 | 20,6 | 6,9 | 1,6 | 1,0 |

Bei Betrachtung der Bitteraktivitätswerte war ersichtlich, dass unter Berücksichtigung der Geschmacksschwelle von 10 mg/kg, das Falcarindiol in fast allen Karottensaftproben, mit Ausnahme der Proben 1 und 2, eine Bitteraktivität von > 1 besaß (**Abbildung 35**). In der Probe 6, bei der der höchste Gehalt an Falcarindiol gemessen wurde, lag die Bitteraktivität z.B. um den Faktor 2,1 oberhalb der Geschmacksschwelle vor. Im Gegensatz dazu befanden sich beim Falcarinol alle ermittelten Gehalte unterhalb der Geschmacksschwelle von 20 mg/kg und besaßen daher Bitteraktivitäten von < 1 . Ähnlich sah es auch beim Falcarindiol-3-acetat aus. Da diese Substanz eine Geschmacksschwelle von 60 mg/kg besitzt, lagen alle Proben deutlich unterhalb dieser Schwelle vor. So erreichte z.B. die Probe 6, die mit 6,9 mg/kg die höchste Konzentration an Falcarindiol-3-acetat aufwies, nur eine Bitteraktivität von 0,1. Auch die Verbindung 6-Methoxymellein, die eine Geschmacksschwelle von 20 mg/kg aufweist, lag in allen untersuchten Karottensaftproben mit einer Bitteraktivität deutlich < 1 vor. So erreichte z.B. die Probe 4 mit dem höchsten 6-Methoxymelleingehalt von 3,8 mg/kg gerade einmal eine Bitteraktivität von 0,2.

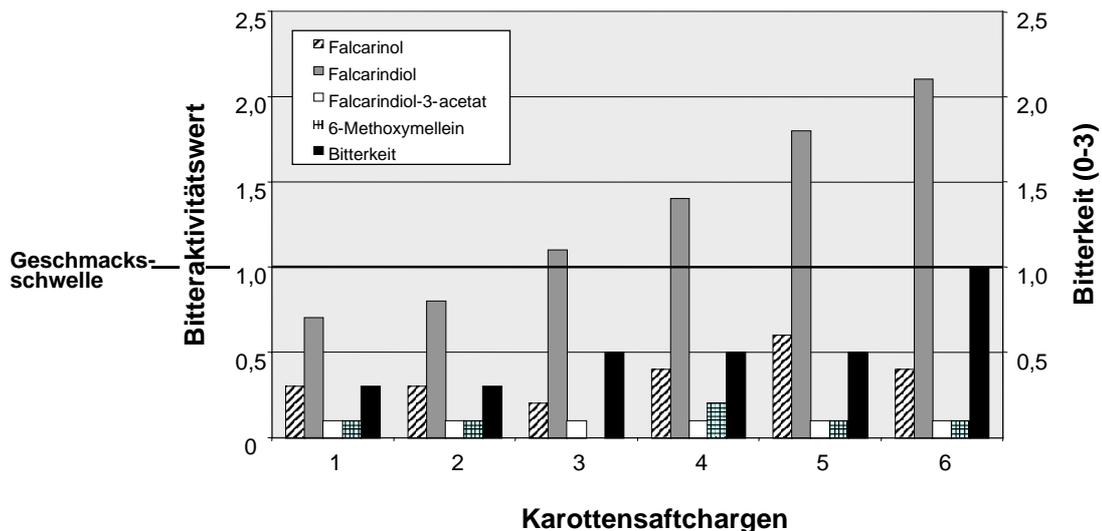


Abbildung 35 Bitteraktivitätswerte von Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und Methoxymellein sowie sensorisch bestimmte Bitterintensität in Karottensaft

Insgesamt zeigten diese Studien auch für Karottensäfte eine gute Korrelation zwischen den Gehalten des Bitterstoffs Falcarindiol und der sensorisch wahrnehmbaren Bitterkeit auf.

2.2.3 Diskussion

Zur Quantifizierung der bisacetylenischen Bitterstoffe wurde in einer dreistufigen Synthese das [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diol-3,8-diol ([E]-Falcarindiol) dargestellt und als interner Standard eingesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entwicklung einer analytischen Schnellmethode zur simultanen Quantifizierung der drei Bisacetylene und des 6-Methoxymelleins. Die Methode besteht aus einer Ethylacetat-Extraktion, einer Aufreinigung der Bitterstoffe an Kieselgel, sowie einer analytischen Trennung durch Gaschromatographie bzw. HPLC. Die Quantifizierung erfolgt über das FID- bzw. das UV-Signal mit Hilfe der internen Standards [E]-Falcarindiol bzw. 7-Methoxycumarin.

Die anschließenden Quantifizierungen wurden zunächst mit verschiedenen Karottenchargen durchgeführt. Hierbei war ersichtlich, dass die Verbindung Falcarindiol in allen untersuchten Karotten jeweils mit Werten von 21,7 mg/kg bis 84,3 mg/kg die höchsten Konzentration der vier Bitterstoffe aufwies. Die mit dieser Schnellmethode erhaltenen Werte liegen in etwa in den gleichen Größenordnungen, wie die derzeit in der Literatur publizierten Gehalte an Falcarinol, Falcarindiol und Falcarindiol-3-acetat in Karotten. So quantifizierten *Wulf et al.* (1978) das Falcarinol mittels HPLC nach vorangegangener Wasserdampfdestillation. Die Autoren verwendeten 2-Methoxynaphthalin als internen Standard und ermittelten eine durchschnittliche Konzentration von 39,6 mg/kg. Mit der neu entwickelten Schnellmethode wurden etwas geringere Gehalte gefunden, die zwischen 8,1 und 27,5 mg/kg liegen.

Yates und England (1982) extrahierten Karotten mit Dichlormethan, reinigten den Extrakt über eine Kieselgelsäule und quantifizierten die Verbindungen Falcarinol und Falcarindiol über Gaschromatographie mit Methylpalmitat als internem Standard. Die durchschnittlich mit dieser Methode erhaltenen Konzentrationen an Falcarinol von 19,1 mg/kg und Falcarindiol von 43,2 mg/kg liegen im Bereich der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Werte von 8,1 bis 27,5 mg/kg für Falcarinol und 21,7 bis 84,3 mg/kg für Falcarindiol.

Eine weitere Quantifizierungsmethode wurde von *Lund und White* (1990) erarbeitet. Die Autoren extrahierten die Karotten mit t-Butylmethylether und reinigten den Extrakt über eine Cyanopropyl Sepralyte Säule. Nach Isolierung der Verbindungen Falcarinol, Falcarindiol und Falcarindiol-3-acetat über präparative Dünnschichtchromatographie wurden die Verbindungen eluiert und die Rückstände ausgewogen. Mit dieser Methode erhielten sie eine durchschnittliche Konzentration von Falcarinol von 11,4 mg/kg, von Falcarindiol von 43,2 mg/kg und von Falcarindiol-3-acetat von 17,4 mg/kg.

Weiterhin ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen, eine Korrelation zwischen dem Gehalt an Falcarindiol und der sensorisch wahrnehmbaren Bitterkeit der Karotten aufzuzeigen und somit das Falcarindiol als analytische Messgröße für die Objektivierung des bitteren Fehlgeschmacks von Karotten vorzuschlagen. Dieser Zusammenhang zwischen Gesamtbitterkeit und quantitativem Gehalt an Falcarindiol konnte auch in unterschiedlichen

Karottenbreichargen sowie Karottensaft verifiziert werden. Hier war es weiterhin möglich, die Karottenprodukte anhand des Falcarindiolgehalts in die Kategorien „tolerierbare Bitterkeit“ und „nicht tolerierbare Bitterkeit“ einzuteilen.

Da die Bestimmung des Falcarindiols mit der entwickelten Methode in weniger als vier Stunden möglich ist, liegt somit erstmals eine Schnellmethode vor, um in kurzer Zeit anhand der Messung des Indikatorbitterstoffes Falcarindiol Informationen über die Bitterkeit von Karotten und Karottenprodukten zu erhalten.

2.3 Quantitative Studien zum Einfluss der Sorte, der Morphologie und der Verarbeitung auf den Gehalt an Bitterstoffen in Karotten

Unter Verwendung des entwickelten Quantifizierungsverfahrens sollte nun der Einfluss der Sorte, der Morphologie und der Verarbeitung auf den Bitterstoffgehalt untersucht werden.

2.3.1 Abhängigkeit des Bitterstoffgehaltes von der Karottensorte

Zur Untersuchung der Sortenabhängigkeit der Bitterstoffbildung wurden unterschiedliche Karottensorten im frischen Zustand auf Bittergeschmack geprüft und die bisacetylenischen Bitterstoffe sowie das 6-Methoxymellein in den Karottenproben quantitativ bestimmt (**Tabelle 18**).

Um zudem eine Aussage über den Einfluss des Bodens treffen zu können, wurden Karotten verwendet, die auf vier verschiedenen Feldern angebaut wurden (**Tabelle 19**). Die in **Tabelle 18** und **Tabelle 19** angegebenen Daten sind nach steigendem Bittergeschmack sortiert. Die 21 untersuchten Proben wiesen deutliche Unterschiede in der sensorisch bestimmten Bitterkeit auf (**Tabelle 18**). Diese variierte von einer Bewertung von 0,1 bis 1,7, wobei der

Großteil der Karotten eine Bitterkeit zwischen 0,1 und 0,3 aufwies. Zu diesen sehr schwach bitteren Karotten gehörten u.a. die Sorten Bersky, Fayette, Infinity, Bremen und Kingston. Stärkerer Bittergeschmack war bei den Sorten Kathmandu, Bangor, Nandrin, Kamaran und Sunset festzustellen, die mit Bitterintensitäten von 0,9 bis 1,7 bewertet wurden.

Die Verbindung 6-Methoxymellein war wiederum nur in sehr geringen Konzentrationen in den untersuchten Sorten vorhanden. Der höchste Gehalt lag bei 6,1 mg/kg und wurde in der Sorte Fayette gefunden. Die Verbindung Falcarinol wurde in Konzentrationen von 4,6 mg/kg in der Sorte Bremen bis 37,4 mg/kg in der Sorte 2549 bestimmt. Der durchschnittliche Gehalt aller untersuchten Proben lag bei 15,3 mg/kg.

Deutliche Schwankungen in den Gehalten war auch bei der Verbindung Falcarindiol-3-acetat festzustellen. Hier lagen die Werte zwischen 7,0 mg/kg in der Sorte Florida und 40,8 mg/kg in der Sorte Sunset. Der durchschnittliche Gehalt aller untersuchten Proben lag bei 18,8 mg/kg.

Große Unterschiede in den Konzentrationen wurden ebenfalls bei der Verbindung Falcarindiol gefunden. Die Gehalte schwankten hier zwischen 15,5 mg/kg in der Sorte Kazan (2) und 84,3 mg/kg in der Sorte Sunset. Der durchschnittliche Gehalt der Verbindung Falcarindiol lag bei 36,6 mg/kg und damit deutlich oberhalb der durchschnittlichen Gehalte der drei anderen Bitterstoffe. Aufgrund der Geschmacksschwelle von 10 mg/kg wurden damit Bitteraktivitäten zwischen 1,6 und 8,4 erreicht. Somit leistete auch in dieser Untersuchung von den vier Bitterstoffen das Falcarindiol den größten Beitrag zur Gesamtbitterkeit.

Tabelle 18 Untersuchung unterschiedlicher Karottensorten

| Sorte | Methoxymellein [mg/kg] | Falcarinol [mg/kg] | F-acetat ¹ [mg/kg] | F-diol ² [mg/kg] | BA F-diol ³ | Bitterkeit (0-3) |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------|
| B2596 ^b | 2,4 | 11,4 | 19,7 | 21,5 | 2,2 | 0,1 |
| Bersky ^b | < 0,1 | 5,2 | 8,9 | 16,2 | 1,6 | 0,1 |
| Florida ^b | 0,3 | 30,9 | 7,0 | 16,0 | 1,6 | 0,1 |
| 2549 ^b | 0,1 | 37,4 | 8,1 | 27,7 | 2,8 | 0,1 |
| Fayette ^a | 6,1 | 10,5 | 11,0 | 24,9 | 2,5 | 0,2 |
| Kazan (1) ^a | 0,1 | 7,9 | 15,3 | 33,0 | 3,3 | 0,2 |
| Agri 99-791 ^a | 0,2 | 7,0 | 27,4 | 31,7 | 3,2 | 0,2 |
| Infinity ^b | < 0,1 | 11,1 | 17,1 | 31,7 | 3,2 | 0,2 |
| Kazan (2) ^b | 0,3 | 20,8 | 16,9 | 15,5 | 1,6 | 0,2 |
| Maxima ^a | 0,2 | 18,6 | 18,4 | 41,7 | 4,2 | 0,3 |
| Bremen ^b | < 0,1 | 4,6 | 11,9 | 25,9 | 2,6 | 0,3 |
| Kingston ^b | 0,8 | 15,5 | 16,2 | 32,4 | 3,2 | 0,3 |
| Joba (1) ^b | 0,2 | 26,5 | 40,7 | 33,2 | 3,3 | 0,3 |
| Joba (2) ^a | < 0,1 | 24,1 | 29,7 | 42,3 | 4,2 | 0,6 |
| B2588 ^b | 0,1 | 15,0 | 20,6 | 66,4 | 6,6 | 0,7 |
| Kathmandu (1) ^a | < 0,1 | 6,5 | 17,8 | 44,1 | 4,4 | 0,9 |
| Bangor ^b | < 0,1 | 16,0 | 18,7 | 45,0 | 4,5 | 0,9 |
| Nandrin ^b | 0,4 | 23,6 | 12,1 | 43,5 | 4,4 | 0,9 |
| Kamaran ^b | 0,1 | 12,0 | 8,8 | 46,4 | 4,6 | 1,2 |
| Kathmandu (2) ^b | < 0,1 | 6,1 | 28,3 | 45,7 | 4,6 | 1,3 |
| Sunset ^a | 0,1 | 10,0 | 40,8 | 84,3 | 8,4 | 1,7 |

^{a,b} Sorten mit gleichem Buchstaben wuchsen auf dem gleichen Feld

¹ Gehalt an Falcarindiol-3-acetat

² Gehalt an Falcarindiol

³ Bitteraktivität des Falcarindiols

Weiterhin fällt auf, dass wiederum eine recht gute Korrelation zwischen dem Gehalt an Falcarindiol und der sensorisch bestimmten Bitterkeit existierte. So lag die Konzentration in den mit Werten zwischen 0,1 und 0,3 als leicht bitter bewerteten Karotten zwischen 15,5 mg/kg und 41,7 mg/kg während die Karotten, die mit Bitterkeiten zwischen 0,9 und 1,7 als deutlich bitterer bewertet wurden, Gehalte zwischen 43,5 und 84,3 mg/kg aufwiesen (**Tabelle 18**).

Die Karotten der Sorten Sunset und Joba (1) verursachten zusätzlich zur Bitterkeit einen deutlich wahrnehmbaren brennenden Eindruck auf der Zunge und im Mund-Rachen-Raum, der stark an die sensorischen Eigenschaften der Verbindung Falcarindiol-3-acetat erinnerte. Da diese Verbindung in den betreffenden Karotten mit 40,8 mg/kg bzw. 40,7 mg/kg deutlich oberhalb des Schwellenwertes für die brennende Geschmacksempfindung von 15 mg/kg vorlag, ist ein Zusammenhang durchaus wahrscheinlich.

Zur Untersuchung der Auswirkung der Bodenbeschaffenheit auf die Bitterstoffbildung wurden je drei Proben der Sorten Kazan und Kamaran analysiert, die auf unterschiedlichen Feldern gewachsen waren (**Tabelle 19**).

Bei der sensorischen Untersuchung wurde die Bitterkeit der Proben der Sorte Kazan mit den Werten 0,2, 0,2 und 0,5 bewertet. Somit wiesen alle drei Proben nur einen geringen Bittergeschmack auf. Im Gegensatz dazu bewerteten die Sensoriker die Proben der Sorte Kamaran mit Werten von 1,2, 1,5 und 2,0 als deutlich bitterer. Da jeweils die drei Proben der gleichen Sorte auf unterschiedlichen Feldern gewachsen waren, jedoch sortenintern ähnliche Bitterkeiten zeigten, schien die Beschaffenheit des Bodens im vorliegenden Fall keinen größeren Einfluss auf die Bitterstoffbildung gehabt zu haben. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die Proben Kazan (2) und Kamaran (1) sowie Kazan (3) und Kamaran (3), die jeweils auf den gleichen Feldern gewachsen waren, völlig unterschiedliche Bitterkeiten aufwiesen.

Tabelle 19 Einfluss der Bodenbeschaffenheit auf die Bitterstoffbildung

| Sorte | 6-Methoxymellein [mg/kg] | Falcarinol [mg/kg] | F-acetat ¹ [mg/kg] | F-diol ² [mg/kg] | BA F-diol ³ | Bitterkeit (0-3) |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Kazan (1) ^a | 0,1 | 7,9 | 15,3 | 33,0 | 3,3 | 0,2 |
| Kazan (2) ^b | 0,3 | 20,8 | 16,9 | 15,5 | 1,6 | 0,2 |
| Kazan (3) ^d | 0,6 | 27,5 | 9,2 | 38,5 | 3,9 | 0,5 |
| Kamaran (1) ^b | 0,1 | 12,0 | 8,8 | 46,4 | 4,6 | 1,2 |
| Kamaran (2) ^c | 2,0 | 18,5 | 8,6 | 46,8 | 4,7 | 1,5 |
| Kamaran (3) ^d | 7,8 | 7,0 | 32,4 | 114,3 | 11,4 | 2,0 |

^{a,b,c,d} Sorten mit gleichem Buchstaben wuchsen auf dem gleichen Feld

¹ Gehalt an Falcarindiol-3-acetat

² Gehalt an Falcarindiol

³ Bitteraktivität des Falcarindiols

2.3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Morphologie auf die Bitterstoffverteilung sowie zum Einfluss technologischer Prozesse auf den Polyacetylen- und 6-Methoxymelleingehalt

Zunächst sollte der Einfluss der Morphologie auf die Verteilung der Bitterstoffe innerhalb der verschiedenen Gewebeschichten der Karotte untersucht werden.

2.3.2.1 Einfluss der Morphologie

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Lokalisierung der bisacetylenischen Bitterstoffe und des 6-Methoxymelleins in der Karotte zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden die Karotten in der Mitte quer in eine vordere Hälfte (Spitze) und eine hintere Hälfte (Endstück) geteilt. In einem weiteren Versuch wurden Xylem und Phloem (mit Schale) separiert. Die so erhaltenen Karottenteile wurden anschließend getrennt analytisch und sensorisch auf ihre Gehalte an Bitterstoffen untersucht (**Tabelle 20**).

Tabelle 20 Gehalte an bisacetylenischen Bitterstoffen und 6-Methoxymellein sowie sensorisch bestimmte Bitterkeit in verschiedenen Karottenteilen

| | Konzentration [mg/kg] in | | | |
|---------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------------|--------------|
| | Endstück | Spitze | Phloem ¹ | Xylem |
| Falcarinol | 24,0 | 20,4 | 28,6 | 24,7 |
| Falcarindiol | 33,5 | 18,7 | 33,2 | 14,9 |
| Falcarindiolacetat | 15,2 | 8,0 | 11,5 | 13,3 |
| Methoxymellein | 0,2 | 0,2 | 0,3 | < 0,1 |
| Bitterkeit | 0,5 | 0 | 0,6 | 0,2 |

¹ inklusive Schale

Aus **Tabelle 20** ist ersichtlich, dass die Verbindungen Falcarinol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein mit Werten von 20,4 - 28,6 mg/kg, 8,0 - 15,2 mg/kg und bis zu 0,3 mg/kg jeweils über die gesamte Karotte relativ gleichmäßig verteilt waren und somit sowohl im Endstück der Spitze als auch im Xylem und Phloem in vergleichbaren Konzentrationen vorlagen. Dagegen war das Falcarindiol im Endstück mit einem Gehalt von 33,5 mg/kg und im Phloem mit einem Gehalt von 33,2 mg/kg in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden als in der Karottenspitze (18,7 mg/kg) und im Xylem (14,9 mg/kg). Diese Befunde deckten sich auch mit der sensorisch bestimmten Bitterkeit (**Abbildung 36**). Weiterhin ist aus **Abbildung 36** ersichtlich, dass die Verbindung Falcarindiol in allen Karottenteilen die höchsten Bitteraktivitätswerte aufwies. Diese reichten von Werten > 3 im Endstück und im Phloem über einen Wert von ca. 2 in der Karottenspitze bis zu einem Wert von 1,5 im Xylem. Alle diese Werte lagen somit oberhalb der Geschmacksschwelle vor. Auch die Verbindung Falcarinol war in allen Karottenteilen mit Bitteraktivitäten zwischen 1,0 und 1,4 knapp oberhalb der Geschmacksschwelle vorhanden. Für die Verbindungen Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein konnten dagegen in allen untersuchten Karottenteilen nur Bitteraktivitäten berechnet werden, die jeweils deutlich unter 0,5 lagen und somit die jeweiligen Geschmacksschwellen nicht erreichten.

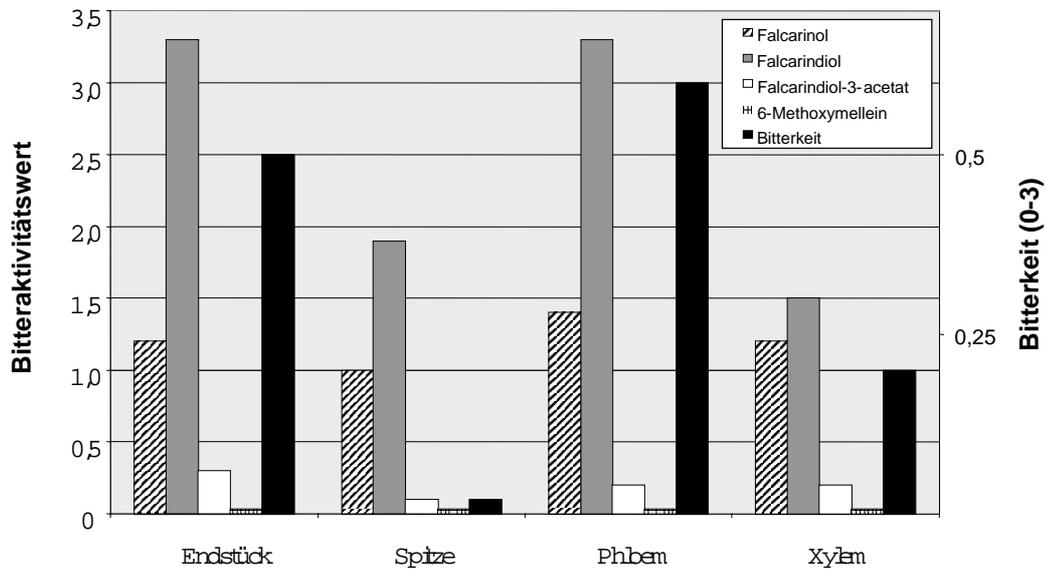


Abbildung 36 Bitteraktivitätswerte von Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und Methoxymellein sowie sensorisch bestimmte Bitterintensität in verschiedenen Karottenteilen

2.3.2.2 Einfluss der industriellen Karottenbreiherstellung

Bei der industriellen Karottenbreiherstellung werden frische Karotten zunächst gewaschen und anschließend im Dampfschäler von der Schale befreit. Die geschälten Karotten werden in Würfel von etwa 10 mm Kantenlänge geschnitten und von einer Fotozelle optisch auf Farbveränderungen (hauptsächlich grüne und schwarze Stellen) geprüft. Unerwünschte Würfel werden mit Hilfe eines Pressluftstrahls aussortiert. Die übrigen Würfel werden weiter zerkleinert, nach Wasserzugabe gekocht und heiss in Gläschen abgefüllt. Die Gläschen werden unter Vakuum verschlossen und im Anschluss sterilisiert.

Zur Untersuchung der Veränderungen im Polyacetylen- und Methoxymellein-gehalt während dieser Herstellungsprozedur wurden aus der laufenden Produktion frische gewaschene Karotten, dampfgeschälte Karotten, akzeptable sowie

aussortierte Karottenwürfel, unsterilisierten und sterilisierten Brei entnommen und die Zielverbindungen quantitativ bestimmt (**Tabelle 21**).

Tabelle 21 Konzentrationen der Bitterstoffe in Produkten der industriellen Karottenbreiherstellung

| Probe | Konzentration [mg/kg] an | | | |
|----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | F-ol ¹ | F-2ol ² | F-Ace ³ | MM ⁴ |
| Karotten (gewaschen) | 15,2 | 36,9 | 17,9 | 1,9 |
| Karotten (geschält) | 14,4 | 12,3 | 9,7 | 0,2 |
| Würfel | 13,4 | 16,7 | 11,8 | 0,2 |
| Würfel (aussortiert) | 14,9 | 36,2 | 18,0 | 0,6 |
| Brei (unsteril) | 10,7 | 16,8 | 14,3 | 0,5 |
| Brei (steril) | 10,9 | 17,2 | 13,4 | 0,5 |

¹ Falcarinol

² Falcarindiol

³ Falcarindiol-3-acetat

⁴ 6-Methoxymellein

Die Werte in **Tabelle 21** bzw. **Abbildung 37** zeigten eine deutliche Veränderung in den Gehalten an Falcarindiol, während die Konzentrationen der anderen Substanzen mehr oder weniger konstant blieben. So schwankte der Gehalt an Falcarindiol von 12,3 mg/kg bis 36,9 mg/kg während z.B. die Konzentration von Falcarinol nur eine Veränderung zwischen 10,7 mg/kg und 15,2 mg/kg zeigte. Die stärkste Veränderung im Falcarindiolgehalt war nach der Dampfschälung zu beobachten. Hier kam es zu oben beschriebener Abnahme von 36,9 mg/kg auf 12,3 mg/kg, also auf 1/3 des Wertes vor der Schälung. Dies ließ den Schluss zu, dass die höchsten Falcarindiolgehalte in den Karottenrandschichten vorliegen und bestätigte damit das Ergebnis aus den Untersuchungen zur Lokalisierung der Bitterstoffe im Gewebe (s. 2.3.2.1).

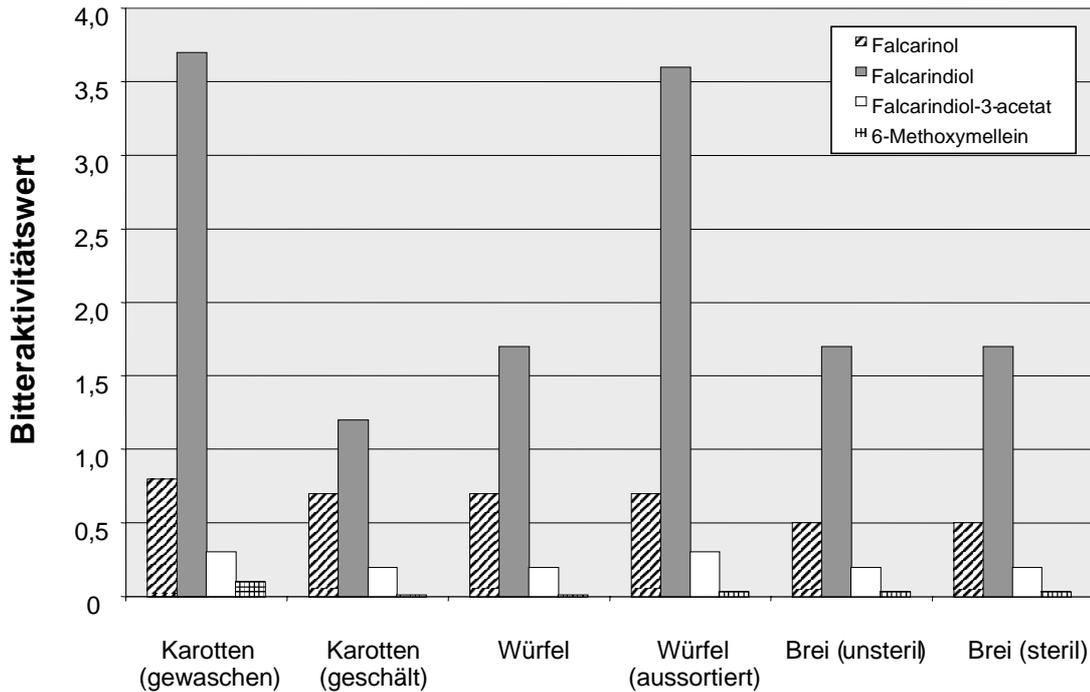


Abbildung 37 Einfluss der industriellen Breiherstellung auf die Bitteraktivitätswerte der Verbindungen Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein in Zwischen- und Endprodukten

Weiterhin war mit 36,2 mg/kg ein relativ hoher Falcarindiolgehalt in den aussortierten Würfeln vorhanden, die überwiegend aus grünen Endstücken bzw. schwarzen Karottenrandschichten bestanden. Dies korreliert sehr gut mit der Erkenntnis, dass das Falcarindiol in diesen Bereichen der Karotte in relativ hohen Konzentrationen vorliegt.

Der Koch- und Sterilisationsprozesses scheint hingegen kaum eine mengenmäßige Veränderung in den Bitterstoffgehalten zu bewirken. So sank beispielsweise während dieser Prozedur der Gehalt an Falcarinol nur von 13,4 mg/kg auf 10,9 mg/kg. Ein temperaturbedingter Abbau der Substanzen kann somit ausgeschlossen werden.

Bei Betrachtung der Bitteraktivitäten (**Abbildung 37**) fällt auf, dass nur die Verbindung Falcarindiol einen Bitteraktivitätswert > 1 besaß und somit während

der gesamten Herstellungsprozedur oberhalb der Geschmacksschwelle vorlag. Alle übrigen Bitterstoffe lagen unterhalb ihrer Schwellenwerte vor. Die Verbindung Falcarinol besaß Bitteraktivitäten $> 0,5$, die Substanzen Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein lagen dagegen deutlich unterhalb dieses Bitteraktivitätswertes vor.

2.3.2.3 Einfluss des Blanchierens

Um weitere Kenntnis über den Einfluss technologischer Verfahren auf die Gehalte der Bitterstoffe in Karotten zu gewinnen, wurde die Konzentration an Falcarinol, Falcarindiol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein in Karotten vor und nach dem Blanchieren gemessen.

Hierzu wurden Karotten in Würfel mit 0,5 cm Kantenlänge geschnitten und 30 Sekunden in kochendem Wasser blanchiert. Anschließend wurden die Würfel mit Zellstoff kurz abgetrocknet und danach zur Bitterstoff-Quantifizierung eingesetzt. In einem Kontrollansatz wurden nicht blanchierten Karottenwürfel auf gleiche Weise untersucht.

Wie aus **Abbildung 38** ersichtlich, nahmen die Gehalte an Falcarinol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein während des Blanchierprozesses etwa um 40 % ab. So sank z.B. der Gehalt an Falcarinol von 13,2 mg/kg in den frischen Karotten auf 7,7 mg/kg nach dem Blanchieren. Die Konzentration von Falcarindiol-3-acetat nahm von 10,1 mg/kg auf 5,7 mg/kg ab. Der drastischste Konzentrationsabfall wurde jedoch für das Falcarindiol gemessen. Hier sank der Gehalt von 47,7 mg/kg vor dem Blanchieren um Faktor 3 auf eine Konzentration von 17,1 mg/kg.

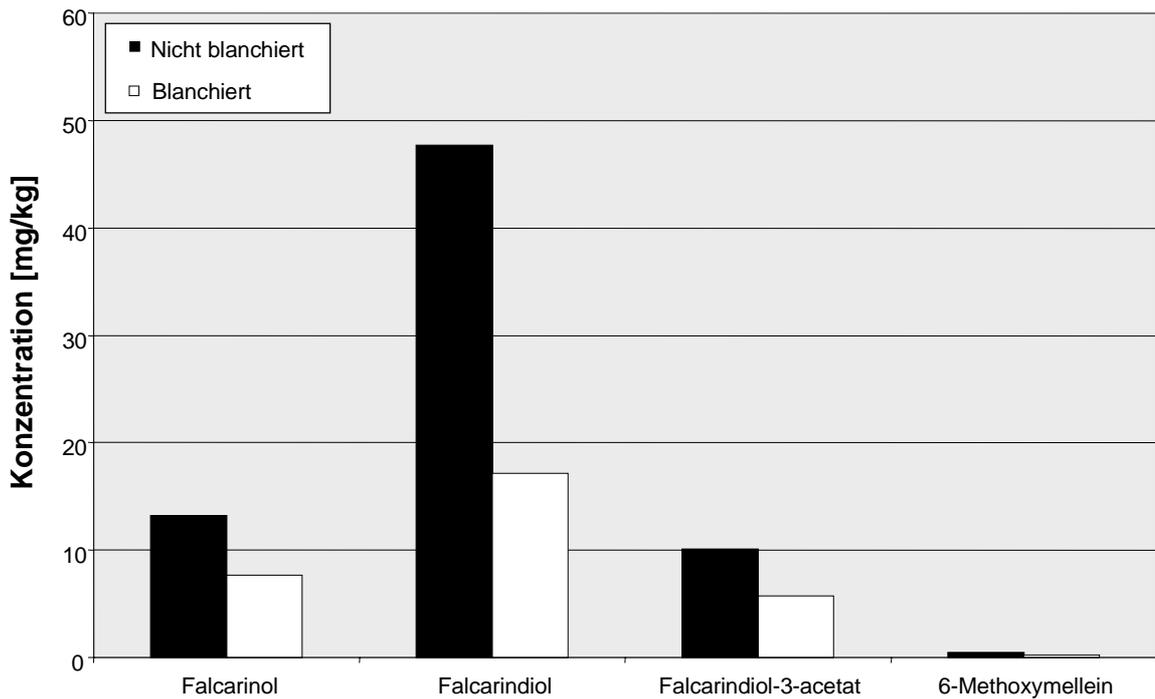


Abbildung 38 Vergleich der Polyacetylen- und Methoxymelleingehalte von blanchierten und nicht blanchierten Karottenwürfeln

2.3.3 Diskussion

Die Untersuchung verschiedener Karottensorten ergab, dass Unterschiede in den Bitterkeiten bestanden. So wurde bei den analysierten Karotten ein stärkerer Bittergeschmack in den Sorten Bangor, Kamarin, Kathmandu, Nandrin und Sunset gefunden, die mit Bitterintensitäten zwischen 0,9 und 1,7 bewertet wurden. Andere Sorten, wie z.B. Bersky, Fayette, Florida, oder Infinity, erreichten dagegen nur Werte zwischen 0,1 und 0,2.

Im Gegensatz dazu schien die jeweilige Bodenbeschaffenheit bei den hier untersuchten Karotten keinen größeren Einfluss auf die Bitterstoffbildung gehabt zu haben, da auf jeweils gleichen Feldern sowohl bittere als auch nicht bittere Karotten gewachsen sind. Hätte allein die Beschaffenheit des Bodens einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung des Bittergeschmacks gehabt,

so müssten alle Karotten des selben Feldes entweder bitter oder nicht bitter schmecken.

Untersuchungen zur Lokalisierung der Bitterstoffe in den verschiedenen Gewebeschichten der Karotte ergaben eine relativ gleichmäßige Verteilung der Verbindungen Falcarinol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein über die gesamte Karotte. Dagegen konnte die Substanz Falcarindiol verstärkt in den Randschichten und im Karottenende gefunden werden. Hier lagen die Gehalte bei 33 mg/kg während in der Karottenspitze und in den inneren Gewebeschichten nur 19 mg/kg bzw. 15 mg/kg vorlagen. *Olsson und Svensson* (1996) stellten ebenfalls eine Abnahme des Falcarindiolgehaltes von den äußeren zu den inneren Gewebeschichten der Karotten fest. Sie fanden Konzentrationen von 31,9 mg/kg bis 91,5 mg/kg in der Schale und 6,0 mg/kg bis 19,2 mg/kg im Phloem. *Garrod et al.* (1978) fanden bei vergleichbaren Untersuchungen einen Falcarindiolgehalt in der Schale von 93 mg/kg, im Phloem von 12 mg/kg und im Xylem von 2 mg/kg. Auch diese Untersuchung zeigt somit eine Abnahme der Konzentration von Falcarindiol in den inneren Gewebeschichten.

Studien über die Veränderung der Bitterstoffgehalte während der technologischen Verarbeitung von Karotten machten deutlich, dass während der industriellen Karottenbreiherstellung die größten Schwankungen im Gehalt der Verbindung Falcarindiol auftraten. Während die Konzentrationen der Substanzen Falcarinol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein während der Dampfschälung, Zerkleinerung, des Kochens und Sterilisierens relativ konstant blieben, nahm der Gehalt an Falcarindiol von 36,9 mg/kg vor, auf 12,3 mg/kg nach der Dampfschälung ab. Dies bestätigt die Erkenntnis, dass die Verbindung Falcarindiol vorwiegend in den Karottenrandschichten vorliegt. Hingegen hatte der Koch- und Sterilisierprozess keinen größeren Einfluss auf die Konzentration dieses Bitterstoffs.

Während des Blanchierprozesses wurde beobachtet, dass die Konzentrationen an Falcarinol und Falcarindiol-3-acetat um etwa Faktor 2,5, die Konzentration an Falcarindiol um Faktor 3 abnahmen. Unter Berücksichtigung der gemessenen thermischen Stabilität der Bitterstoffe (s. 2.3.2.2) muss angenommen werden, dass die Substanzen aus dem Karottengewebe beim Blanchieren in das

Kochwasser übergehen. Dies stützt auch die verstärkte Abnahme der Konzentration des Falcarindiols, das aufgrund seiner größeren Polarität in stärkerem Maße in die Wasserphase extrahiert werden sollte als das weniger polare Falcarinol bzw. das Falcarindiol-3-acetat.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen werden frische Karotten, bitterinduzierte Karotten, Karottenbrei sowie unterschiedliche Karottensorten verwendet.

Frische Karotten (FK) werden aus dem Handel bezogen und am gleichen Tag aufgearbeitet.

Zur Herstellung *bitterinduzierter Karotten (BIK)* werden frische Karotten mit einem Messer an der Oberfläche mehrfach über Kreuz angeritzt und 5 Tage bei 3 °C gelagert.

Der verwendete *Karottenbrei (KB)* stammt aus Gläschen der Artikel „Früh-Karotten mit Kartoffeln“ bzw. „Frühkarotten“ der Firma Hipp (Pfaffenhofen), bei denen Verbraucherreklamationen aufgrund eines bitteren Fehlgeschmacks auftraten.

Unterschiedliche Karottensorten werden von den Firmen Bejo (Warmenhuizen, Niederlande), Rijk Zwaan (Wolver) und Hipp (Pfaffenhofen) zur Verfügung gestellt.

3.2 Chemikalien

Alle kommerziell erhältlichen Substanzen werden von den angegebenen Quellen bezogen.

Acrolein, Fluka, Neu-Ulm

Ammoniumchlorid p.a., Merck, Darmstadt

[E]-2-Decenal (95%), Acros Organics, Schwerte

Deuterobenzol, 99,96 Atom-% D, Isocom GmbH, Landshut

Deuteriochloroform, 99,96 Atom-% D, Isocom GmbH, Landshut

Diethylether, Merck, Darmstadt. Vor Gebrauch an einer Füllkörperkolonne
(150 x 6 cm) frisch destilliert

Ethanol absolut, Merck, Darmstadt

Ethynylmagnesiumbromid, Aldrich, Steinheim

Ethylacetat p.a., Merck, Darmstadt

Hexan SupraSolv, Merck, Darmstadt

Kupfer(I)chlorid, Merck, Darmstadt

Methanol LiChrosolv, Merck, Darmstadt

7-Methoxycumarin, Aldrich, Steinheim

Natriumchlorid p.a., Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat p.a., Merck, Darmstadt

Natriumsulfat (wasserfrei), Merck, Darmstadt

Pentan, Merck, Darmstadt. Vor Gebrauch an einer Vigreuxkolonne (50 x 1 cm)
frisch destilliert

Tetramethylsilan, Isocom GmbH, Landshut

2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd, Aldrich, Steinheim

3.3 Lösungsmittlextraktion der Karotten und Karottenprodukte

3.3.1 Frische Karotten und bitterinduzierte Karotten

Die Karotten werden gewaschen, abgetrocknet und in einem Schnellzerkleinerer (Moulinette, Privileg) zerkleinert. Das Karottenpüree (1 kg) wird dreimal mit je 1400 ml Hexan für 20 Minuten extrahiert, das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt und am Rotationsverdampfer (Rotavapor R, Büchi, Konstanz) im Vakuum bei 30 °C zur Trockene eingeeengt und so der *Hexanextrakt* erhalten. Der Karottenrückstand wird anschließend dreimal für 20 Minuten mit je 1400 ml Ethanol extrahiert und das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt. Das Filtrat wird im Vakuum vom Solvens befreit, wobei der *Ethanolextrakt* erhalten wird. Der verbleibende Karottenrückstand wird abschließend dreimal 20 Minuten lang mit je 1400 ml destilliertem Wasser extrahiert und das Lösungsmittel wiederum über eine Nutsche abgesaugt. Das Filtrat wird gefriergetrocknet (Delta I, Christ, Osterode) und so der *Wasserextrakt* erhalten. Die Gehalte der erhaltenen Extraktionsrückstände werden durch Auswiegen bestimmt.

3.3.2 Karottenbrei

Der Karottenbrei (1 kg) wird in Edelstahlschalen eingewogen, gefriergetrocknet, zu einem feinen Pulver vermahlen und dreimal mit je 700 ml Hexan je 20 Minuten extrahiert. Die Suspension wird 10 Minuten bei 4500 Upm zentrifugiert und das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt. Das Filtrat wird anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und so der *Hexanextrakt* erhalten. Der verbleibende Karottenbreirückstand wird dreimal einer 20 minütigen Extraktion mit je 700 ml Ethanol unterzogen. Die erhaltene Suspension wird 10 Minuten bei 4500 Upm zentrifugiert, das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt und am Rotationsverdampfer im Vakuum vom

Lösungsmittel befreit (*Ethanolextrakt*). Der Karottenbreirückstand wird anschließend dreimal für 20 Minuten mit je 700 ml destilliertem Wasser extrahiert. Die Suspension wird wiederum 10 Minuten bei 4500 Upm zentrifugiert, das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt und in zuvor gewogenen Edelstahlschalen gefriergetrocknet (*Wasserextrakt*). Die Gehalte der Extraktionsrückstände werden durch Auswiegen bestimmt.

3.4 Chromatographische Fraktionierung der Lösungsmittel-extrakte

3.4.1 Gelpermeationschromatographie

Die Rückstände der Hexan- bzw. Ethanol-Extraktion von 1 kg Karottenmaterial werden in Ethanol im Ultraschallbad gelöst, filtriert und das Filtrat im Vakuum auf jeweils 10 ml konzentriert. Anschließend werden diese ethanolischen Lösungen membranfiltriert und auf eine zuvor mit ethanol konditioniertem Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gefüllte, wassergekühlte Glassäule (100 cm x 50 mm, XK 50/100, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben. Die Chromatographie mit Ethanol (2 ml/min) wird mittels UV-Detektion (UV-1570/1575, Jasco, Groß-Umstadt) bei 302 nm verfolgt und das Eluat in zehn Fraktionen (Hexanextrakt: H-I bis H-X bzw. Ethanolextrakt: E-I bis E-X) mit einem Fraktionssammler (Ultrorac II, LKB, Bromma) aufgefangen.

3.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die GPC-Fraktionen H-VIII und E-VI werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, in Methanol/Wasser (70/30, v/v; 3 ml) aufgenommen und bei 3000 Upm 10 Minuten zentrifugiert. Zur Abtrennung der geschmacksinaktiven Carotinoide sowie der von RP-18-Material unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr

elulierbaren Substanzen wird der Überstand abpipettiert, auf eine kleine Säule (1 cm² x 10 cm, A x h), die mit RP-18-Material (LiChroprep 25-40 µm, Merck, Darmstadt) gefüllt ist, aufgegeben und mit 40 ml Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in 1,5 ml Methanol/Wasser (70/30, v/v) gelöst, membranfiltriert und in Aliquoten von 200 µl mittels semipräparativer RP-HPLC (Säulenmaße 250 x 10 mm) an ODS-Hypersil, 5 µm, 120 A (Thermo Hypersil GmbH, Kleinostheim) getrennt.

Die HPLC-Anlage (BIO-TEK Kontron Instruments, Eching) besteht aus zwei Pumpen (Typ 522), einem Rheodyne Injektor (250 µl Probenschleife) und einem UV/VIS Detektor (Typ 535). Die Fließgeschwindigkeit beträgt bei analytischen Untersuchungen 1,0 ml/min und bei präparativen Trennungen 4,5 ml/min. Die Chromatographie wird mit dem UV-Detektor bei 220 nm (Fraktion VI) bzw. 260 nm (Fraktion VIII) verfolgt. Einzelne Peaks im Chromatogramm werden gesammelt und peakfreie Abschnitte in Fraktionen zu 2 min aufgefangen.

Die Elution erfolgt mit folgenden Gradienten:

Für GPC-Fraktion VI: ausgehend von einem Anfangsgradienten von Methanol/Wasser (70/30, v/v) wird der Methanolgehalt innerhalb von 50 Minuten auf 100 % gesteigert und für 10 Minuten gehalten.

Für GPC-Fraktion VIII: ausgehend von einem Anfangsgradienten von Methanol/Wasser (40/60, v/v) wird der Methanolgehalt innerhalb von 10 Minuten auf 60 % und anschließend innerhalb von weiteren 15 Minuten auf 80 % erhöht. Danach wird das Fließmittel innerhalb von 0,05 Minuten auf 100 % Methanol umgestellt und 10 Minuten isokratisch eluiert.

3.5 Isolierung und Identifizierung von Bitterstoffen

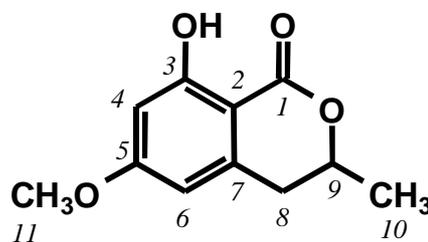
3.5.1 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin (6-Methoxymellein)

Zur Isolierung des 6-Methoxymelleins wird die GPC-Fraktion H-VIII mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 (Schichtdicke 0,5 mm, Merck, Darmstadt) mit Toluol/Methanol (50/1, v/v) als mobiler Phase aufgetrennt. Die fluoreszierende Bande bei einem R_f-Wert von 0,46 wird abgekratzt und die Zielverbindung mit Ether/Methanol (90/10, v/v) eluiert. Anschließend wird das Lösungsmittel über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum fällt ein weißes Pulver in einer Reinheit von > 99 % an, das mittels NMR-Spektroskopie (360 MHz, CDCl₃) und HRGC/MS eindeutig als 6-Methoxymellein identifiziert werden kann.

Spektroskopische Daten von 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin:

HRGC/MS(EI): *m/z* 164 (100), 208 (98; [M]⁺), 165 (66), 190 (51), 179 (29), 209 (26), 78 (16), 69 (15), 162 (15), 119 (13)

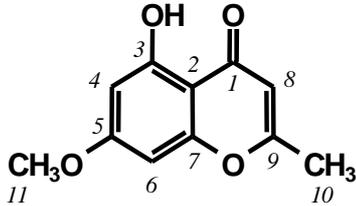
¹H-NMR (360 MHz, CDCl₃; DQF-COSY): δ 1,51 (3H, d, 6,6 Hz, H-C(10)), 2,87 (2H, d, 6,6 Hz, H-C(8)), 3,85 (3H, s, H-C(11)), 4,67 (1H, m, H-C(9)), 6,25 (1H, d, 2,2 Hz, H-C(6)), 6,37 (1H, d, 2,7 Hz, H-C(4)), 11,25 (1H, s, H-C(3)); **¹³C-NMR (360 MHz, CDCl₃; DEPT-135, HMQC, HMBC):** δ 20,6 (CH₃, C(10)), 34,8 (CH₂, C(8)), 55,5 (CH₃, C(11)), 75,4 (CH, C(9)), 99,4 (CH, C(6)), 101,5 (CH, C(4)), 106,1 (C, C(2)), 140,8 (C, C(7)), 164,5 (C, C(3)), 165,7 (C, C(5)), 169,8 (CO, C(1)). Die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf nebenstehende Struktur.



3.5.2 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon (Eugenin) und 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (Gazarin)

Zur Isolierung und Identifizierung von Eugenin und Gazarin wird die GPC-Fraktion H-VIII aus bitterinduzierten Karotten, wie unter 3.4.2 beschrieben, durch semipräparative RP-HPLC getrennt. Die Fraktionen, die bei 10-15 Minuten (Fraktion H-VIII/3) bzw. bei 22-27 Minuten (Fraktion H-VIII/6) eluieren werden gesammelt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet.

Fraktion H-VIII/6 enthält ein weisses Pulver in einer Reinheit von > 99 %, das mittels NMR-Spektroskopie (400 MHz, CDCl₃) und HRGC/MS eindeutig als Eugenin identifiziert werden kann.

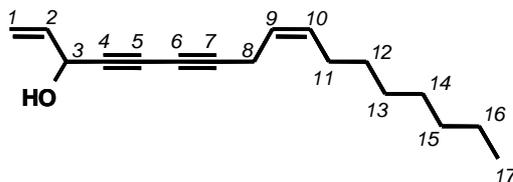
| Spektroskopische Daten von 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromon: | |
|---|--|
| HRGC/MS(EI): <i>m/z</i> 206 (100; [M] ⁺), 177 (96), 176 (50), 69 (43), 163 (40), 148 (39), 95 (38), 205 (36), 123 (32), 207 (26) | |
| <p>¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃; DQF-COSY): δ 2,34 (3H, s, H-C(10)), 3,85 (3H, s, H-C(11)), 6,02 (1H, s, H-C(8)), 6,33 (1H, d, 2,2 Hz, H-C(4)), 6,36 (1H, d, 2,2 Hz, H-C(6)), 12,68 (1H, s, HO-C(3)); ¹³C-NMR (360 MHz, CDCl₃; DEPT-135, HMQC, HMBC): δ 22,7 (CH₃, C(10)), 55,7 (CH₃, C(11)), 92,5 (CH, C(6)), 97,9 (CH, C(4)), 105,3 (C, C(2)), 108,8 (CH, C(8)), 158,1 (C, C(9)), 162,3 (C, C(7)), 165,4 (C, C(3)), 166,8 (C, C(5)), 182,5 (C, C(1)). Die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf nebenstehende Struktur.</p> |  |

Durch Vergleich der Retentionszeiten und GC/MS Daten mit der käuflich erhältlichen Referenzsubstanz, kann die Verbindung Gazarin in Spuren in Fraktion H-VIII/3 nachgewiesen werden.

HRGC/MS(EI): *m/z* 196 (100; [M]⁺), 181 (72), 150 (67), 125 (65), 153 (58), 95 (56), 69 (49), 110 (48), 109 (47), 179 (45).

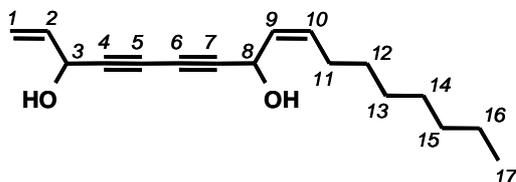
3.5.3 [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol), [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol) und [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat)

Die GPC-Fraktion E-VI aus 24 kg Karottenbrei wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, in Pentan (6 ml) aufgenommen und auf eine wassergekühlte Glassäule (300 x 18 mm) gegeben, die zuvor mit pentankonditioniertem Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm; Merck, Darmstadt) gefüllt worden ist. Die anschließende Elution erfolgt nacheinander mit folgenden Lösungsmittelgemischen: Pentan (Fraktion A; 110 ml), Pentan/Ether (Fraktion B; 90/10, v/v; 110 ml), Pentan/Ether (Fraktion C; 80/20, v/v; 110 ml), Pentan/Ether (Fraktion D; 70/30, v/v; 110 ml), Pentan/Ether (Fraktion E; 60/40, v/v; 110 ml), Pentan/Ether (Fraktion F; 50/50, v/v; 110 ml) und Ether (Fraktion G; 110 ml). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum werden die Fraktionen D und E jeweils in 4 ml Methanol/Wasser (70/30, v/v) gelöst, membranfiltriert und wie unter 3.4.2 beschrieben mittels semipräparativer RP-HPLC aufgetrennt. Die drei Peaks, die bei 17, 22,5 und 28 Minuten eluieren, werden gesammelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und anschließender Gefriertrocknung fällt in den drei Fraktionen jeweils ein farbloses Öl in einer Reinheit von >99 % an. Die erhaltenen Öle können mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (400 MHz, C₆D₆ bzw. CDCl₃) und HRGC/MS eindeutig als [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol), [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol) und [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat) identifiziert werden.

Spektroskopische Daten von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol:

HRGC/MS(EI): m/z 91 (100), 117 (86), 103 (81), 55 (75), 115 (70), 159 (67), 131 (53), 129 (48), 43 (47), 41 (41); **HRGC/MS(Cl, NH₃):** m/z 244 (100), 245 (28), 246 (10), 247 (9), 227 (9), 262 (9), 229 (9), 260 (7), 206 (7), 243 (6).

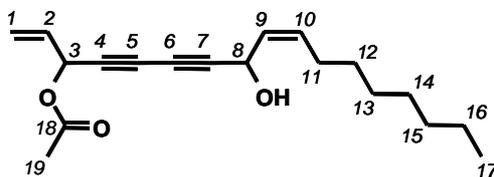
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, DQF-COSY): δ 0,88 (3H, t, 7,0 Hz H-C(17)), 1,28 (8H, m, H-C(13-16)), 1,35 (2H, m, H-C(12)), 1,85 (1H, d, 6,5 Hz, HO-C(3)), 2,02 (2H, m, H-C(11)), 3,03 (2H, d, 6,9 Hz, H-C(8)), 4,91 (1H, m, H-C(3)), 5,24 (1H, m, 10,2 Hz, H_a-C(1)), 5,38 (1H, m, 6,9, 10,6 Hz, H-C(9)), 5,46 (1H, m, 17,5 Hz, H_b-C(1)), 5,52 (1H, m, 7,4, 10,5 Hz, H-C(10)), 5,94 (1H, ddd, 5,3, 10,2, 17,0 Hz, H-C(2)); **¹³CNMR (360 MHz in CDCl₃; DEPT-135, HMQC, HMBC):** δ 14,1 (CH, C(17)), 17,7 (CH₂, C(8)), 22,7 (CH₂, C(16)), 27,2 (CH₂, C(11)), 29,2 (CH₂, C(14)), 29,2 (CH₂, C(13)), 29,3 (CH₂, C(12)), 31,8 (CH₂, C(15)), 63,6 (CH, C(3)), 64,0 (C, C(6)), 71,4 (C, C(5)), δ 74,3 (C, C(4)), 80,3 (C, C(7)), 117,0 (CH₂, C(1)), 121,9 (CH, C(9)), 133,1 (CH, C(10)), 136,2 (CH, C(2)). Die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf oben abgebildete Struktur.

Spektroskopische Daten von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol:

HRGC/MS(EI): m/z 129 (100), 128 (83), 115 (78), 91 (77), 55 (73), 77 (59), 41 (56), 157 (46), 105 (45), 43 (45); **HRGC/MS(CI, NH₃):** m/z 260 (100), 154 (77), 225 (63), 242 (56), 243 (48), 204 (32), 172 (25), 261 (24), 244 (21), 205 (21).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, DQF-COSY): δ 0,91 (3H, t, 7,1 Hz H-C(17)), 1,17 (8H, m, H-C(12-15)), 1,28 (2H, m, H-C(16)), 1,32 (1H, d, 6,3 Hz, HO-C(3)), 1,41 (1H, d, 4,5 Hz, HO-C(8)), 1,86 (2H, m, H-C(11)), 4,51 (1H, dd, 6,3, 7,6 Hz, H-C(3)), 4,89 (1H, m, 1,4, 10,2 Hz, H_a-C(1)), 5,00 (1H, dd, 4,5, 8,0 Hz, H-C(8)), 5,23 (1H, m, 1,4, 17,0 Hz, H_b-C(1)), 5,33 (1H, m, 7,5, 10,6 Hz, H-C(10)), 5,48 (1H, m, 8,0, 10,6 Hz, H-C(9)), 5,65 (1H, ddd, 7,6, 10,2, 17,0 Hz, H-C(2));
¹³C-NMR (360 MHz in CDCl₃; DEPT-135, HMQC, HMBC): δ 14,1 (CH, C(17)), 22,6 (CH₂, C(16)), 27,2 (CH₂, C(11)), 29,1 (CH₂, C(14)), 29,2 (CH₂, C(13)), 29,3 (CH₂, C(12)), 31,8 (CH₂, C(15)), 58,7 (CH, C(8)), 63,5 (CH, C(3)), 68,8 (C, C(6)), 70,3 (C, C(5)), 78,3 (C, C(4)), 79,9 (C, C(7)), 117,3 (CH₂, C(1)), 127,7 (CH, C(9)), 134,7 (CH, C(10)), 135,9 (CH, C(2)). Die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf oben abgebildete Struktur.

Spektroskopische Daten von [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol:



HRGC/MS(EI): m/z 43 (100), 129 (57), 157 (55), 128 (54), 161 (51), 115 (50), 171 (44), 91 (41), 55 (39), 133 (37); **HRGC/MS(Cl, NH₃):** 285 (100), 320 (24), 286 (20), 243 (13), 302 (11), 244 (9), 242 (9), 260 (5), 321 (5), 245 (5).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, DQF-COSY): δ 0,87 (3H, t, 7,0 Hz, H-C(17)), 1,28 (8H, m, H-C(13-16)), 1,39 (2H, m, H-C(12)), 1,79 (1H, d, 5,3 Hz, HO-C(8)), 2,09 (3H, s, H-C(19)), 2,10 (2H, m, H-C(11)), 5,16 (1H, dd, 5,3, 8,2 Hz, H-C(8)), 5,34 (1H, m, 10,0 Hz, H_a-C(1)), 5,52 (1H, m, 8,3, 10,7 Hz, H-C(9)), 5,53 (1H, m, 16,7 Hz, H_b-C(1)), 5,61 (1H, m, 7,3, 10,6 Hz, H-C(10)), 5,87 (1H, ddd, 5,7, 10,0, 16,7 Hz, H-C(2)), 5,92 (1H, m, H-C(3)); **¹³C-NMR (360 MHz in CDCl₃; DEPT-135, HMQC, HMBC):** δ 14,1 (CH, C(17)), 20,9 (CH, C(19)), 22,6 (CH₂, C(16)), 27,7 (CH₂, C(11)), 29,1 (CH₂, C(14)), 29,2 (CH₂, C(13)), 29,3 (CH₂, C(12)), 31,8 (CH₂, C(15)), 58,6 (CH, C(8)), 64,5 (CH, C(3)), 68,6 (C, C(6)), 70,9 (C, C(5)), 74,8 (C, C(4)), 80,1 (C, C(7)), 119,7 (CH₂, C(1)), 127,7 (CH, C(9)), 132,0 (CH, C(10)), 134,7 (CH, C(2)), 169,4 (C, C(18)). Die Bezifferung der C-Atome bezieht sich auf oben abgebildete Struktur.

3.6 Synthese von [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

Wie in **Abbildung 28** dargestellt, werden Acrolein und [E]-2-Decenal jeweils mit Ethynylmagnesiumbromid in einer Grignardreaktion zu 1-Penten-4-in-3-ol bzw. [E]-4-Dodecen-1-in-3-ol umgesetzt. Diese beiden Verbindungen werden anschließend durch Glaser-Kupplung zu [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol verknüpft.

3.6.1 1-Penten-4-in-3-ol

Zu 100 ml Ethynylmagnesiumbromid (0,5 M in THF) in 40 ml wasserfreiem Ether wird langsam unter Rühren 3 g (54 mmol) frisch destilliertes Acrolein in 15 ml wasserfreiem Ether zugetropft. Anschließend wird 2 Stunden bei 60 °C am Rückfluss gekocht. Nach Abkühlung der Reaktionsmischung im Eisbad wird durch vorsichtige Zugabe von Wasser hydrolysiert und anschließend gesättigte Ammoniumchloridlösung zugegeben, bis sich der gebildete Niederschlag wieder auflöst. Nach Abtrennen der Etherphase und einmaligem Ausschütteln der Wasserphase mit 100 ml Ether werden die vereinigten Etherphasen nacheinander je einmal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit 100 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die Etherphase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und der Ether am Rotationsverdampfer abgezogen. Der verbleibende Rückstand wird unter Vakuum destilliert (Druck: 20 mbar, Temperatur: 60 °C). Ausbeute: 45 %.

Spektroskopische Daten von 1-Penten-4-in-3-ol: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,17 (1H, s), 2,58 (1H, d, 2,3 Hz), 4,89 (1H, m), 5,25 (1H, dt, 1,4 Hz, 10,2 Hz), 5,50 (1H, dt, 1,4 Hz, 17,0 Hz), 5,98 (1H, ddd, 5,2 Hz, 10,2 Hz, 17,0 Hz); ¹³C-NMR (360 MHz, CDCl₃): δ 63,3 (CH), 74,8 (C), 83,0 (CH), 117,2 (CH₂), 136,9 (CH).

3.6.2 [E]-4-Dodecen-1-in-3-ol

Die Synthese von [E]-4-Dodecen-1-in-3-ol erfolgt analog dem unter 3.6.1 beschriebenen Verfahren. Anstatt von Acrolein werden 8 g (52 mmol) [E]-2-Decenal in 30 ml wasserfreiem Ether zugetropft. Die Destillation erfolgt im Hochvakuum (Druck: 0,5 mbar, Temperatur: 80 °C). Ausbeute: 75 %.

Spektroskopische Daten von [E]-4-Dodecen-1-in-3-ol: HRGC/MS(Cl, Ammoniak): m/z 180 (100), 181 (14), 163 (9), 172 (4); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (3H, t, 6,8 Hz), 1,35 (10H, m), 1,90 (1H, s), 2,07 (2H, m), 2,56 (1H, d, 2,0 Hz), 4,84 (1H, d, 5,7 Hz), 5,61 (1H, m), 5,92 (1H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 14,5 (CH), 22,8 (CH_2), 29,2 (CH_2), 29,5 (CH_2), 29,5 (CH_2), 32,2 (CH_2), 32,3 (CH_2), 63,2 (CH), 74,3 (C), 83,8 (CH), 128,8 (CH), 135,0 (CH).

3.6.3 [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

Eine Suspension von 1-Penten-4-in-3-ol (2,0 g; 24 mmol), [E]-4-Dodecen-1-in-3-ol (4,4 g; 24 mmol), Kupfer(I)chlorid (1,0 g; 10 mmol) und Ammoniumchlorid (0,75 g; 14 mmol) in 50 ml Methanol (mit Salzsäure auf pH 5 eingestellt) werden im Autoklaven unter Sauerstoff (3 bar) 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation und Filtration der grünen Suspension wird die Reaktionsmischung mit Ether extrahiert, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase erneut dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen.

Zur Isolierung des [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diols wird die erhaltene Lösung in Ethanol aufgenommen und auf eine wassergekühlte Glassäule (26 mm x 40 cm, XK 26/40, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben, die zuvor mit ethanolkonditioniertem Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gefüllt wurde. Die Chromatographie mit Ethanol (1 ml/min) wird mittels UV-Detektion bei 220 nm verfolgt und das Eluat in Fraktionen zu

4 ml aufgefangen. Die [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, in Methanol/Wasser (70/30, v/v) aufgenommen und membranfiltriert. Aus dieser Lösung wird durch präparative RP-HPLC reines [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Ausbeute: 2,4 %) gewonnen.

Spektroskopische Daten von [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,88 (3H, t, 6,8 Hz), 1,27 (10H, m), 1,39 (2H, m), 1,89 (1H, s), 2,06 (2H, q, 6,1 Hz), 4,89 (1H, d, 5,2 Hz), 4,95 (1H, d, 5,2 Hz), 5,27 (1H, m, 0,91 Hz, 10,0 Hz), 5,48 (1H, m, 0,91 Hz, 17,0 Hz), 5,57 (1H, m, 6,1 Hz, 15,2 Hz), 5,91 (1H, m, 5,2 Hz, 15,2 Hz), 5,95 (1H, ddd, 5,2 Hz, 10,0 Hz, 17,0 Hz); **¹³C-NMR (360 MHz, CDCl₃):** δ 14,1 (CH), 22,6 (CH₂), 28,8 (CH₂), 29,1 (CH₂), 29,1 (CH₂), 31,8 (CH₂), 32,0 (CH₂), 63,4 (CH), 63,5 (CH), 69,7 (C), 70,3 (C), 78,3 (C), 79,3 (C), 117,4 (CH₂), 127,7 (CH), 135,3 (CH), 135,8 (CH).

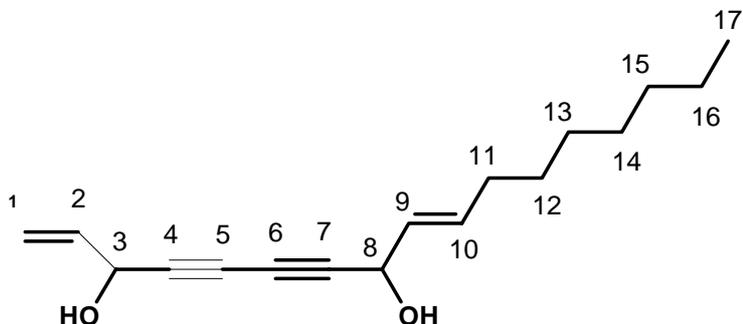


Abbildung 39 Struktur von [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

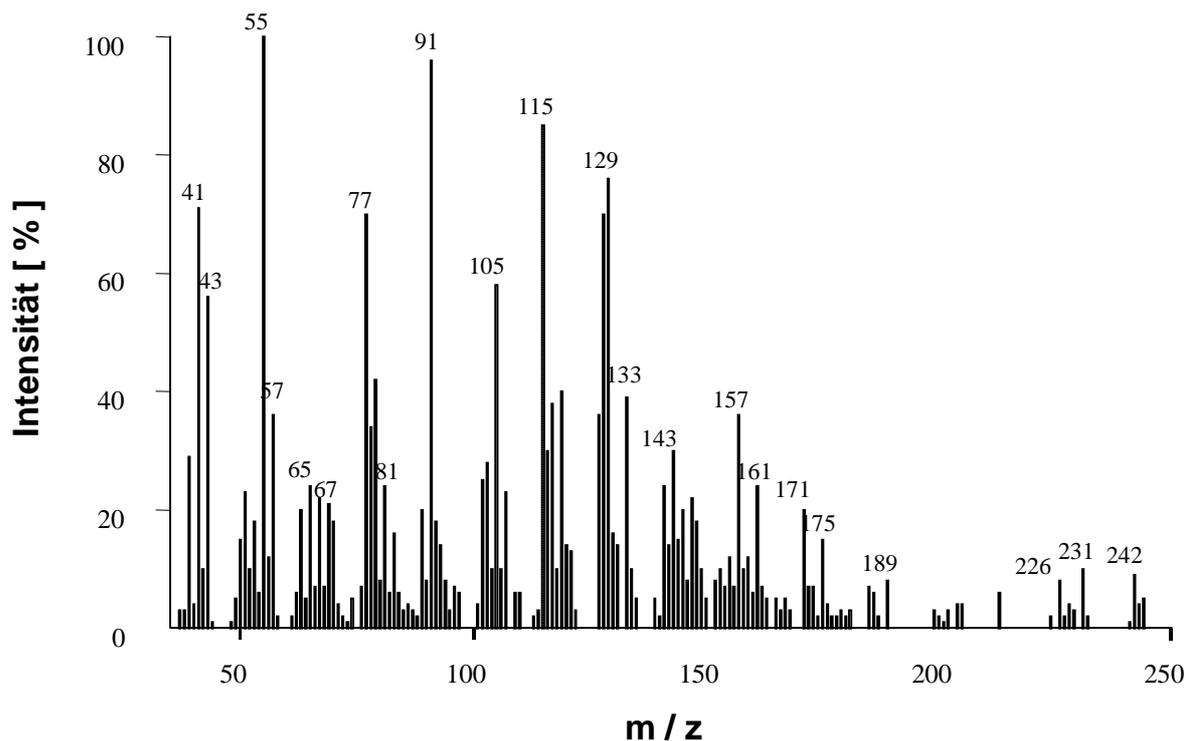


Abbildung 40 GC/MS-Spektrum (EI-Modus) von [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

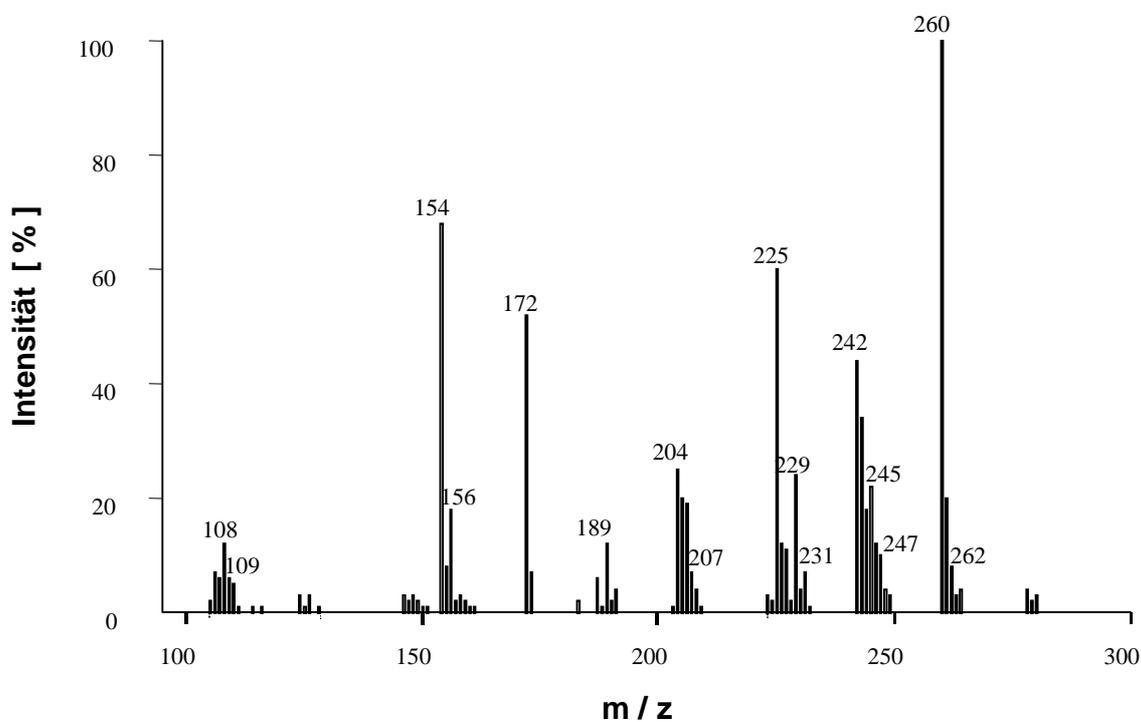


Abbildung 41 GC/MS-Spektrum (CI[NH₃]-Modus) von [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol

3.7 Quantitative Bestimmungen

3.7.1 Quantitative Bestimmung von 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin (6-Methoxymellein) in gelagerten Karotten

Die Karotten (0-12 Tage bei 3 °C gelagert) werden in einer Moulinette zerkleinert, das Karottenpüree (100 g) bzw. der handelsübliche Karottenbrei mit 1,5 mg bzw. 0,75 mg des internen Standards 7-Methoxycumarin, gelöst in Methanol, versetzt und dreimal mit je 170 ml Hexan für 20 Minuten extrahiert. Die Suspension wird 10 Minuten bei 4500 Upm zentrifugiert, die organische Phase über eine Nutsche abgesaugt und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Ethanol (10 ml) im Ultraschallbad gelöst, membranfiltriert und auf eine zuvor mit ethanol konditioniertem Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gefüllte, wassergekühlte Glassäule (50 mm x 100 cm, XK 50/100, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegeben. Die Chromatographie mit Ethanol (2 ml/min) wird mittels UV-Detektion bei 302 nm verfolgt und das Eluat in zehn Fraktionen (I - X) aufgefangen. Die Fraktion VIII wird auf 1 ml konzentriert, membranfiltriert und zur RP-HPLC (25 x 0,46 cm, ODS-Hypersil, 5 µm, 120 Å, Thermo Hypersil GmbH, Kleinostheim) mit einem Wasser/Methanol-Gradienten [40% Methanol – (10 min) → 60% – (15 min) → 80% (5 min); 1,0 ml/min] und UV-Detektion bei 260 und 302 nm eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgt gemäß der Methode des internen Standards nach folgender Formel:

$$c \text{ [mg/kg]} = \frac{A_{ISV} \cdot m_{PrV} \cdot A_{Pr} \cdot m_{IS}}{A_{PrV} \cdot m_{ISV} \cdot A_{IS} \cdot E}$$

| | |
|-------|---|
| AISV: | Peakfläche des internen Standards im Vergleichslauf |
| APrV: | Peakfläche der Vergleichssubstanz im Vergleichslauf |
| mISV: | µg interner Standard im Vergleichslauf |
| mPrV: | µg Vergleichssubstanz im Vergleichslauf |
| AIS: | Peakfläche des internen Standards im Analysenlauf |
| APr: | Peakfläche der Vergleichssubstanz im Analysenlauf |
| mIS: | µg interner Standard in der Gesamtprobe |
| E: | Einwaage in g |

3.7.2 Simultane quantitative Bestimmung von [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol, [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol, [Z]-3-Acetoxyheptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol und 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocumarin

Die quantitative Bestimmung der Bisacetylene und des 6-Methoxymelleins wird für Karotten, Karottenbrei und Karottensaft durchgeführt.

Probenvorbereitung

Probenvorbereitung für Karotten

20 g Karotten werden genau eingewogen und die internen Standards [E]-Falcarindiol (250 µg gelöst in Methanol) sowie 7-Methoxycumarin (50 µg gelöst in Methanol) zugefügt. Nach Zugabe von 100 ml Ethylacetat werden die Karotten mit dem Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T50, Janke&Kunkel IKA-Labor-technik, Staufen) homogenisiert. Das Probenmaterial wird dreimal 5 Minuten lang mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt und im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in 2 ml Pentan aufgenommen und 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert.

Probenvorbereitung für Karottenbrei

20 g Karottenbrei werden genau eingewogen, mit 100 g Natriumsulfat zu einem trockenen Pulver verrieben und als interne Standards [E]-Falcarindiol (250 µg gelöst in Methanol) und 7-Methoxycumarin (50 µg gelöst in Methanol)

zugesetzt. Das Probenmaterial wird dreimal 5 Minuten lang mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel über eine Nutsche abgesaugt und im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in 2 ml Pentan aufgenommen und 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert.

Probenvorbereitung für Karottensaft

20,0 ml Karottensaft werden in einen Schütteltrichter pipettiert und die internen Standards [E]-Falcarindiol (250 µg gelöst in Methanol) sowie 7-Methoxycumarin (50 µg gelöst in Methanol) zugefügt. Der Karottensaft wird dreimal mit je 100 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherphasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 2 ml Pentan aufgenommen und 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert.

Reinigung der Extrakte und chromatographische Analyse

Der klare Überstand des Zentrifugats wird auf eine pentankonditionierte Kieselgelpartusche (Sep-Pak Classic Silica, Waters, Irland) aufgegeben und diese zunächst mit 5 ml Pentan/Diethylether (95/5, v/v) gewaschen. Danach erfolgt die Elution der Polyacetylene und des 6-Methoxymelleins mit 5 ml Pentan/Diethylether (40/60, v/v). Die erhaltene Fraktion wird unter Vakuum vom Lösungsmittel befreit, in 1 ml Methanol aufgenommen und membranfiltriert.

Zur gaschromatographischen Bestimmung der Bisacetylene werden die Proben im Verhältnis 1:5 mit Methanol verdünnt, für die HPLC-Bestimmung von 6-Methoxymellein wird die unverdünnte Probe eingesetzt. Die gaschromatographischen Bedingungen sind unter 3.8.1 und die HPLC-Bedingungen unter 3.7.1 angegeben. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe zuvor aufgenommener Eichgeraden.

3.8 Analytisch-instrumentelle Methoden

3.8.1 Kapillargaschromatographie: HRGC/FID

Für die kapillargaschromatographischen Untersuchungen mit Flammenionisationsdetektor wird ein Gaschromatograph Trace GC (Thermo Quest CE Instruments) verwendet. Als Trägergas dient Helium bei einem Vordruck von 240 kPa. Die Probenaufgabe erfolgt über einen Cool-On-Column-Injektor mit Sekundärkühlung. Das Injektionsvolumen beträgt 1 µl. Der FID (250 °C) wird mit Wasserstoff (20 ml/min) und Luft (200 ml/min) betrieben. Als Make-Up-Gas dient Stickstoff (30 ml/min). Die Aufzeichnung des Chromatogramms erfolgt mit einem SP4270 Integrator (Spectra-Physics, San Jose, USA) bei einem Papieranschub von 1 cm/min und einer Abschwächung von 32.

Es wird folgende Kapillarsäule verwendet:

Neutra Bond-1, WCOT Fused Silica, 60 m x 0,25 mm, 0,4 µm Filmdicke (GL Sciences Inc., Tokyo, Japan).

Die Injektion erfolgt bei einer Ofentemperatur von 50 °C. Nach einer Minute wird die Temperatur mit einer Heizrate von 10 °C/min auf 250 °C erhöht und diese Temperatur 15 Minuten gehalten.

3.8.2 Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie

Die GC/MS Untersuchungen erfolgen mit einem Gaschromatograph 5890 Series II (Hewlett Packard, Waldbronn), der mit einem Massenspektrometer MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen) verbunden ist. Als Trägergas dient Helium bei einem Fluss von 1,8 ml/min. Die Injektion erfolgt Cool-On-Column. Als Trennkapillare wird eine SE-54 Säule (30 m × 0,32 mm, Fused Silica, DB-5, 0,25 µm Schichtdicke, J&W Scientific, Fisons, Mainz) verwendet. Die Injektion erfolgt bei einer Ofentemperatur von 40 °C. Nach zwei Minuten wird die

Temperatur mit einer Heizrate von 10 °C/min auf 260 °C erhöht und diese Temperatur 15 Minuten gehalten.

Die Aufnahme der EI-Spektren erfolgt bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV, die Aufnahme der CI-Spektren wird bei einer Ionisierungsenergie von 115 eV mit Ammoniak als Reaktandgas durchgeführt.

3.8.3 Kernresonanzspektrometrie (NMR)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgt an den Spektrometern AM 360 (Bruker, Rheinstetten) und AMX 400 (Bruker, Rheinstetten). Als Lösungsmittel wird Deuteriochloroform und Deuterobenzol, als interner Standard TMS verwendet.

3.8.3.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-Messungen werden am 400 MHz Gerät durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Computerprogramm X-WIN-NMR (Version 2.6; Bruker, Rheinstetten).

3.8.3.2 ¹³C-NMR-Spektroskopie

Die Messungen werden am 360 MHz Gerät durchgeführt. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses bzw. zur Unterdrückung der heteronuklearen *J*-Kopplungen, erfolgt die Aufnahme unter ¹H-Breitbandentkopplung. Die Erstellung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt aus dem FID durch das Computerprogramm WIN-NMR (Version 6; Bruker, Rheinstetten).

3.8.3.3 ^{13}C -DEPT-(135°)-NMR-Spektroskopie

Die Messungen werden am 360 MHz Gerät durchgeführt. Das DEPT-Experiment (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) ist eine Polarisationstransfer-Technik, welche die hohe Polarisation und die gewöhnlich kürzeren Relaxationszeiten der ^1H -Atome ausnützt. Je nach Pulsfrequenz führt das Experiment zu separaten ^{13}C -Subspektren für Methyl- (CH_3), Methylen- (CH_2) und Methinsignalen (CH). Die Basis für die spektralen Ergebnisse stellt der abschließende ^1H -Pulswinkel dar. So erhält man mit einem 135° -Puls die Signale für Methyl- und Methinkohlenstoffe mit positiver Intensität, die Signale für Methylenkohlenstoffe mit negativer Intensität. Quartäre Kohlenstoffe können nicht beobachtet werden. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Computerprogramm WIN-NMR (Version 6; Bruker, Rheinstetten).

3.8.3.4 Doppelquantengefilterte H,H-Verschiebungskorrelation (DQF-COSY)

Die Messungen werden am 400 MHz Gerät durchgeführt. Durch eine Reihe von Messungen, bei denen zwei 90° -Pulse durch jeweils inkrementell veränderte Wartezeit getrennt sind, werden $^1\text{H}, ^1\text{H}$ korrelierte 2D-Spektren erhalten. Die Signale auf der Diagonalen des 2D-Konturdiagramms stellen hierbei das eigentliche ^1H -Spektrum dar. Die Erkennung von homonuklearen Kopplungen zwischen einzelnen Wasserstoffatomen ist aufgrund von symmetrisch angeordneten Korrelationssignalen möglich. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Computerprogramm X-WIN-NMR (Version 2.6; Bruker, Rheinstetten).

3.8.3.5 Heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (HMQC)

Die Messungen werden am 400 MHz Gerät durchgeführt. Die HMQC-Spektroskopie (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) ist eine ^1H -detektierte, heteronukleare inverse δ,δ -Verschiebungskorrelation, welche die ^1H -Signale in der einen Dimension mit den ^{13}C -Signalen in der anderen Dimension verknüpft. Somit wird ein Spektrum erhalten, das auf der einen Achse eine Projektion entsprechend dem normalen ^1H -Experiment, einschließlich aller chemischen Verschiebungen und $J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen, und auf der anderen Achse das korrespondierende ^{13}C -NMR-Spektrum, jedoch ohne quartäre Kohlenstoffatome, enthält. Im HMQC-Experiment werden nur direkte Kopplungen ($^1J_{\text{C,H}}$) von ^{13}C gebundenen Protonen gemessen. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Computerprogramm X-WIN-NMR (Version 2.6; Bruker, Rheinstetten).

3.8.3.6 Heteronukleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC)

Die Messungen werden am 400 MHz Gerät durchgeführt. Beim HMBC-Experiment (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) handelt es sich um eine modifizierte Version des HMQC-Experiments. Es ist zur Bestimmung von Kopplungen über mehrere Bindungen (v.a. $^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$, $^4J_{\text{C,H}}$) geeignet, die durch unterschiedliche Evolutionszeiten verschieden entwickelt werden können, während geminale Kopplungen unterdrückt werden. Dadurch ist es im Gegensatz zum HMQC-Experiment möglich, auch quartäre Kohlenstoffatome zu detektieren, da diese über mehrere Bindungen ein Proton als Kopplungspartner haben können. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Computerprogramm X-WIN-NMR (Version 2.6; Bruker, Rheinstetten).

3.9 Human-Sensorische Untersuchungen

3.9.1 Sensorische Analyse von Karotten und Karottenprodukten

Der Bittergeschmack von handelsüblichem Karottenbrei sowie von zerkleinerten frischen und gelagerten Karotten wird von 10-15 sensorisch geschulten Prüfpersonen auf einer Skala von 0 (nicht bitter) bis 3 (stark bitter) im Reihentest bewertet. Die Auswertung erfolgt durch Bildung des arithmetischen Mittels.

3.9.2 Bestimmung der Bitterschwellenwertkonzentrationen von Lösungsmittlextrakten

Die Rückstände des Hexan-, Ethanol- sowie des Wasserextraktes werden im Ultraschallbad in 100 ml Trinkwasser gelöst. Diese Stammlösungen werden schrittweise im Verhältnis 1:2 mit Trinkwasser verdünnt und diese Verdünnungen zur sensorischen Prüfung verwendet. Die Sensorik wird als Reihentest, in Anlehnung an die Literatur (ASU: L 00.90-7, 1995), für Proben mit Beigeschmack durchgeführt und daraus die Bittergeschmacksschwelle bestimmt. Die geschmackliche Bewertung der Proben erfolgt durch acht trainierte Sensoriker, deren Eignung zur Geschmackserkennung zuvor anhand von Coffein- und Chininhydrochlorid-Lösungen überprüft wurde. Den Prüfern werden hierzu 3 ml jeder Verdünnungsstufe in steigender Konzentration angeboten. Die Sensoriker müssen nun die Proben vermerken, die Bittergeschmack aufweisen. Die Berechnung der Erkennungsschwelle erfolgt nach dem in der Literatur [ASU: L 00.90-9, 1998] beschriebenen Verfahren (s. 3.9.3).

3.9.3 Bestimmung der Bittergeschmacksschwellenwerte von Reinstanzen

Die Bittergeschmacksschwellen werden als Triangeltest-Prüfungen in Anlehnung an die Literatur [ASU: L 00.90-7, 1995] durchgeführt. Dazu werden die rein isolierten Substanzen 6-Methoxymellein (8 mg), Eugenin (2,5 mg), Falcarinol (0,9 mg), Falcarindiol (3,7 mg) und Falcarindiol-3-acetat (1,2 mg) sowie das käuflich erworbene Gazarin (2,2 mg) eingewogen, in jeweils 10 ml Trinkwasser im Ultraschallbad aufgenommen und zur Bestimmung von Schwellenwerten schrittweise im Verhältnis 1:2 mit Trinkwasser verdünnt. Anschließend wird jede Verdünnung mit je zwei Trinkwasserproben verschlüsselt und den Sensorikern in aufsteigender Konzentration angeboten. Die Testpersonen müssen nun bei jeder Verdünnungsstufe die abweichende Probe vermerken und deren Geschmackseigenschaft festhalten. Um Zufallstreffer auszuschließen, wird zur Auswertung als erste richtig erkannte Probe erst diejenige verwendet, ab der jede weitere Probe in der Verdünnungsreihe richtig erkannt wird.

Die Berechnung der Erkennungsschwelle E erfolgt nach dem in der Literatur [ASU: L 00.90-9, 1998] beschriebenen Verfahren:

1) Für eine einzelne Prüfperson

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

c_e : Konzentration in g/l bei erstmaliger Erkennung

c_{e-1} : Konzentration in g/l der vorangegangenen Probe

2) Für die Prüfgruppe

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

n: Anzahl der Prüfpersonen

E_i : Erkennungsschwelle für die einzelne Prüfperson (E)

$\prod_{i=1}^n E_i$: Produkte aus n Werten E_i

3.9.4 Geschmacksverdünnungsanalysen (GVA)

3.9.4.1 Gelchromatographie/Geschmacksverdünnungsanalyse (GPC/GVA)

Die mittels Gelchromatographie (s. 3.4.1) erhaltenen Fraktionen werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und in je 10 ml Ethanol gelöst. Davon werden 5 ml abpipettiert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und in 4 ml Trinkwasser im Ultraschallbad gelöst. Zur Lokalisierung von Geschmacksstoffen werden aus 2 ml der wässrigen Lösungen folgende Verdünnungsreihen hergestellt: 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16. Zur Sensorik werden je 2 ml der so erhaltenen Lösungen verwendet und diese im Reihentest auf Bittergeschmack geprüft. Die Verdünnung, bei der ein Geschmacksunterschied zu zwei Blindwerten (Wasser) gerade noch feststellbar ist, wird als TD (Taste Dilution)-Faktor bezeichnet (*Hofmann, 1998*).

3.9.4.2 HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA)

Die gesammelten HPLC-Fractionen aus 3.4.2 werden einzeln im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und die erhaltenen Rückstände in 0,75 ml Trinkwasser aufgenommen. Diese Lösungen der Einzelfractionen werden stufenweise im Verhältnis 1:2 mit Wasser verdünnt und in aufsteigenden Konzentrationen im Reihentest zur sensorischen Bestimmung von TD-Faktoren verwendet (*Frank et al., 2001*).

4 Zusammenfassung

Bei den Herstellern von Babynahrung stellen Karottenprodukte ein Schlüsselprodukt mit erheblichem Produktions- und Umsatzvolumen dar. Häufig ist jedoch ein sporadisch auftretender Bittergeschmack solcher Karottenprodukte der Grund für Verbraucherreklamationen. Trotz langer Erfahrungen im Anbau und in der Weiterverarbeitung von Karotten sowie einer Vielzahl an wissenschaftlichen Studien, waren die am Bittergeschmack ursächlich beteiligten Verbindungen jedoch bislang nicht geklärt. Die Qualitätsbeurteilung von Karottenprodukten erfolgt deshalb bis heute in der Industrie lediglich durch rein sensorische Analysen, die jedoch subjektiven Schwankungen unterliegen.

Im Vordergrund der Arbeit stand die Identifizierung von Bitterstoffen, die maßgeblich an der Bitterkeit von Karotten und Karottenprodukten beteiligt sind. Auf der Basis einer Dosis/Aktivitätskorrelation sollten diese Bitterstoffe dann in ihrem Beitrag zur Bitterkeit bewertet und eine Korrelation zur Gesamtbitterkeit der Karottenprodukte erarbeitet werden. Im Einzelnen wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

Durch sequenzielle Extraktion von Karotten und Karottenbrei mit Lösungsmitteln steigender Polarität konnte eine erste Fraktionierung der Bitterstoffe nach ihrer Hydrophilität/Hydrophobität erreicht werden. Nach Auftrennung dieser Lösungsmittel-Fractionen aus bitteren Karotten mittels Gelpermeationschromatographie/Geschmacksverdünnungsanalyse gelang es, drei stark bittere GPC-Fractionen zu isolieren. Durch die Anwendung der HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse konnten aus einer dieser Fractionen sowohl das Isocumarinderivat 6-Methoxymellein als auch die bittere Verbindung Eugenin isoliert und durch GC/MS und NMR-Experimente identifiziert werden. Erstere Verbindung ist in der Literatur seit knapp 50 Jahren als maßgebende Bittersubstanz beschrieben.

Zur Bestimmung der Bedeutung des 6-Methoxymelleins wurden quantitative Studien in Form von Lagerungsexperimenten durchgeführt. Hierbei konnte auf

der Basis einer Dosis/Aktivitätskorrelation erstmals gezeigt werden, dass das 6-Methoxymellein nicht ursächlich am Bittergeschmack von Karotten und Karottenprodukten beteiligt ist und sich auch nicht, wie in der Literatur angenommen, als Messgröße zur Objektivierung der sensorischen Qualität von Karotten und Karottenprodukten eignet.

Durch Untersuchung der beiden anderen stark bitteren GPC-Fraktionen mittels HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse wurde erstmals gezeigt, dass die Bitterkeit von Karotten und Karottenprodukten nicht, wie in der Literatur berichtet, durch einen einzigen Hauptbitterstoff, sondern durch das Zusammenspiel vieler bitterer Einzelverbindungen zustande kommt. Durch GC/MS sowie ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie gelang die Identifizierung von drei intensiv bitter schmeckenden Bisacetylenen, dem [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3-ol (Falcarinol), dem [Z]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol (Falcarindiol) und dem [Z]-3-Acetoxy-heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (Falcarindiol-3-acetat). Zur Bewertung dieser Verbindungen hinsichtlich ihres Beitrags zur Gesamtbitterkeit wurde eine Schnellmethode mit [E]-Heptadeca-1,9-dien-4,6-diin-3,8-diol ([E]-Falcarindiol) als internem Standard zur quantitativen Bestimmung der Bisacetylene entwickelt. Durch Vergleich der Konzentrationen der drei identifizierten Verbindungen mit der sensorisch bestimmten Bitterkeit in einer Reihe kommerzieller Karottenprodukte konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Gehalte des intensiv bitteren Falcarindiols mit der sensorisch wahrgenommenen Bitterkeit der Karotten und Karottenprodukte korrelierte. Durch die Bestimmung des Gehaltes an Falcarindiol steht nun erstmals ein Schnellverfahren zur Verfügung, welches zur objektiven Messung des Bittergeschmacks von Karotten und Karottenprodukten herangezogen werden kann.

Da schon seit längerem vermutet wird, dass die Bildung von Bitterstoffen u.a. von der kultivierten Karottensorte abhängt, wurden sortenspezifische Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten, dass einige Karottensorten tatsächlich einen stärkeren Bittergeschmack aufwiesen als andere. Als intensiv bitter fielen hierbei die Sorten Bangor, Kamarin, Kathmandu, Nandrin und Sunset auf, während beispielsweise die Sorten Bersky, Fayette, Florida oder Infinity eine

geringere Bitterkeit besaßen. Diese Kenntnisse ermöglichen den Karottenproduzenten in Zukunft den Anbau der Sorten, die in hohem Maße die Tendenz zur Bitterstoffbildung aufweisen, zu vermeiden. Die Beschaffenheit des Bodens schien dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Bitterstoffbildung zu haben.

Untersuchungen zur Lokalisierung der Bitterstoffe in den verschiedenen Gewebeschichten der Karotte ergaben eine relativ gleichmäßige Verteilung der Verbindungen Falcarinol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein über die gesamte Karotte. Dagegen konnte die bittere Substanz Falcarindiol verstärkt in den Randschichten und in den Karottenenden gefunden werden.

Studien über die Veränderung der Bitterstoffgehalte während der technologischen Verarbeitung von Karotten machten deutlich, dass während des Blanchierprozesses die Konzentrationen der bisacetylenischen Bitterstoffe abnahmen. Diese Abnahme konnte durch den Übergang der Substanzen in das Blanchierwasser erklärt werden. Untersuchungen zur Veränderung der Bitterstoffkonzentrationen während der industriellen Karottenbreiherstellung zeigten die größten Schwankungen im Gehalt der Verbindung Falcarindiol. Während die Konzentrationen der Substanzen Falcarinol, Falcarindiol-3-acetat und 6-Methoxymellein während der Dampfschälung, Zerkleinerung, des Kochens und Sterilisierens relativ konstant blieben, zeigte das Falcarindiol eine starke Abnahme nach der Dampfschälung. Hingegen hatte der Koch- und Sterilisierprozess keinen größeren Einfluss auf die Konzentration dieser Verbindung.

Die erarbeiteten Kenntnisse über die Struktur, die sensorische Aktivität sowie die Gehalte an Bitterstoffen in gelagerten Karotten sowie Karottenprodukten stellen die Grundlage dar, um die Bitterkeit von Karotten und Karottenprodukten analytisch zu objektivieren. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten analytischen Schnellmethoden zur Bewertung des Bittergeschmacks anhand der Messung des Falcarindiols werden somit neue Maßstäbe für eine objektive Beurteilung der Qualität von Karotten und Karottenprodukten setzen. Damit wird es in Zukunft möglich sein, bereits bei der Rohwaren-Eingangskontrolle die

Bitterkeit von Karotten objektiv zu bewerten. Solche Karottenchargen, die hohe Gehalte an Bitterstoffen beinhalten, können frühzeitig erkannt und für die Verarbeitung sowie den Verkauf gesperrt werden.

5 Literatur

Ali, A. A.; Makboul, M. A.; Attia, A. A.; Ali, D. T. Chromones and Flavans from *Pancreatium Maritimum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 625-627.

Babic, I.; Amiot, M. J.; Nguyen-The, C.; Aubert, S. Changes in Phenolic Content in Fresh Ready-to-use Shredded Carrots during Storage. *Journal of Food Science* **1993**, *58*, 351-356.

Bartoshuk, L. M. Tastes of salts, in: *Olfaction and Taste VII* **1980**, van der Starre (Hrsg), ILR Press, London, S 367-370

Bentley, R. K.; Thaller, V. The Structure of Carotatoxin, a Natural Toxicant from Carrot. *Chemical Communications* **1967**, 439-440.

Bentley, R. K.; Bhattacharjee, D.; Jones, E. R. H.; Thaller, V. Natural acetylenes. Part XXVIII. C₁₇-polyacetylenic alcohols from the umbellifer *Daucus Carota* L. (carrot): alkylation of benzene by acetylenyl(vinyl)carbinols in the presence of toluene-p-sulphonic acid. *J. Chem. Soc., Section C*, **1969**, 685-688.

Bohlmann, F.; Niedballa, U.; Rode, K.-M., Über neue Polyine mit C₁₇-Kette. *Chemische Berichte* **1966**, *99*, 3552-3558.

Cantwell, M.; Yang, S. F.; Rubatzky, V. Isocoumarin Content of Carrots as Influenced by Ethylene Concentration, Storage Temperature and Stress Conditions. *Acta Horticulturae* **1989**, *258*, 523-534.

Condon, P. J.; Kuc, J.; Draudt, H. N. Production of 3-Methyl-6-Methoxy-8-Hydroxy-3,4-Dihydroisocoumarin by Carrot Tissue. *Phytopathology* **1963**, *53*, 1244-1250.

Coxon, D. T.; Curtis, R. F.; Price, K. R.; Levett, G. Abnormal Metabolites produced by *Daucus Carota* Roots stored under Conditions of Stress. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1881-1885.

- Dodson, A.; Fukui, H. N.; Ball, C. D.; Carolus, R. L.; Sell, H. M. Occurrence of a bitter Principle in Carrots. *Science* **1956**, *124*, 984-985.
- Eckenbach, U.; Lampman, R. L.; Seigler, D. S.; Ebinger, J.; Novak, R. J. Mosquitocidal activity of acetylenic compounds from *Cryptotaenia canadensis*. *J. Chem. Ecology* **1999**, *25*, 1885-1893.
- Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1*H*,4*H*-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231-238.
- Frank, O.; Jezussek, M.; Hofmann, T. Sensory activity, chemical structure and synthesis of Maillard generated, bitter tasting 1-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indolizinium-6-olates. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2693-2699.
- Franke, W. Nutzpflanzenkunde, 6. Auflage, 1997, Thieme Verlag.
- Garrod, B.; Lewis, B. G.; Coxon, D. T. Cis-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyine-3,8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiological Plant Pathology* **1978**, *13*, 241-246.
- Garrod, B.; Lewis, B. G. Location of the Antifungal Compound Falcarindiol in Carrot Root Tissue. *Trans. Br. Mycol. Soc* **1979**, *72*, 515-517.
- Haddad, D. et al. *Egypt. Pharm. Bull. Sci. Ed.* **1958**, *40*, 81.
- Hansen, L.; Boll, P. M. The Polyacetylenic Falcarinol as the Major Allergen in *Schefflera Arboricola*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 529-530.
- Herrmann, K. Über Bitterstoffe in pflanzlichen Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **1972**, *4*, 105-142.
- Herrmann, K. Inhaltsstoffe der Möhren. *Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung* **1995**, *7*, 266-274.

Hofmann, T. Influence of L-cysteine on the formation of bitter-tasting aminohexose reductones from glucose and L-proline: Identification of a novel furo[2,3-b]thiazine. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4763-4768.

Howard L R **et al.** Steam treatment of minimally processed carrot sticks to control surface discoloration. *Journal of Food Science* **1994**, *59*, 356-358.

Kemp, M. S. Falcarindiol: An Antifungal Polyacetylene from *Aegopodium Podagraria*. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1002.

Kurosaki, F.; Nishi, A. Isolation and Antimicrobial Activity of the Phytoalexin 6-Methoxymellein from Cultured Carrot Cells. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 669-672.

Kurosaki, F.; Matsui, K.; Nishi, A. Production and metabolism of 6-methoxymellein in cultured carrot cells. *Physiological Plant Pathology* **1984**, *25*, 313-322.

Lewis, B. G.; Garrod, B.; Sullivan, C. Accumulation of Antifungal Compounds on Wound Surfaces of Carrot Root Tissue. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1983**, *80*, 183-184.

Lund, D. L.; White, J. M. Polyacetylenes in Normal and water-Stressed 'Orlando-Gold' Carrots (*Daucus Carota*). *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *51*, 507-516.

Lund, D. L.; Bruemmer, J. H. Acetylenic Compounds in Stored Packaged Carrots. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *54*, 287-294.

Marinelli, F.; Ronchi, V. N.; Pini, D.; Salvadori, P. Induction of 6-Methoxymellein and 6-Hydroxymellein Production in Carrot Cells. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 849-851.

Marinelli, F.; Ronchi, V. N.; Salvadori, P. Elicitor Induction of Enzyme Activities and 6-Methoxymellein Production in Carrot Cell Suspension Culture. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1457-1460.

- Marinelli, F.; Zanelli, U.; Ronchi, V. N. Toxicity of 6-Methoxymellein and 6-Hydroxymellein to the Producing Carrot Cells. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 641-643.
- Mercier, J.; Arul, J. A Simple Method for the Extraction of the Isocoumarin 6-Methoxymellein from Carrot Tissues. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *61*, 375-376.
- Mercier, J.; Ponnampalam, R.; Berard, L. S.; Arul, J. Polyacetylene Content and UV-Induced 6-Methoxymellein Accumulation in Carrot Cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *63*, 313-317.
- Mercier, J.; Arul, J.; Julien, C. Effect of food preparation on the isocoumarin, methoxymellein, content of UV-treated carrots. *Research International* **1994**, *27*, 401-404.
- Miyazawa, M.; Shimamura, H.; Bhuvra, R. C.; Nakamura, S.; Kameoka, H. Antimutagenic activity of falcarindiol from *Peucedanum praeruptorum*. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3444-3448.
- Müller, H. Untersuchungen zur Bildung von 3-Methyl-6-methoxy-3,4-dihydroisocoumarin bei der Möhrenlagerung. *Phytopath. Z.* **1978a**, *93*, 241-248.
- Müller, H. Die fluoreszenzspektroskopische Bestimmung des Phytoalexins 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin nach Abtrennung durch Gelfiltration. *J. Chrom.* **1978b**, *151*, 241-244.
- Olsson, K.; Svensson, R. The Influence of Polyacetylenes on the Susceptibility of Carrots to Storage Diseases. *J. Phytopathology* **1996**, *144*, 441-447.
- Ottinger, H.; Bareth, A.; Hofmann, T. Characterization of natural "cooling" compounds formed from glucose and L-proline in dark malt by application of taste dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1336-1344.
- Römpp Chemie Lexikon, 9. Auflage, Herausgegeben von J. Falbe und M. Regitz, Thieme Verlag, 1992

Rosenfeld, H. J.; Samuelsen, R. T. The Effect of Soil-Relationships and Temperature on Sensory and Chemical Quality Parameters of Carrots (*Daucus Carota* L.). *Acta Horticulturae* **2000**, *514*, 123-131.

Rosenfeld, H. J.; Aaby, K.; Lea, P. Influence of temperature and plant density on sensory quality and volatile terpenoids of carrot (*Daucus carota* L.) root. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1384-1390.

Rothe, M.; Thomas, B. Aromastoffe des Brotes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1963**, *119*, 302-310

Sarkar, S. K.; Phan, C. T. The Biosynthesis of 8-Hydroxy-6-methoxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin and 5-Hydroxy-7-methoxy-2-methylchromone in Carrot Root Tissues Treated with Ethylene. *Physiol. Plant.* **1975**, *33*, 108-112.

Sarkar, S. K.; Phan, C. T. Naturally-Occurring and Ethylene-Induced Phenolic Compounds in Carrot Root. *Journal of Food Protection* **1979**, *42*, 526-534.

Schaller, R. G.; Broda, S.; Schnitzler, W. H. Chemische, chemosensorische und humansensorische Untersuchungen zu Geschmack und Aroma von Möhren. *Nahrung* **1998**, *42*, 400-405.

Schlichterle-Cerny, H.; Grosch, W. Technol. Evaluation of taste compounds of stewed beef juice. *Eur. Food Res.* **1998**, *207*, 369-376.

Seifert, R. M.; Buttery, R. G. Characterization of Some Previously Unidentified Sesquiterpenes in Carrot Roots. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 181-183.

Seljasen, R.; Bengtsson, G. B.; Skrede, G.; Vogt, G. Rapid analysis of 6-methoxymellein in carrots by boiling water extraction, solid phase extraction and HPLC. *Food Chemistry* **2000**, *70*, 397-401.

Seljasen, R.; Hoftun, H.; Bengtsson, G. B. Sensory quality of ethylene-exposed carrots (*Daucus carota* L, cv 'Yukon') related to the contents of 6-methoxymellein, terpenes and sugars. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *81*, 54-61.

Seljasen, R.; Bengtsson, G. B.; Hoftun, H.; Vogt, G. Sensory and chemical changes in five varieties of carrot (*Daucus carota* L) in response to mechanical stress at harvest and post-harvest. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 436-447.

Shallenberger, R. S.; Atkin, J. D.; Moyer, J. C. The isolation and partial characterization of a volatile essential oil fraction from bitter canned carrots. *Food Research* **1960**, *25*, 419-423.

Simon, P. W.; Peterson, C. E.; Lindsay, R. C. Correlations between Sensory Objective Parameters of Carrot Flavor. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 559-562.

Sondheimer, E.; Phillips, W. F.; Atkin, J. D. Bitter flavor in carrots. I. A tentative spectrophotometric method for the estimation of bitterness. *Food Research* **1955**, *20*, 659-665.

Sondheimer, E. Bitter Flavor in Carrots. III. The Isolation Of A Compound With Spectral Characteristics Similar To Hydrocarbon Extracts Of Bitter Carrots. *Food Research* **1957**, *22*, 296-299.

Sondheimer, E. The Isolation and Identification of 3-Methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin from Carrots. *J. Amer. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5036-5039.

Sondheimer, E. (1961) Possible Identity of a Fungitoxic Compound from Carrot Roots. *Phytopathology* **1961**, *51*, 71-72.

Starkovsky, N. A. A New Constituent of *Daucus carota* L.: 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyde. *J. Organ. Chem.*, **1962**, *27*, 3733-3734.

Suojala, T.; Tupasela, T. Sensory Quality of Carrots: Effect of Harvest and Storage Time. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil and Plant Sci.* **1999**, *49*, 143-151.

Talcott, S. T.; Howard, L. R. Chemical and sensory quality of processed carrot puree as influenced by stress-induced phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1362-1366.

- Talcott, S. T.; Howard, L. R. Determination and distribution of 6-methoxymellein in fresh and processed carrot puree by a rapid spectrophotometric assay. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3237-3242.
- Talcott, S. T.; Howard, L. R.; Brenes, C. H. Factors contributing to taste and quality of commercially processed strained carrots. *Food Research International* **2001**, *34*, 31-38.
- Tilgner, D. J. Dilution Test for Odor and Flavor Analysis. *Food Technol.* **1962**, *16*, 26-29.
- Warendorf, T.; Belitz, H. D. Zum Geschmack von Fleischbrühe: 1. Quantitative Analyse der nichtflüchtigen Inhaltsstoffe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 209-214.
- Warendorf, T.; Belitz, H. D.; Gasser, U.; Grosch, W. Zum Geschmack von Fleischbrühe: 2. Sensorische Analyse der Inhaltsstoffe und Imitation einer Fleischbrühe. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *195*, 215-223.
- Warmke, R.; Belitz, H. D.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 230-235
- Wulf, L. W.; Nagel, C. W.; Branen, A. L. Analysis of Myristicin and Falcarinol in Carrots by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 1390-1393.
- Yamaguchi, H.; Howard, F. D.; Mc Nelly, L. B. Observations on bitterness of California grown carrots. *Plant Disease Rep.* **1955**, *39*, 302.
- Yates, S. G.; England, R. E. Isolation and Analysis of Carrot Constituents: Myristicin, Falcarinol and Falcarindiol. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 317-320.
- Yoshino, N.; Kawaguchi, T.; Tokuoka, K.; Ishitani, T.; Hirata, T. 6-Methoxymellein levels in fresh carrots in relation to the sensory quality. *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol.* **1993**, *40*, 17-21.