

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik

## Strukturaufklärung und psychophysikalische Studien zu sensorisch aktiven Naturstoffen in Spargel (*Asparagus officinalis* L.) und Pfeffer (*Piper nigrum* L.)

Corinna Dawid

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. R. Treutter  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Th. F. Hofmann  
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle  
3. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Die Dissertation wurde am 09.02.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landwirtschaft und Umwelt am 21.05.2012 angenommen.







## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann, danke ich sehr herzlich für die Überlassung zwei so interessanter Themen, die hervorragende motivierende wissenschaftliche Betreuung und die Freiheit, meine eigenen Ideen zu verwirklichen, die fortwährende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Zudem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der Technischen Universität München für die Hilfsbereitschaft, die angenehme Zusammenarbeit sowie für viele schöne Stunden privater Natur.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andrea Henze, Dr. Oliver Frank und Dr. Roman Lang für die vielen hilfreichen Ratschläge bei sachlichen Fragen meiner Arbeit und für alle praktischen Tipps.

Meinen Laborkollegen „aus Münster“ Andreas Degenhardt, Dr. Andrea Henze, Katharina Lorenz, Dr. Christoph Müller und Fotios Zigouris sowie den in „Freising dazugekommenen“ Christina Schmidt, Nadine Wollmann, Annika Wahl, Dr. Roman Lang und Peter Kornas danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch Dr. Julia Scherb-Forster und Prof. Dr. Schieberle für die Synthese der Asparagussäure sowie für den wissenschaftlichen Austausch auf dem Spargel-Gebiet.

Dr. Timo Stark, Dr. Roman Lang, Dr. Daniel Intelmann, Katharina Lorenz und Dr. Andrea Henze danke ich für die Einarbeitung in die LC-MS/MS und darüber hinaus für den wertvollen Austausch auf diesem Gebiet. Bei Ines Otte und Sami Kaviani-Nejad bedanke ich mich für ihr Engagement bei der Aufnahme der exakten Massenspektren. Mein Dank gilt zudem Dr. Oliver Frank, Dr. Ludger Schmiech, Dr. Bernd Schwarz, Christof Kunert, Barbara Süß, Karola Fastus und Maren Ilse für die zahlreichen Aufnahmen der NMR-Spektren sowie auch

für ihre Hilfe bei deren Beurteilung. Bei Andreas Dunkel und Dr. Michael Lange-Aperdanner bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Behebung diverser Computerprobleme. Johanna Kreißl danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei den Messungen der GC-MS-Spektren sowie für die gemeinsamen sonntäglichen Schreibsessions.

Weiterhin bedanke ich mich bei dem Julius Kühn-Institut, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, für die Bereitstellung des Probenmaterials sowie bei Olaf Ackermann und Prof. Bach für die Unterstützung bei der Ozonolyse der Alkylamide.

Für ihren tatkräftigen Einsatz auf dem Gebiet der Pfefferforschung danke ich: Dr. Andrea Henze, Dr. Oliver Frank, Dr. Anneke Glabasia, Diana Orlikowski, Kirsten Büning, Matthias Rupp, Matthias Bader, Andreas Daschner und Ulrike Ostermeier.

Bei Christina Dawid, Andreas Dunkel, Dr. Roman Lang, Florian Wolf und Nadine Wollmann bedanke ich mich vielmals für die detaillierte Durchsicht des Manuskriptes.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch meiner ganzen Familie, die mich jederzeit und ohne jegliche Zweifel an meinem Erfolg liebevoll unterstützt hat und mir somit meine Ausbildung ermöglicht hat. Danke.

## Vorbemerkung

Der praktische Teil der Arbeit wurde von Januar 2006 bis September 2007 am Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster begonnen und von Oktober 2007 bis Juni 2010 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München in Freising fortgesetzt, jeweils unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann.

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in mehreren international anerkannten Zeitschriften und Büchern vorveröffentlicht.

Chrubasik, C.; Maier, T.; Dawid, C.; Torda, T.; Schieber, A.; Hofmann, T.; Chrubasik, S. An Observational Study and Quantification of the Actives in a Supplement with *Sambucus nigra* and *Asparagus officinalis* used for Weight Reduction. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 913–918.

Dawid, C.; Hofmann, T. Characterization of the key bitter tastants in white asparagus (*Asparagus officinalis* L.) by means of a sensomics approach. In: T. Hofmann, W. Meyerhof, P. Schieberle (Eds.), *Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology*, DFA, Freising, Deutschland, **2011**, 112–116.

Dawid, C.; Henze, A.; Frank, O.; Glabasnia, A.; Rupp, M.; Büning, K.; Orlikowski, D.; Bader, M.; Hofmann, T. Structural and Sensory Characterization of Key Pungent and Tingling Compounds from Pepper (*Piper nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*(11), 2884–2895.





**Meinen Eltern und meiner Großmutter**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Symbole.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Trivialnamen .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Geschmack.....	1
1.2 Wahrnehmung der unterschiedlichen Geschmacksmodalitäten .....	2
1.3 Somatosensorische Wahrnehmungen .....	10
1.4 Methoden zur sensorischen Charakterisierung von Geschmacksstoffen.....	20
1.5 Allgemeines zum Spargel .....	22
1.5.1 Sensorisch aktive Substanzen in Spargel .....	24
1.5.2 Spargelsaponine und deren sensorische Relevanz.....	27
1.6 Allgemeines zum Pfeffer .....	34
1.6.1 Pfefferinhaltsstoffe und deren sensorische Relevanz.....	35
<b>2 Ziel der Untersuchungen.....</b>	<b>43</b>
<b>3 Spargel (<i>Asparagus officinalis</i> L.) – Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
3.1 Untersuchungen zum Geschmack des rohen und gekochten Spargels ( <i>Asparagus officinalis</i> L.).....	45
3.1.1 Geschmacksprofilanalyse .....	45
3.2 Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierung von Geschmacksstoffen in Spargel .....	48
3.2.1 Aktivitätsorientierte Fraktionierung von <i>Asparagus officinalis</i> L. var. Grolim.....	48
3.2.2 Lokalisierung und Identifizierung geschmacksaktiver Substanzen in Fraktion III50	
3.2.3 Lokalisierung und Identifizierung geschmacksaktiver Substanzen in Fraktion IV76	
3.2.4 Lokalisierung, Identifizierung und Synthese von Bitterstoffen und Saponinen aus weiteren Pflanzenteilen von <i>Asparagus officinalis</i> L. ....	78
3.2.5 Analytischer Nachweis von Bitterstoffen und Saponinen in weißen Spargelstangen.....	84
3.3 Humansensorische Untersuchungen der Spargelinhaltsstoffe .....	86
3.4 Quantifizierung von Bitterstoffen in Spargel .....	88
3.4.1 Entwicklung und Validierung einer Quantifizierungsmethode zur Bestimmung von Spargelsaponinen .....	88
3.4.2 Quantifizierung und Bestimmung des Geschmacksbeitrags der Bitterstoffe in rohen und gekochten Spargelstangen sowie in Spargel-Kochwasser .....	97

3.4.3	Quantifizierung von Saponinen in Spargelhandelsproben .....	100
3.4.4	Quantitative und psychophysikalische Studien zur Bitterstoffverteilung in Spargelstückchen.....	102
3.5	Diskussion .....	106
<b>4</b>	<b>Pfeffer (<i>Piper nigrum</i> L.) – Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>111</b>
4.1	Sensorische Untersuchungen verschiedener Pfeffersorten .....	111
4.2	Einfluss von Piperin auf die Gesamtschärfe .....	112
4.3	HPLC-Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC-GVA) des Ethanolextraktes .....	114
4.4	Isolierung und Identifizierung sensorisch aktiver Inhaltsstoffe .....	117
4.4.1	Identifizierung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in Fraktion A.....	118
4.4.2	Identifizierung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in Fraktion B.....	122
4.4.3	Identifizierung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in Fraktion C.....	130
4.4.4	Diskussion .....	148
4.5	Psychophysikalische Studien zu den Säureamiden aus Pfeffer .....	153
4.5.1	Entwicklung eines sensorischen Testverfahrens .....	153
4.5.2	Humane Geschmacksschwellenwerte.....	157
4.5.3	Struktur und Aktivität von geschmacksaktiven Säureamiden.....	159
4.5.4	Humane Dose/Response-Kurven ausgewählter Schlüssel-inhaltsstoffe .....	161
4.5.5	Diskussion .....	164
4.6	Quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Schlüssel-inhaltsstoffe des Pfeffers .....	165
4.6.1	Quantifizierung von Scharfstoffen in schwarzem Pfeffer ( <i>Piper nigrum</i> L.) und Berechnung von Dose-over-Threshold (DoT)-Faktoren.....	165
4.6.2	Quantifizierung der Säureamide in unterschiedlichen Pfefferdrogen der Familie der Piperaceae.....	169
4.6.3	Diskussion .....	171
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>173</b>
5.1	Untersuchungsmaterialien, Reagenzien und Materialien.....	173
5.1.1	Untersuchungsmaterialien.....	173
5.1.2	Reagenzien.....	174
5.1.3	Materialien .....	177
5.2	Isolierung und Fraktionierung sensorisch aktiver Substanzen aus Spargel und Pfeffer .....	178
5.2.1	Isolierung und Fraktionierung geschmacksaktiver Substanzen aus Spargel ..	178
5.2.2	Isolierung und Fraktionierung sensorisch aktiver Substanzen aus Pfeffer .....	181
5.3	Isolierung und Identifizierung von sensorisch aktiven Inhaltsstoffen.....	182
5.3.1	Isolierung und Identifizierung von sensorisch aktiven Inhaltsstoffen in Spargel.....	182
5.3.2	Isolierung und Identifizierung von sensorisch aktiven Inhaltsstoffen in Pfeffer .....	189
5.4	Synthese von Referenzsubstanzen.....	206
5.4.1	Synthesen von Referenzsubstanzen aus Spargel .....	206
5.4.2	Synthesen von Referenzsubstanzen aus Pfeffer .....	209

5.4.3	Synthese von Piperettin und Piperolein.....	213
5.5	Qualitative und quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe des Spargels und Pfeffers .....	215
5.5.1	Quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe des Spargels .	215
5.5.2	Quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe des Pfeffers ...	219
5.6	Psychophysikalische Studien.....	222
5.6.1	Sensorische Analysen des Spargels.....	223
5.6.2	Sensorische Analyse des Pfeffers.....	226
5.7	Chromatographische Methoden.....	230
5.8	Spektroskopische Methoden.....	233
5.8.1	UV/VIS-Spektroskopie .....	233
5.8.2	HPLC/Massenspektrometrie (HPLC/MS) .....	233
5.8.3	Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS).....	237
5.8.4	Bestimmung der exakten Masse .....	237
5.8.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR) .....	238
5.8.6	Sonstiges.....	242
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>246</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>249</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>279</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
amu	Atomic Mass Unit
ANTKM1	<i>ankyrin-like protein with transmembrane domains 1</i>
ASICs	<i>Acid-Sensing Ion Channel</i>
ASSC	<i>Amiloride Sensitive Sodium Channel</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CE	Collision energy
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
CI	Chemische Ionisation
<sup>13</sup> C-NMR	<sup>13</sup> C-Kernresonanzspektroskopie
COSY	Homonuclear Correlated Spectroscopy
CXP	Cell Exit Potential
d	Dublett
2D	Zweidimensional
DC	Dünnschichtchromatographie
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Dublett vom Dublett
DMSO-d <sub>6</sub>	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DoT	Dose-over-Threshold
DMDS	Dimethyldisulfid
DP	Declustering Potential
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ENaC	epithaler Natrium-Kanal
ESI	Electrospray Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
ESI	Elektrospray Ionisation
eV	Elektronenvolt
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

FAT	Fatty acid transporter
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
Glc	Glucose
G-Protein	Guanosinnucleotid bindende Proteine
GRP	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GV	Geschmacksverdünnung
GVA	Geschmacksverdünnungsanalyse
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HCN	Hyperpolarisation aktivierte nicht selektive Kationenkanäle
HEK293	Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
<sup>1</sup> H-NMR	<sup>1</sup> H-Kernresonanzspektroskopie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IC	Ionenchromatographie
i.d.	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
IS:	ion spray voltage
JP	Jungpflanze
KCNK	Klasse von K <sup>+</sup> -Kanälen mit zwei Porendomänen pro Untereinheit
l	Liter
L.	Linnaeus (Carl von Linné)
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
m	Multiplett
m (o)	Multiplett ( <i>overlaped</i> )
M	Molarität
d <sub>4</sub> -MeOD	Methanol, deuteriert
MeOH	Methanol

mg	Milligramm
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
μ	mikro
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.n.	nicht nachweisbar
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
p.a.	pro analysis
PKD1L3	<i>Polycystic kidney disease 1-like 3 ion channel</i>
PKD2L1	<i>Polycystic kidney disease 2-like 1 ion channel</i>
ppm	Parts per million
PROP	Propylthiouracil
pt	Pseudotriplett
PTC	Phenylthioharnstoff
d <sub>5</sub> -Pyridin	Pyridin, deuteriert
q	Quartett
RF	Responsefaktor
Rha	Rhamnose
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur



s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
sec	Sekunde
SIM	Single Ion Monitoring
SIVA	Stabil Isotopen Verdünnungs Analyse
SPE	Festphasenextraktion
SRM	Selected Reaction Monitoring
t	Triplett
TBME	Tert. Butylmethylether
TBDMS	2,6-Di(tertbutyl)-4-methylpyridin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Total Ion Chromatogramm
TMS	Tetramethylsilan
TOF	Time of Flight
TRP	<i>transient-receptor-potential ion-channel family</i>
TRPP	<i>polycystic kidney disease (PKD)</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid subfamily channel 1 (Vanilloid (Capsaicin) Rezeptor Typ 1)</i>
UV/Vis	Ultraviolett/Visible-Spectroscopy
v/v	Volumen/Volumen
Xyl	Xylose

## Symbole

$m/z$	Verhältnis von Masse zu Ladung
$\delta$	Chemische Verschiebung
$J$	Kopplungskonstante, [Hz]
$\lambda$	Wellenlänge, [nm]
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

## Trivialnamen

Asparagussäure	1,2-Dithiolan-4-carbonsäure
Asperasaponin-I (ASP-I, AS-P2-I oder Protoneodi- oscin)	3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}]- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25S)-22-hydroxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol
Asperasaponin-II (ASP-II)	25S-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid
AS-1	3-O-[[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] { $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}]- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25S)-5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -ol
AS-2-I	3-O-[[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] { $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}]- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25S)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol
(25R)-Dihydro- ASP-II	(25R)-Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid
(25S)-Dihydro- ASP-II	(25S)-Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid
Dioscin	3-O-[[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] { $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}]- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol
Diosgenin	(25R)-3 $\beta$ -Hydroxy-spirost-5-en
Diosgenin-3-O- $\beta$ - D-glucopyranosid (Trillin)	(3 $\beta$ ,25R)-Spirost-5-en-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid
Ginsenosid Rg1	(3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ )-3,12-Dihydroxydammar-24-en-6,20-bis- $\beta$ -D-glucopyranosid
Ginsenosid Rg2	(3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,12 $\beta$ )-3,12,20-Trihydroxydammar-24-en-6-yl-2-O-(6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid
Ginsenosid Rc	(3 $\beta$ ,12 $\beta$ )-20-[(6-O- $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl- $\beta$ -glucofuranosyl)oxy]-12-hydroxydammar-24-en-3-yl-2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
Methylprotodioscin	3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}]- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R)-22 $\alpha$ -methoxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol
Officinalisin-I	5 $\beta$ -Furostan-3 $\beta$ ,22,26 triol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside 26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid
Officinalisin-II	5 $\beta$ -Furostan-3 $\beta$ ,22,26 triol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopyranoside 26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid
Protodioscin (ACS-1)	3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}]- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R)-22-hydroxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol

Sarsapogenin	(25 <i>S</i> )-5 $\beta$ -Hydroxy-spirostan-3 $\beta$ -ol
Sarsapogenin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid (Asparagosid A)	(3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,25 <i>R</i> )-Spirostan-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid
$\beta$ -Sitosterol-3- <i>O</i> -glucosid	(3 $\beta$ )-Stigmast-5-en-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid
Smilagenin	(25 <i>R</i> )-5 $\beta$ -Hydroxy-spirostan-3 $\beta$ -ol
Yamogenin	(25 <i>S</i> )-3 $\beta$ -Hydroxy-spirost-5-en

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschmack

Der Genusswert von Lebensmitteln wird durch eine Vielzahl von sensorischen Systemen vermittelt. Darunter tragen Geruchs-, Tast- und Geschmacksempfindungen, die in der Summe als „Flavour“ benannt werden, in derselben Weise zum sensorischen Eindruck eines Lebensmittels bei. Während Geruchs- oder Aromastoffe flüchtige Verbindungen sind, die mit den in der Nase befindlichen Rezeptoren der *regio olfactoria* des Geruchssinns wahrgenommen werden können, zählen Geschmacksstoffe zu den meist nicht flüchtigen Verbindungen, die durch deren Wechselwirkung mit chemosensorischen Rezeptoren, gustatorisch detektiert werden können (Belitz et al., 2001; Schieberle und Hofmann, 2003; Haseleu, 2010).

Wissenschaftler haben in den letzten Jahrzehnten zunehmend begonnen, die basierenden zellulären und molekularen Prozesse zu erforschen, die erste Einblicke in die fünf primären Grundqualitäten des Geschmacks süß, sauer, bitter, salzig und umami erlauben. Besonders bei der Auswahl von Nahrungsmitteln greift der Mensch auf seine Urinstinkte zurück. Während die Süße von Nahrungsmitteln auf eine kalorienreiche Kost hindeutet, ermöglicht die Umamiwahrnehmung aminosäurereiche Speisen zu erfassen. Aber auch um den Elektrolyt-haushalt aufrechtzuerhalten, sucht der Mensch salzige Speisen. Sauer- und Bittergeschmack soll den Menschen dagegen vor verdorbenen oder giftigen Nahrungsmitteln warnen (Soldo, 2005; Chandrashekar, 2006).

Die Geschmackswahrnehmung erfolgt dabei über Geschmackssinneszellen, die in erster Linie auf der Zungenoberfläche zu finden sind. Vereinzelt sind diese jedoch auch am Kehlkopf, der hinteren Rachenwand sowie am Gaumensegel zu finden. Die Geschmackssinneszellen wiederum bilden zusammen mit den Basal- sowie den Stützzellen die zwiebelartig geformten Geschmacksknospen, die sich in dem Epithel der Zungenpapillen befinden. Die Geschmacksknospen, von denen jeder Mensch mehrere Tausend besitzt, sind auf der Zungenoberfläche unterschiedlich stark in den Geschmackspapillen verbreitet. Unterschieden wird zwischen drei Papillenarten, den großen Wallpapillen (*Papillae vallatae*) am Zungengrund und den kleineren Pilz- und Blattpapillen (*Papillae fungiformes* und *Papillae foliatae*) an der Zungenspitze sowie dem Zungenrand (Rhener und Daniel, 2002).

Neben den fünf bereits aufgeführten Geschmacksqualitäten tragen weitere orosensorische Empfindungen wie scharf, tingling, kühlend, heiß, adstringierend, kokumi, prickelnd und fettig ebenso zum sensorischen Gesamteindruck einzelner Lebensmittel bei. Diese sensorischen Empfindungen werden im Mundraum größtenteils nicht durch spezifische Geschmacksrezeptorzellen, sondern durch Nervenendungen des 5. Hirnnervs (*Nervus trigeminus*) wahrgenommen (Dunkel und Hofmann, 2010).

## 1.2 Wahrnehmung der unterschiedlichen Geschmacksmodalitäten

Grundlage für die gustatorische Wahrnehmung der fünf Basisgeschmacksrichtungen bilden zum einen Liganden-aktivierende Proteinkanalkomplexe, die den Sauer- und Salzeindruck ionotrop vermitteln und zum anderen metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die für den Bitter-, Süß- und Umamigeschmack verantwortlich sind (Lindemann, 2001).

### Salzgeschmack

Dabei wird der Salzgeschmack im Mundraum durch Ionen anorganischer Salze, wie z. B. Natriumchlorid, hervorgerufen. Besonders um den Elektrolythaushalt aufrecht zu erhalten, ist die tägliche Aufnahme solcher Mineralsalze für den Menschen von immenser Bedeutung (Meyerhof, 2003; Chandrashekar, 2006; Stähler et al., 2008). In der Literatur werden bei Nagetieren mehrere mögliche Transduktionsmechanismen als molekulare Grundlagen des Salzgeschmacks diskutiert. Ein denkbarer Vertreter für die Reizauslösung ist der Amilorid-sensitive epitheliale Natriumkanal (ENaC) (Stähler et al., 2008; Chandrashekar et al., 2010). Während sich der ENaC bei Nagern aus vier Untereinheiten, das heißt zwei  $\alpha$ - und je einer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zusammensetzt, ist beim Menschen eine  $\alpha$ - durch eine  $\delta$ -Untereinheit ausgetauscht (Stähler et al., 2008). Da im Gegensatz zu den epithelialen Natriumkanälen von Nagetieren die humanen Kanäle lediglich eingeschränkt auf Amilorid reagieren, ist es durchaus vorstellbar, dass der epitheliale Natriumkanal an der Salzgeschmackswahrnehmung des Menschen nur bedingt beteiligt ist. Humansensorische Untersuchungen von Amilorid in Kombination mit NaCl führten beispielsweise nur zu einer Reduktion der Salzkonzentration um 21% (Smith und Ossebaard, 1995). Deshalb stehen bei Menschen zunehmend die nicht Amilorid-sensitiven Vertreter, wie eine Variante des Vanilloidrezeptors TRPV1, in der Diskussion, am Salzgeschmack beteiligt zu sein (Treesukosol, 2007). Die Firma Senomyx hat zudem 2009 den Ionenkanal TRPML3, der auch MCOLN3 (*muco lipin 3*) genannt wird,

als weiteren möglichen Amilorid-unsensitiven Salzrezeptor patentieren lassen (Moyer et al., 2009).

### **Sauergeschmack**

Als weitere ionotrop vermittelte Geschmacksrichtung neben der Salzigkeit ist der Sauergeschmack zu erwähnen. Zahlreiche Nahrungsmittel, wie Brausepulver, Balsamicoessig oder Zitronen zeichnen sich in ihrem Geschmacksprofil durch einen sauren Eindruck aus. Hufnagel und Hofmann (2008<sup>a</sup>) konnten beispielsweise zeigen, dass die angenehme Säure eines Amarone Rotweines auf organische Säuren wie Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure oder Isozitronensäure zurückzuführen ist. Aber auch anorganische Säuren werden in der Literatur immer wieder als sauer schmeckend charakterisiert (Da Conceicao Neto et al., 2007). Obwohl schon lange an den molekularen Grundlagen des Sauergeschmacks gearbeitet wird, kann in der Literatur noch keine zusammenfassende und vollständige Aussage über die Sauertransduktionswege gefunden werden.

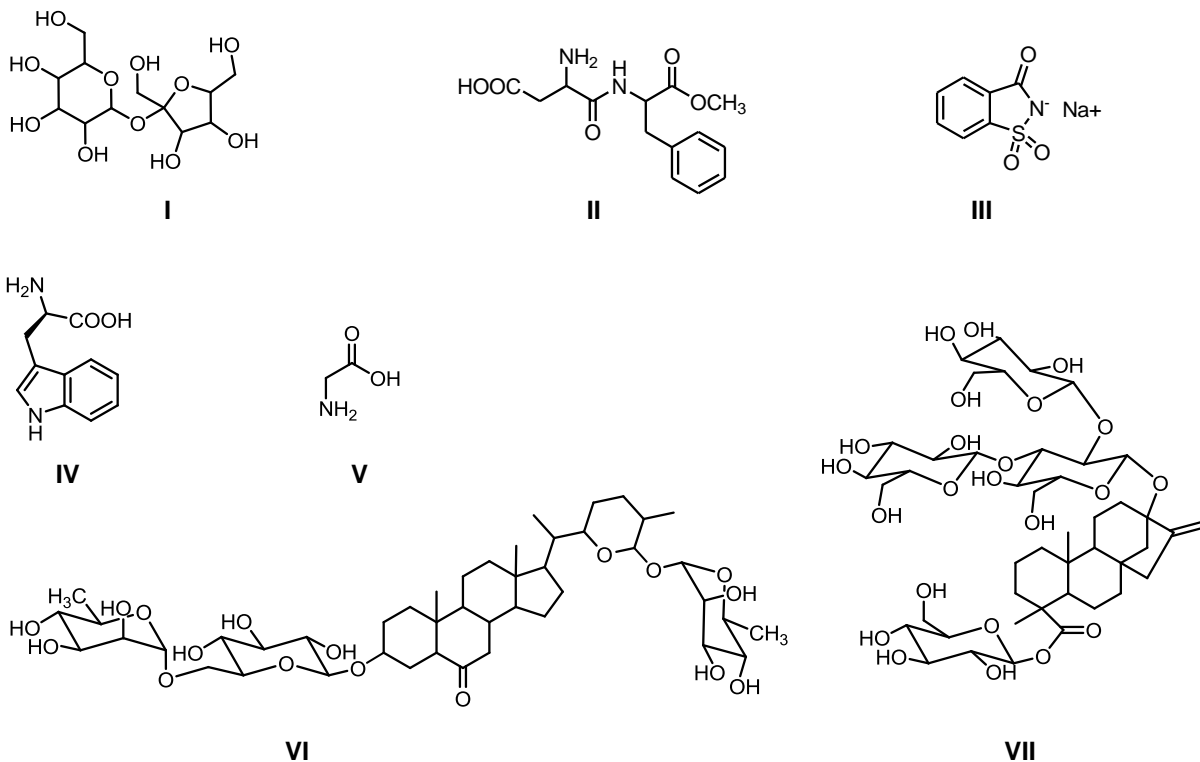
In den letzten Jahren wurde vor allem das Heterodimer aus den Transmembranproteinen PKD2L1 (Polycystic kidney disease 2-like 1 ion channel) und PKD1L3 (Polycystic kidney disease 1-like 3 ion channel) als molekulare Sensoren zur Vermittlung des Sauergeschmacks in den Vordergrund gestellt. Während der PKD2L1 ein Protein mit sechs Transmembrandomänen darstellt, besitzt der PKD1L3 dagegen elf (Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; LopezJimenez et al., 2006). Das Heteromer stammt aus einer der Unterfamilien der TRP-Kanäle (transient receptor potential), der PKD-Familie (polycystic kidney disease) (LopezJimenez et al., 2006). Huang et al. (2006) verdeutlichten insbesondere mit Hilfe von Knockout-Mäusen die Bedeutung der Untereinheit PKD2L1 für den Sauergeschmack.

Eine weitere, in der Literatur vorgestellte mögliche Reizübertragung basiert auf zwei Kanälen der HCN-Familie, den so genannten „Schrittmacherkanälen“ HCN1 und HCN4 (Stevens et al., 2001). Studien an Hamstern haben verdeutlicht, dass auch hier der ENaC, der zum Salzgeschmack beiträgt, bei geringen mucosalen Natriumkonzentrationen zur sauren Transduktion beisteuert (Rehnberg et al., 1992; Gilbertson et al., 1993). Da die humanen Natriumgehalte vergleichbar höher liegen, wird heute davon ausgegangen, dass der ENaC als Sauerinduktionsweg eher vernachlässigbar ist. Als weitere vorgeschlagene Signaltransduktionswege des Sauergeschmacks werden der Acid-Sensing Ion Channel (ASICs) (Ugawa et al., 1998; Ugawa et al., 2003; Huang et al., 2006), der Protonen-selektive GPR4 (Ludwig et al., 2003) sowie der Säure-sensitive Kaliumkanal K2P diskutiert (DeSimone und Lyall, 2006;

Huang et al., 2006). Dennoch konnten Richter et al. (2004) interessanterweise keine mRNA des ASICS2 in den Geschmacksknospen der Mäuse mittels PCR nachweisen.

## Süßgeschmack

Bei der Beurteilung von Lebensmitteln gehört neben den sauren und salzigen Noten vor allem die Süße zu den entscheidenden sensorischen Kriterien. Zu den süßen Verbindungen gehören nicht nur ubiquitär vorkommende Zucker, wie Saccharose, Glucose oder Fructose, sondern auch natürliche und synthetisierte Süßstoffe. Gängige Beispiele für synthetisch gewonnene Süßstoffe sind Aspartam, Cyclamat, Acesulfam K oder Saccharin (vgl. Abbildung 1). Auch natürliche Süßstoffe wie die Peptide Thaumatin I und II (van der Wel und Loeve, 1972), Steviolglycoside wie das Rebaudiosid A (Tanaka, 1982), Aminosäuren wie D-Tryptophan und Glycin (Kier, 1972) oder Saponine wie Osladin (Yamada und Nishizawa, 1995) sind seit langem bekannt (Übersicht in Belitz et al., 2001 und in Behrens et al., 2011) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Strukturen süß schmeckender Substanzen: Saccharose (I), Aspartam (II), Saccharin (III), D-Tryptophan (IV), Glycin (V), Osladin (VI) und Rebaudiosid A (VII).**

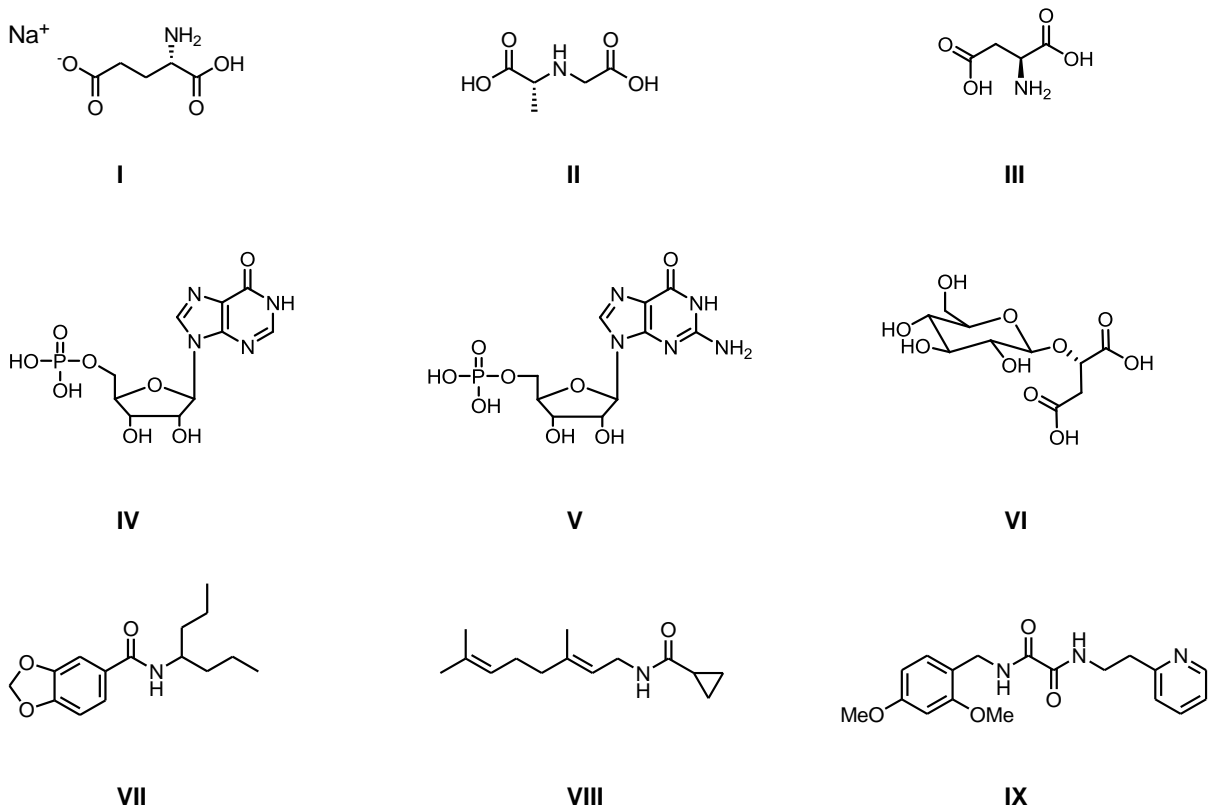


Zahlreiche Studien der letzten Jahre vermitteln, dass neben der Umami- auch die Süßwahrnehmung auf der Aktivierung metabotroper G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Klasse C (C-GPCRs) basiert (Behrens et al., 2011). Der Kombination von zwei Untereinheiten aus der TAS1R-Familie, dem Heterodimer aus T1R2 und T1R3, wird dabei die Süßwahrnehmung zugeschrieben (Hoon et al., 1999; Li et al., 2002; Zhao et al., 2003). Als Besonderheit besitzen beide Isoformen, neben sieben helicalen Transmembrandomänen, extrazelluläre Amino-terminale Abschnitte mit Venusfliegenfallen-Bindungsdomänen (Morini et al., 2005; Chandrashekar et al., 2006; Temussi, 2006). Dabei aktivieren die süß schmeckenden Agonisten, die sich strukturell oftmals stark unterscheiden, den T1R2/T1R3-Rezeptor in unterschiedlichen Rezeptorregionen. Während Jiang et al. (2005) beispielsweise zeigen konnten, dass die Süßstoffe Cyclamat und Saccharin die C-terminalen Transmembrandomänen des T1R3 aktivieren, fanden Xu et al. (2004) heraus, dass Aspartam am N-terminalen Ende in dem Venus-Fliegenfallen-Modul der T1R2-Untereinheit an den Rezeptor bindet. Weitere Studien von Jiang et al. (2004) verdeutlichen, dass die cysteinreiche Domäne der T1R3-Untereinheit des Rezeptorpaars auf süße Proteine wie z. B. Brazzein ansprechen.

### **Umamigeschmack**

Neben der Süße zählt auch Umami zu den fünf Hauptgeschmacksrichtungen (Chandrashekar et al., 2006). Der Japaner Kikunae Ikeda beschrieb bereits 1909 erstmals den Geschmack des Mononatriumsalzes der L-Glutaminsäure als umami-artig (Ikeda, 2002). Neben Mononatriumglutamat wurden in den letzten Jahrzehnten viele weitere Umami-Geschmacksstoffe sowie deren Geschmacksverstärker entdeckt, von denen einige exemplarisch in Abbildung 2 aufgeführt sind.

Carbonsäuren wie auch deren Derivate, z. B. die Bernsteinsäure oder L-Asparaginsäure (Ney, 1971), werden ebenso umami-artig empfunden wie Morelid (Rotzoll et al., 2005) oder Strombin (Starkenmann et al., 2009). Besonders potente Umami-Verbindungen gingen aus zellbasierten Rezeptorscreening-Assays und synthetischen Struktur/Wirkungsstudien hervor: *N*-((*E*)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)cyclopropancarboxamid, *N*<sup>1</sup>-(2,4-Dimethoxy-benzyl)-*N*<sup>2</sup>-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)oxalamid und (*N*-(Heptan-4-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamid rufen einen Umami-Geschmack im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich hervor (Tachdjian et al., 2006; Dewis et al., 2006).



**Abbildung 2: Strukturen von Umami-Geschmacksstoffen bzw. Geschmacksverstärkern: Mononatrium-L-glutamat (I), Strombin (II), L-Asparaginsäure (III), Inosin-5´-monophosphat (IV), Guanosin-5´-monophosphat (V), (S)-Morelid (VI), N-(Heptan-4-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamid (VII), N-((E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl)-cyclopropanecarboxamid (VIII), N¹-(2,4-Dimethoxybenzyl)-N²-(2-(pyridin-2-yl)-ethyl)-oxalamid (IX).**

Genau wie beim Süßgeschmack basiert die metabotrope Umami-Wahrnehmung auf der Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren der Klasse C (C-GPCRs) (Lindemann, 2001; Chandrashekar et al., 2006; Behrens et al., 2011). Während die Süße einzelner Verbindungen durch das Dimer aus T1R2/T1R3 hervorgerufen wird, konnten Nelson et al. (2002) und Li et al. (2002) zeigen, dass insbesondere L-Glutamat neben diversen L-Aminosäuren das Heteromer aus T1R1 und T1R3 aktiviert. Obwohl wenig über den Aufbau und die Funktion des Rezeptorpaares bekannt ist, wird in der Literatur davon ausgegangen, dass die wesentlichen Mechanismen des Umami-Dimeres mit den Süßgeschmacksrezeptoren zu vergleichen sind (Behrens et al., 2011). Auch dieses Rezeptorpaar der TAS1R-Familie weist neben sieben Transmembrandomänen noch eine C- und eine extrazelluläre N-terminale Domäne mit einem Venus-Fliegenfallen-Modul auf (Parmentier et al., 2002; Pin et al., 2003). Zhang et

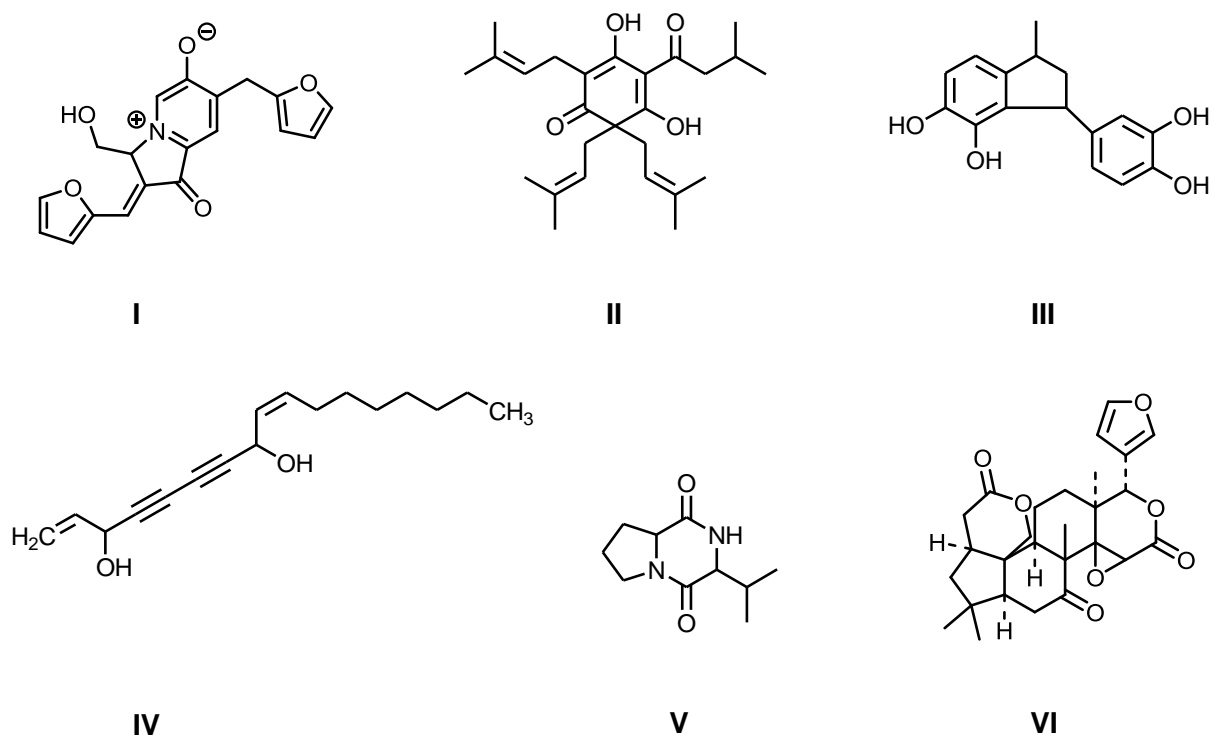
al. (2008) schlagen vor, dass L-Glutamat an der Scharnierregion der Venus-Fliegenfallen-Domäne bindet und damit einen Verschluss der Untereinheit hervorruft. Dagegen aktivierte der „high potency“ Umami-Geschmacksstoff *N*-(Heptan-4-yl)-benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamid die Transmembrandomäne des T1R1 (Zhang et al., 2008).

In der Literatur ist nicht nur beschrieben, dass Ribonucleotide, wie Inosine-5'-monophosphat und Guanosin-5'-monophosphat (Abbildung 2) durch synergistische Effekte die Umami-Intensität von Natriumglutamat erhöhen und somit die Rezeptoraktivität verstärken, sondern dass auch 5'-Ribonucleotide an einer anderen Position der Venus-Fliegenfalle als L-Glutamat binden und damit die geschlossene Konformation dieser Domäne begünstigen (Yamaguchi, 1967; Yamaguchi und Ninomya, 2000; Zhang et al., 2008).

Yasumatsu et al. (2009) konnten mit Hilfe von Knockout-Mäusen verdeutlichen, dass mGluR-Rezeptoren zusätzlich zu dem Rezeptordimer aus T1R1/T1R3 an der Umami-Detektion beteiligt sind. Insbesondere der taste-mGluR1 und der taste-mGluR8 aus der Familie der mGluR-Rezeptoren stehen als Glutamatrezeptoren in der Diskussion (Yasumatsu et al.; 2009).

### **Bittergeschmack**

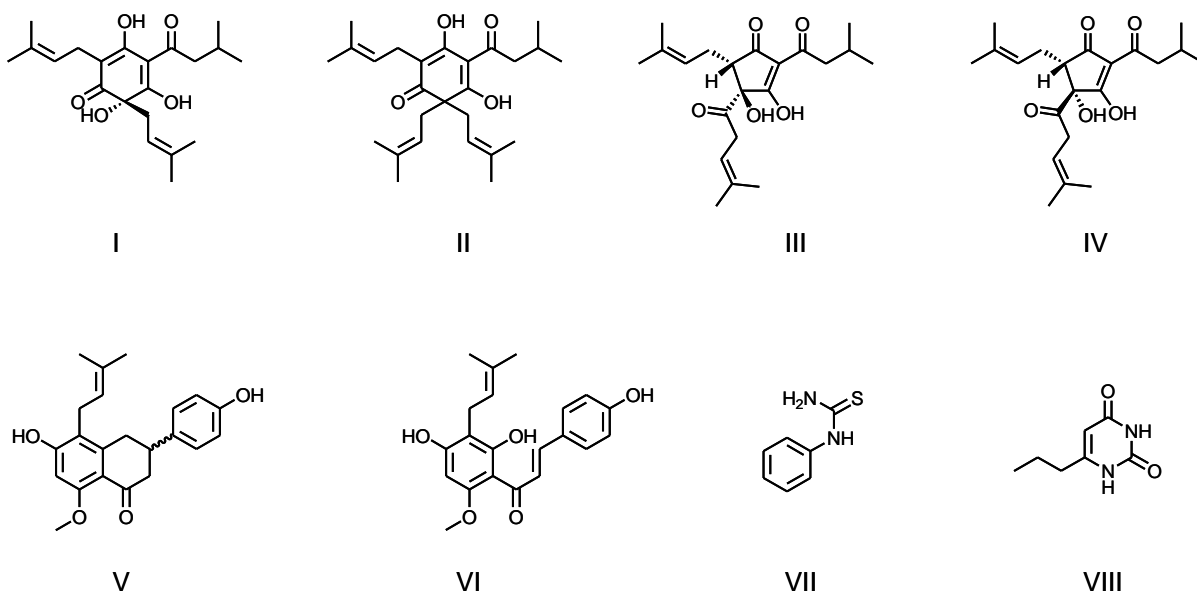
Während Umami und Süßnoten als angenehm empfunden werden, gilt der Bittergeschmack eines Lebensmittels beim Menschen seit Urzeiten als ein Warnsignal vor pharmakologisch aktiven Nahrungsbestandteilen (Chandrashekar et al., 2006). Dennoch sind heutzutage zahlreiche bitter schmeckende Lebensmittel, wie Bitterorangen, Chicorée, Zartbitterschokolade oder Bier beim Verbraucher sehr beliebt. Mit dem Ziel, die Schlüsselverbindungen, die den Bittergeschmack einiger Lebensmittel hervorrufen, zu identifizieren und sensorisch zu charakterisieren, wurden in den letzten Jahren durch Anwendung molekular-sensorischer Techniken z. B. Kohlenhydrat/Aminosäuremischungen (Frank et al., 2001), Karottenprodukte (Czepa et al., 2003), gerösteter Kakao (Stark et al., 2005), Kaffeegetränke (Frank et al. 2006, 2007 und 2008), Goudakäse (Toelstede und Hofmann 2008), Orangensaft (Glabasnia und Hofmann, 2008) oder Bier bzw. Hopfen (Intelmann et al. 2009<sup>a-b</sup>, Haseleu et al., 2009<sup>a-b</sup>) analysiert. In Abbildung 3 ist beispielhaft je ein Bitterstoff der untersuchten Produkte zu finden.



**Abbildung 3: Ausgewählte Bitterstoffe mit dem jeweiligen Lebensmittel in Klammern: Quinizarin (Xylose/L-Alaninmischungen) (I), Lupulone (Hopfen/Bier) (II), *cis/trans*-4,5-Dihydroxy-1-methyl-3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-indan (Kaffee) (III), Falcarindiol (Karotten) (IV), *cis*-Cyclo(L-Pro-L-Val) (Kakao) (V), Limonin (Orangensaft) (VI).**

Literaturstudien zeigen, dass der bittere Geschmack diverser Stimuli auf der Aktivierung einer Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der TAS2Rs, beruht, die von etwa 25 Genen des menschlichen Genoms kodiert werden (Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Meyerhof et al., 2010; Behrens et al., 2007). Aus Literaturstudien geht hervor, dass die Vertreter der TAS2Rs ein breites Ligandenspektrum aufweisen. Um humane TAS2Rs als Sensoren für die Bitterstoffcharakterisierung einzusetzen, wurden diverse heterogene Expressionsexperimente durchgeführt. Dabei konnte die Ligandenaktivität auf 15 der bekannten 25 TAS2Rs erfolgreich dargestellt werden (Chandrashekar et al., 2000; Bufe et al., 2002, 2005; Behrens et al., 2004; Kuhn et al., 2004; Pronin et al., 2004; Go et al., 2005; Brockhoff et al., 2007; Sainz et al., 2007; Dotson et al., 2008; Maehashi et al., 2008; Intelmann et al., 2009<sup>a</sup>; Meyerhof et al., 2010). Intelmann et al. (2009<sup>a</sup>) konnten z. B. erstmals, die für die Bittere des Bieres verantwortlichen Rezeptoren hTAS2R1, hTAS2R14 und hTAS2R40 aufzufinden. Dafür wurden die 25 bekannten TAS2R-codierten Se-

quenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion aus genomischer DNA humaner Nierenzellen gewonnen und in HEK293-Zellen exprimiert. Die Rezeptorstimulation durch verschiedene isolierte Bier- und Hopfenbitterstoffe, wie beispielsweise Humulon (I), Lupulon (II), *trans*-Isoadhumulon (III), *cis*-Isocohumulon (IV), Isoxanthohumul (V) oder Xanthohumul (VI) (vgl. Abbildung 4), wurde nach Inkubierung mit einem Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-acetoxymethylester mittels Calcium-Imaging nachgewiesen. Abhängig von der jeweiligen Struktur konnten Intelmann et al. (2009<sup>a</sup>) zeigen, dass 15 bittere Hopfen-Abkömmlinge, die sowohl die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren, *cis/trans*-iso- $\alpha$ -Säuren, Isoxanthohumul, Xanthohumul als auch 8-Prenylningenin umfassen, in unterschiedlichen Kombinationen die drei TAS2R Geschmacksrezeptoren aktivieren.



**Abbildung 4: Strukturen ausgewählter Bitterstoffe: Humulon (I), Lupulon (II), *trans*-Isoadhumulon (III), *cis*-Isocohumulon (IV), Isoxanthohumul (V), Xanthohumul (VI), Phenylthioharnstoff (VII) sowie Propylthiouracil (VIII).**

Diverse psychophysikalische und Zellstudien haben gezeigt, dass einige Bitterstoffagonisten aufgrund von genetischen Variationen in der Bevölkerung unterschiedlich wahrgenommen und teilweise gar nicht detektiert werden (Kim et al., 2003; Nelson et al., 2003; Bufe et al., 2005). Kim et al. (2003) und Bufe et al. (2005) konnten zeigen, dass Polymorphismen im TAS2R38-Gen beispielsweise zu einer unterschiedlichen Bitterwahrnehmung von Propylthio-

uracil (PROP) (VIII, Abbildung 4) und Phenylthioharnstoff (PTC) (VII, Abbildung 4) führen. Die Arbeit von Sandell und Breslin (2006) verdeutlicht, dass Bitterstoffe aus diversen Gemüsearten wie Brokkoli und Rosenkohl nur von einem Teil der Bevölkerung mit einer spezifischen Genvariation, die das Schmecken von PTC ermöglicht, wahrgenommen werden können. Variationen in Geschmacksrezeptorgenen lassen unterschiedliche Präferenzen gegenüber bestimmten Gemüsesorten aus der Familie der Kreuzblütlergewächse erwarten (Stähler und Meyerhof, 2010).

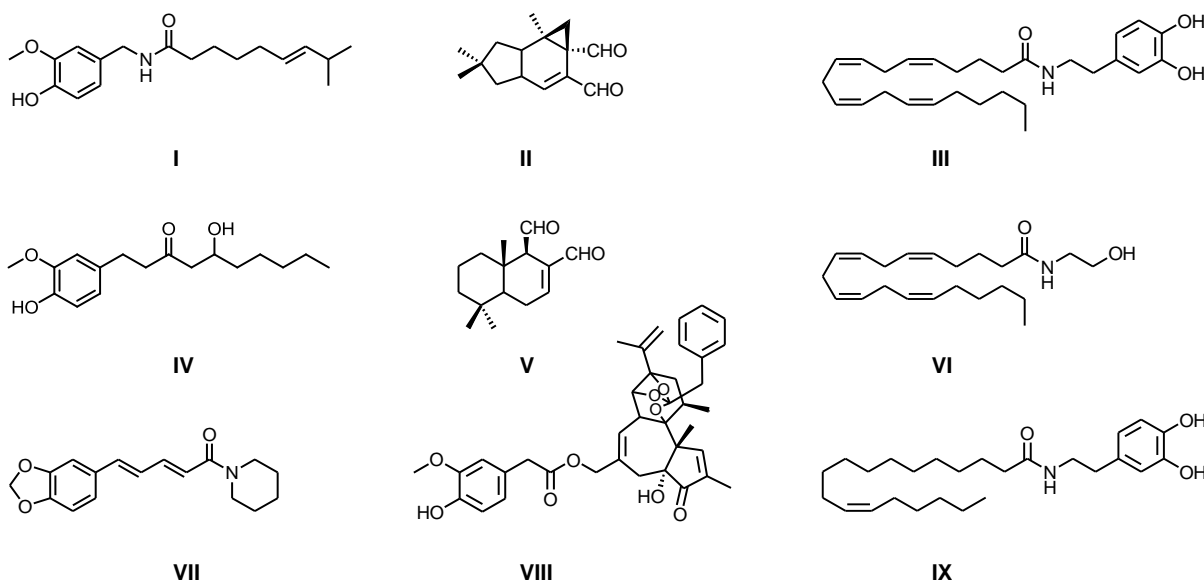
### **1.3 Somatosensorische Wahrnehmungen**

Neben den fünf bereits aufgeführten Geschmacksqualitäten tragen weitere sensorische Empfindungen, die ebenfalls durch chemische Stimuli induziert werden, zum sensorischen Gesamteindruck einzelner Genussmittel bei. Dazu zählen unter anderem scharf, tingling, kühlend, heiß, adstringierend, kokumi, prickelnd und fettig (Dunkel und Hofmann, 2011).

#### **Chemisch induzierte Scharfempfindung**

Beispielsweise ist die spezifische Wirkung einiger Scharfstoffe, wie Capsaicin aus Chilis, auf deren Bindung an den Vanilloidrezeptor TRPV1 aus der Familie der „transient receptor potential“ (TRP) zurückzuführen (Caterina et al., 1997). Der TRPV1 wurde durch Expressionsclonierung mittels cDNA-Datenbank von sensorischen Neuronen der Hinterwurzel- und Trigeminal-Ganglien von Ratten entdeckt und ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der permeabel für Natrium-, Kalium- und vor allem Calciumionen ist (Caterina et al., 1997; Janel, 2004). Caterina et al. (1997) konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die TRPV1-cDNA aus einem offenen Leseraster von 2514 Nucleotiden zusammensetzt, die ein Protein aus 838 Aminosäuren kodieren. Zudem postulierte die kalifornische Arbeitsgruppe, dass dieses Protein aus sechs Transmembrandomänen, mit einer Porenschleife zwischen der 5. und 6. Domäne besteht (Caterina et al., 1997). Während das C-terminale Ende des Polypeptides strukturell wenig auffällig ist, wird das N-terminale Ende durch prolinreiche Regionen sowie seine drei Ankyrin-Anker geprägt. Vermutlich dienen die Ankyrin-Anker einerseits der Verbindung des Membranproteins mit dem Zytoskelett und sind andererseits für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich. Indem sich die Porenschleifen von vier TRPV1-Untereinheiten zusammen lagern, entstehen zum einen homotetramere und zum anderen heteromere Membrankomplexe mit weiteren TRP-Vertretern (Caterina et al., 1997; Clapham et al., 2003; Greffrath, 2006; Venkatachalam und Montell, 2007). Die Bindungsstelle des

Scharfstoffes Capsaicin z. B. liegt zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne (Jordt und Julius, 2002). Neben Capsaicin und weiteren Vanilloiden wie Resiniferatoxin (Chou et al., 2004), fungieren auch Gingerole (Dedov et al., 2002), Isovelleral und Polygodial (Sterner und Szallasi, 1999) oder Ethanol (Trevisani et al., 2002) als chemische Agonisten des TRPV1 (vgl. Abbildung 5). Neuere Experimente von McNamara et al. (2005), Correa et al. (2010) und Okumura et al. (2010) zeigen, dass nicht nur Piperin, sondern auch seine Analoga, den TRPV1 aktivieren. Im Vergleich zu Capsaicin wirkt Piperin zwar erst in höheren Konzentrationen, ist aber bis zu zweifach potenter (McNamara et al., 2005). Weiterhin wird der Rezeptor durch Säure (Tominaga et al., 1998) und noxische Hitzereize über 42 °C (Caterina et al., 1997) aktiviert. Aufgrund dieser Kreuzsensibilität gegenüber Hitze und Scharfstoffen lassen sich die schmerzhaften und heiß-brennenden Empfindungen nach dem Genuss von scharfen Gewürzen erklären (Greffrath, 2006). Außerdem werden Endovanilloide, wie Anandamide, *N*-Arachidonoyldopamin und *N*-Oleoyldopamin, als endogene Liganden des TRPV1 angesehen (Bisogno et al., 2000; Di Marzo et al., 2001; Huang et al., 2002; Chu et al., 2003).



**Abbildung 5: Strukturformeln ausgewählter TRPV1 Agonisten: Capsaicin (I), Polygodial (V), 6-Gingerol (IV), Isovelleral (II), Piperin (VII), Resiniferatoxin (VIII) und die Endovanilloide *N*-Arachidonoyldopamin (III), Anandamid (VI) und *N*-Oleoyldopamin (IX).**

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts sind weitere wärmesensitive Rezeptoren kloniert und postuliert worden, wie der TRPV2–V4, TRPM8 und TRPA1, die jedoch nicht durch Capsaicin aktiviert werden (Greffrath, 2006; Venkatachalam und Montell, 2007). Inhaltsstoffe aus Knoblauch, Ingwer und schwarzem Senf werden oftmals, ebenso wie Zimtaldehyd oder Eugenol (Bandell et al., 2004; Calixto et al., 2005), als beißend scharf beschrieben und aktivieren den Ionenkanal TRPA1. Der TRPA1, der zuvor auch ANTKM1 (*ankyrin-like protein with transmembrane domains 1*) genannte wurde, konnte erstmals von Jaquemar et al. (1999) identifiziert werden. Dieser humane TRP-Kanal setzt sich aus 1119 Aminosäuren zusammen, hat eine molekulare Masse von 127,4 kDa und einen Isoelektrischen Punkt von 7,0. Dieses Polypeptid besitzt nicht nur einen N-Terminus, der dem zytoskelettalen Protein Ankyrin ähnlich ist, sondern auch einen C-Terminus mit sieben hydrophoben Teilbereichen mit je 20 Aminosäuren. Zudem wurde jedoch vermutet, dass lediglich sechs der hydrophoben Segmente als Transmembrandomänen mit einer Porenschleife fungieren (Jaquemar et al., 1999).

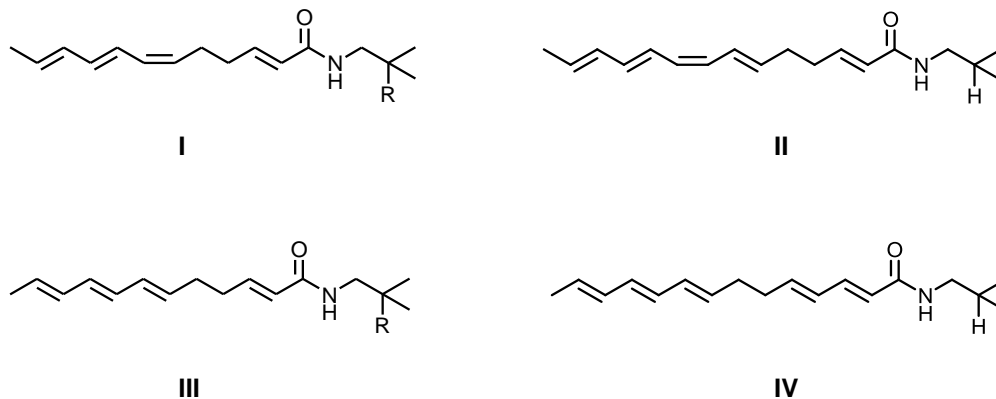
Zu den spezifischen Agonisten für den TRPA1 gehören neben beißend scharfen Einzelverbindungen wie Zimtaldehyd, Allicin, Acrolein und Allylisothiocyanat auch Senföl, Wintergrünöl, Nelkenöl und Ingwer oder Iodoacetamid und Formaldehyd (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004; Bautista et al., 2005; Calixto et al., 2005; Macpherson et al., 2007). In der Literatur wird stark diskutiert, in wieweit der Ionenkanal neben den chemischen Agonisten durch noxische Kälte unter 17 °C, die bereits als schmerzhaft beschrieben wird, aktiviert werden kann. Dennoch konnten Story et al. (2003) bei ihren Arbeiten am TRPA1 zeigen, dass sie kältesensitive sensorische Neuronen ausfindig gemacht haben.

### **Chemisch induzierte Tingling-Empfindung**

Neben den scharfen Eindrücken, die von diversen Inhaltsstoffen aus Gewürzen hervorgerufen werden, besitzen einige wenige Würzmittel auch einen „tingling“-Effekt. Besonders der Szechuanpfeffer (*Xanthoxylum piperitum*) ist bekannt dafür beim Verzehr seiner aromatischen Früchte, einen „tingelnden“-Eindruckt im Mundraum zu induzieren. Bryant und Mezine (1999) verglichen den sensorischen Eindruck, den tingelnde Alkylamide aus Szechuanpfeffer hervorrufen mit einem milden elektrischen Reiz (5 – 7 V), der mit einem Prickeln auf der Zunge beschrieben werden kann. Hervorgerufen wird dieser außergewöhnliche Sinneseindruck durch langkettige Alkylamide wie das  $\alpha$ -Sanshool und das  $\alpha$ -Hydroxysanshool (Sugai et al., 2005) (vgl. Abbildung 6). Sugai et al. (2005) beschreiben nicht nur den brennenden und tingelnden Eindruck von  $\alpha$ -Sanshool und  $\alpha$ -Hydroxysanshool, sondern zeigen auch, dass deren Analoga andere Scharf- beziehungsweise Geschmacksqualitäten aufweisen. Demnach wirken deren zwei all-*trans* Isomere betäubend und adstrin-



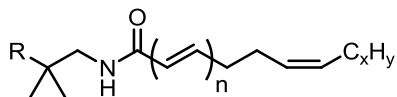
gierend, während  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Sanshool sowie  $\beta$ -Hydroxysanshool bitter schmecken.  $\gamma$ - und  $\delta$ -Sanshool wurden von deren Panel ebenfalls als scharf bewertet (Strukturen vgl. Abbildung 6).



**Abbildung 6: Alkylamide aus Szechuanpfeffer:  $\alpha$ -Sanshool (I, R=H),  $\alpha$ -Hydroxysanshool (I, R=OH),  $\gamma$ -Sanshool (II),  $\beta$ -Sanshool (III, R=H),  $\beta$ -Hydroxysanshool (III, R=OH),  $\delta$ -Sanshool (IV).**

Das tingelnde Alkylamid,  $\alpha$ -Hydroxysanshool, aktiviert neben dem TRPV1, auch den bereits beschriebenen TRPA1 (Sugai et al., 2005; Koo et al., 2007; Menozzi-Smarrito et al., 2009). Koo et al. (2007) konnten zeigen, dass im Gegensatz zu dem tingelnden  $\alpha$ -Hydroxysanshool das bittere  $\beta$ -Hydroxysanshool die TRP-Kanäle nicht aktiviert. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen von Bautista et al. (2008), dass diverse KCNK-Kanäle wie KCNK3, KCNK9 und KCNK18 durch  $\alpha$ -Hydroxysanshool aktiviert werden.

Galopin et al. (2004) untersuchten beispielsweise Scharfstoffe aus den Sanshool- und Bungeanool-Familien sowie deren synthetisierte Analoga und konnten zeigen, dass die Schärfe und der Tingling-Effekt dieser aus langkettigen Polyenamiden bestehenden Verbindungen von minimalen und optionalen Strukturmerkmalen (vgl. Abbildung 7) abhängen. Entscheidend für den sensorischen Eindruck ist neben der *trans*-konfigurierten Doppelbindung in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe die *cis*-konfigurierte Doppelbindung in  $\gamma$ -Position zu dieser Doppelbindung (Galopin et al., 2004).



Minimale Struktur: R=H, n=1, x=1

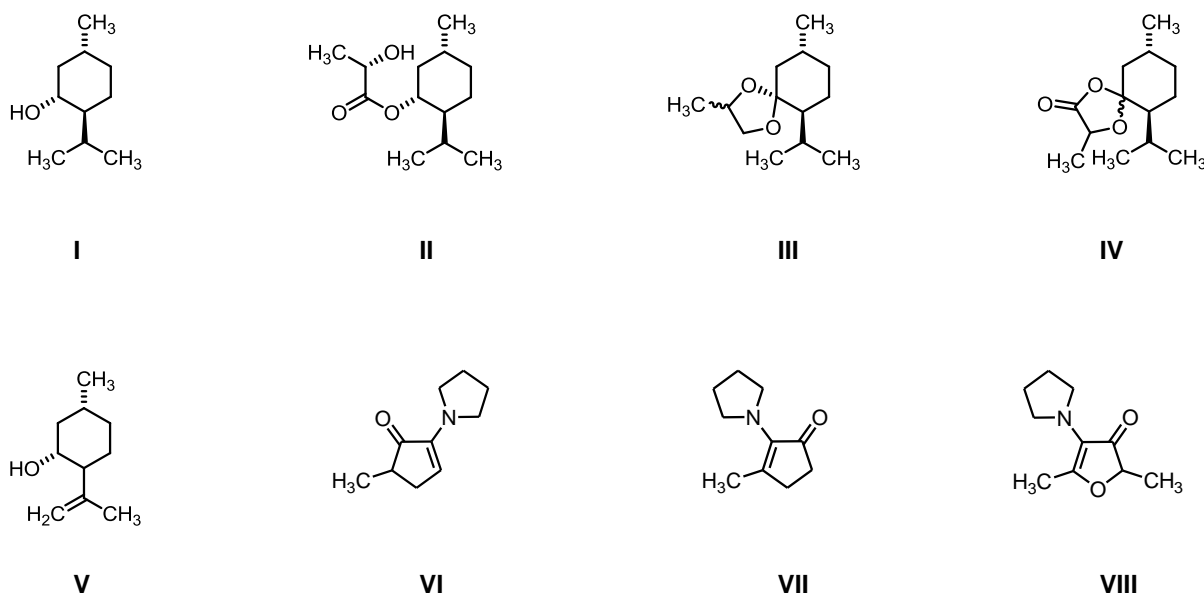
Optimale Eigenschaften: R=OH, n=2, x>2

**Abbildung 7: Minimale und optionale Strukturmerkmale für die Schärfe von Verbindungen der Sanshool- und Bungeanool-Familie nach Galopin et al. (2004).**

### Chemisch induzierte Kälteempfindung

Ein weiterer Vertreter aus der Familie der TRP-Kanäle konnte in der Vergangenheit für den physiologischen Kühleffekt verantwortlich gemacht werden. Der Verzehr diverser Mentholprodukte kann, ebenso wie niedrige Temperaturen, zur Aktivierung des Kälterezeptors TRPM8 führen. Sowohl Peier et al. (2002) als auch McKemy et al. (2002) identifizierten und charakterisierten den TRPM8 und konnten zeigen, dass es sich bei diesem Vertreter aus der Familie der TRP-Kanäle um einen nicht-selektiven Kationenkanal handelt, der eine leichte Präferenz für Calciumionen besitzt. Studien von Bandell et al. (2004) lassen zudem vermuten, dass der TRPM8 durch Temperaturen zwischen 15 – 25 °C aktiviert wird. Bei Temperaturabsenkungen unter 15 °C soll es zusätzlich zu einer Aktivierung der TRPA1- und TRPV1-Kanäle kommen (Bandell et al., 2004; Behrendt, 2004). Um molekulare Mechanismen und Voraussetzungen für die Aktivierung des TRPM8-Kälterezeptors herauszuarbeiten, wurden in den letzten Jahren zum einen synthetische Struktur/Wirkungsbeziehungen und sensorischen Analysen durchgeführt (Watson et al., 1978; Pelzer et al., 1994; Ottinger et al., 2001; Hofmann und Soldo, 2004) und zum anderen eine Reihe von Menthol-Analoga auf Rezeptoraktivierung getestet (Behrendt et al., 2004).

Neben (-)-Menthol konnte eine Vielzahl an Verbindungen mit einem physiologischen Kühleffekt entdeckt werden (Übersicht bei Leffingwell et al., 2009). Beispiele für ausgewählte artifizell gewonnene Kühlverbindungen sind: (-)-Menthylactat (II), Mentholglyceroketal (III), 6-Isopropyl-9-dimethyl-1,4-dioxa-spiro[4,5]decan-2-on (IV) und (-)-Isopulegol (V) (vgl. Abbildung 8).



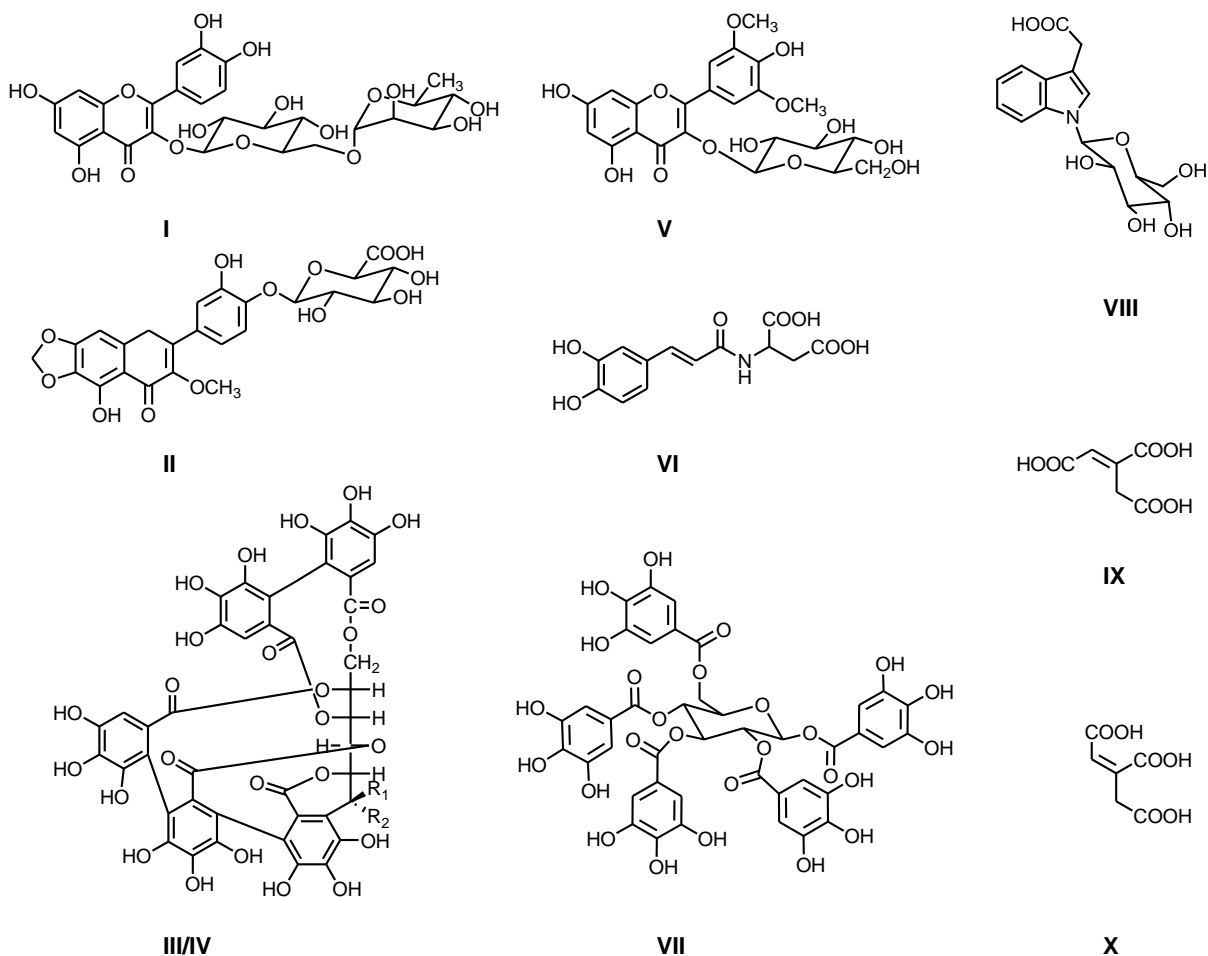
**Abbildung 8: Strukturen ausgewählter Kühlverbindungen: (-)-Menthol (I), (-)-Menthylactat (II), Mentholglyceroketal (III), 6-Isopropyl-9-dimethyl-1,4-dioxaspiro[4,5]decan-2-on (IV) und (-)-Isopulegol (V), 5-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (VI), 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (VII) und 2,5-Dimethyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3(2*H*)-furanon (VIII).**

Außerdem haben Ottinger et al. (2001) 5-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (VI), 3-Methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-2-cyclopenten-1-on (VII) und 2,5-Dimethyl-4-(1-pyrrolidinyl)-3(2*H*)-furanon (VIII) als natürliche Verbindungen mit einem Kühleffekt mit Schwellenwerten zwischen 0,04 und 0,66 mmol/l in Darr- und Röstmalz identifiziert (vgl. Abbildung 8).

### Chemisch induzierte Adstringenzempfindung

Auch die Adstringenz ist ein wichtiges Kriterium bei der sensorischen Bewertung von Lebensmitteln, wie z. B. Kaffee, Tee, Kakao, Rotwein, Whisky oder auch Johannisbeersaft. Nicht nur organische Säuren, mehrwertige Metallkationen, Mineralien, Ethanol und Aceton, sondern vor allem auch Polyphenole gehören zu den adstringierenden Verbindungen (Bajec und Pickering, 2008). Neben Vertretern aus der Tannin-Familie, wie Procyanidin, Pentagalloylglucose (Hofmann et al., 2006) oder Castalagin und Vescalagin (Glabasnia und Hofmann, 2006) konnte auch eine Vielzahl an niedermolekularen Verbindungen <500 Da wie z. B. Rutin aus schwarzem Tee (Scharbert et al., 2004), (+)-N-[3',4'-Dihydroxy-(*E*)-

cinnamoyl]-L-asparaginsäure aus geröstetem Kakao (Stark et al., 2005), (*E/Z*)-Aconitsäure und 3-Carboxymethylindol-1-*N*- $\beta$ -D-glucopyranosid aus roten Johannisbeeren (Schwarz und Hofmann, 2007), Syringetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid aus Rotwein (Hufnagel und Hofmann, 2008<sup>b</sup>) und 3',5-Dihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxy-flavon-4'-*O*- $\beta$ -D-glucuronid aus Spinat (Brock und Hofmann, 2008) als adstringierende Schlüsselverbindungen in Lebensmitteln identifiziert werden (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Hoch- und niedermolekulare adstringierende Verbindungen: Rutin (I), 3',5-Dihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxy-flavon-4'-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (II), Vesicalagin  $R_1=OH/ R_2=H$  (III), Castalagin  $R_1=H/ R_2=OH$  (IV), Syringetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid (V), (+)-*N*-[3',4'-Dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-L-asparaginsäure (VI), Pentagalloylglucose (VII), Carboxymethylindol-1-*N*- $\beta$ -D-glucopyranosid (VIII), (*E*)-Aconitsäure (IX) und (*Z*)-Aconitsäure (X).

Auch wenn zahlreiche Studien zur Identifizierung von adstringierenden Verbindungen existieren, wird deren sinnesphysiologische Wahrnehmung in der Literatur kontrovers diskutiert (Bajec und Pickering, 2008). Während Breslin et al. (1993) die Adstringenz als taktile Empfindung beschreiben, ordnen andere Forschergruppen diese somatosensorische Empfindung als weitere rezeptorbasierte Geschmacksempfindung ein (Bartoshuk, 1978; Bajec und Pickering, 2008). Besonders die Theorie der taktialen Empfindung zur Entstehung von Adstringenz stand in den letzten Jahrzehnten im Vordergrund. Dabei wird davon ausgegangen, dass adstringierende Polyphenole Speichelproteine präzipitieren und/oder komplexieren (Kallithraka und Bakker, 1998). In dem Übersichtsartikel von Bajec und Pickering (2008) wird zudem die Rolle der Mechanorezeptoren betont. Besonders adstringierende Tannine sollen Speichelproteine fällen und damit die Gleitfähigkeit des Speichels herabsetzen (Baxter et al., 1997; Gawel, 1998). Jöbstl et al. (2004) konnten ergänzend zeigen, dass Polyphenole durch ihre Interaktion mit prolinreichen Speichelproteinen zur Adstringenz-Empfindung beitragen. Außerdem wird die Interaktion von Polyphenolen oder Polyphenol/Protein-Komplexen mit humanen Epithelproteinen des Mundraumes mit der Adstringenz in Zusammenhang gebracht (Green, 1993). Schwarz und Hofmann (2008) konnten dennoch verdeutlichen, dass in der Natur adstringierende Verbindungen, wie das Quercetin-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosid], vorliegen, die die Speichelproteine weder komplexieren noch präzipitieren. Folglich unterstützen die von Schwarz und Hofmann gefundenen Erkenntnisse die Vermutung von Bartoshuk et al. (1978), dass die Adstringenz eine weitere rezeptorvermittelte Geschmacksrichtung darstellt.

### **Orosensorische CO<sub>2</sub>-Empfindung**

Neuere Untersuchungen von Chandrashekar et al. (2009) verdeutlichen, dass die prickelnde Wahrnehmung von CO<sub>2</sub> beim Konsum von kohlensäurehaltigen Getränken auf die enzymatische Umwandlung des CO<sub>2</sub> zu Kohlensäure beziehungsweise Hydrogencarbonat zurückzuführen ist, die eine Stimulierung der Säurerezeptoren (PKDs) verursacht. Die Forschergruppe um Zuker konnte anhand von genetisch modifizierten Knockout-Mäusen die Carboanhydrase IV, ein Glycosylphosphatidylinositol verankertes Membranenzym mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, als Schlüsselenzym für die Detektion ausfindig machen (Chandrashekar et al., 2009; Dunkel und Hofmann, 2010).

## Orosensorische Fettwahrnehmung

Besonders die Erforschung der Fettwahrnehmung besitzt in Zeiten einer immer übergewichtiger werdenden Bevölkerung einen immensen Stellenwert. Dennoch ist über die Wahrnehmungsphysiologie der fettigen Bestandteile der Nahrung wenig bekannt. Erste Studien zur Fettwahrnehmung bei Nagern verdeutlichen jedoch die Bedeutung freier Fettsäuren in Bezug auf die Fettwahrnehmung (Gilbertson et al., 2010). Zurzeit stehen mehrere Modelle zur Diskussion, die die Interaktionen der freien Fettsäuren mit spezifischen Ionenkanälen beziehungsweise dem Fettbindenden CD 36 (Fatty acid transporter, FAT) als mögliche Aktivierungsmechanismen für Geschmacksrezeptorzellen beschreiben (Laugerette et al., 2007). Gilbertson et al. (1997 und 2010) konnten erstmals zeigen, dass *cis*-mehrfachungesättigte Fettsäuren Geschmackszellen der Ratte durch die Inhibierung von spannungsgesteuerten K<sup>+</sup>-Kanälen (DRK) aktivieren. Dennoch haben gesättigte, monounengesättigte sowie *trans*-polyungesättigte Fettsäuren keinen Einfluss auf die DRKs (Gilbertson et al., 1997). Weiterhin wird postuliert, dass es auch beim Menschen, wie bei der Maus und der Ratte, eine rezeptorbasierte Fettwahrnehmung geben soll. Dabei steht das Rezeptor-ähnliche Protein CD36 (FAT) in der Diskussion, vor allem mit langkettigen Fettsäuren zu interagieren (Laugerette et al., 2007; Gilbertson et al., 2010). Während Fukuwatari et al. (1997) erstmals den FAT in den Geschmacksknospen der Wallpapillen der Ratten ausfindig machen konnten, gelang es Laugerette et al. (2005) die Affinität des CD 36 auf langkettige Fettsäuren, wie Stearin-, Öl- oder Linolsäure herauszustellen. Gilbertson et al. (2010) verdeutlichen in ihrem Review zur Fettwahrnehmung aber auch, dass der CD 36 wohl als Rezeptor nicht allein für die Fettwahrnehmung verantwortlich sein kann. Zudem wird in der Literatur die Rolle der Fettsäure-aktivierten GPCRs hervorgehoben (Gilbertson et al., 2010). Darüber hinaus berichten sowohl Briscoe et al. (2003) als auch Brown et al. (2003) von Vertretern der G-Protein-gekoppelten GPR 40-Familie, namentlich GPR 40, GPR 41 sowie GPR 43, die von kurz-, mittel- und langkettigen Fettsäuren aktiviert werden. Aus der GPR-Familie wurden zudem noch der GPR 84 und der GPR 120 als mögliche Fettrezeptoren beschrieben (Hirasawa et al., 2005; Wang et al., 2006; Matsumura et al., 2007; Gilbertson et al., 2010). Während die Rezeptoren GPR 41 und GPR 43 durch kurzkettige Carbonsäuren mit bis zu sieben Kohlenstoffatomen stimuliert werden, können der GPR 40 und GPR 120 durch langkettige Fettsäuren aktiviert werden (Briscoe et al., 2003; Brown et al., 2003; Hirasawa et al., 2005). Besonders die Arbeit von Cartoni et al. (2010) mit Knockout-Mäusen verdeutlicht, dass die Präferenz für langkettige Fettsäuren von dem GPR 40 und dem GPR 120 vermittelt wird. Insbesondere der GPR 120 ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung geraten, da er nicht nur im Geschmacksepithel von Ratten, sondern auch in dem des Menschen identifiziert wurde (Matsumura et al., 2007; Galindo et al., 2011).

## Chemisch induzierte Kokumi-Empfindung

Bei der Verkostung von Einzelsubstanzen ebenso wie bei diversen Lebensmittelextrakten z. B. in komplexen Modellsystemen, wird oftmals neben dem Umami-Geschmack noch der Kokumi-Effekt, eine Facette der Mundfülle, beschrieben. Bereits 1990 konnten Ueda et al. den geschmacksmodulierenden Effekt, den ein aus Knoblauch gewonnener Wasserextrakt in Suppe hatte, entschlüsseln. Zahlreiche schwefelhaltige Verbindungen, wie Alliin (I, Abbildung 10), (+)-S-Methyl-L-cysteinsulfoxid (II, Abbildung 10) oder  $\gamma$ -L-Glutamyl-S-allyl-L-cystein konnten bei dieser Studie chromatographisch auffindig gemacht werden (Ueda et al, 1990). Aus Wasser- und Ethanol-extrakten von Zwiebeln (*Allium cepa* L.) konnten darüber hinaus *trans*-(+)-S-Propenyl-L-cysteinsulfoxid sowie sein  $\gamma$ -Glutamylpeptid mit Kokumi-Aktivitäten isoliert und charakterisiert werden (Ueda et al, 1994). Die Forschergruppe um Ueda konnte insbesondere zeigen, dass der Kokumi-Flavour von Glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, Abbildung 10) in Gegenwart von Mononatriumglutamat und Inosin-Monophosphat beeinflusst wird. Während Glutathion in Evian gelöst selbst nicht schmeckt, fällt eine Brühe mit Glutathionzusatz durch seine starke Kokumi-Note auf (Ueda et al., 1997).

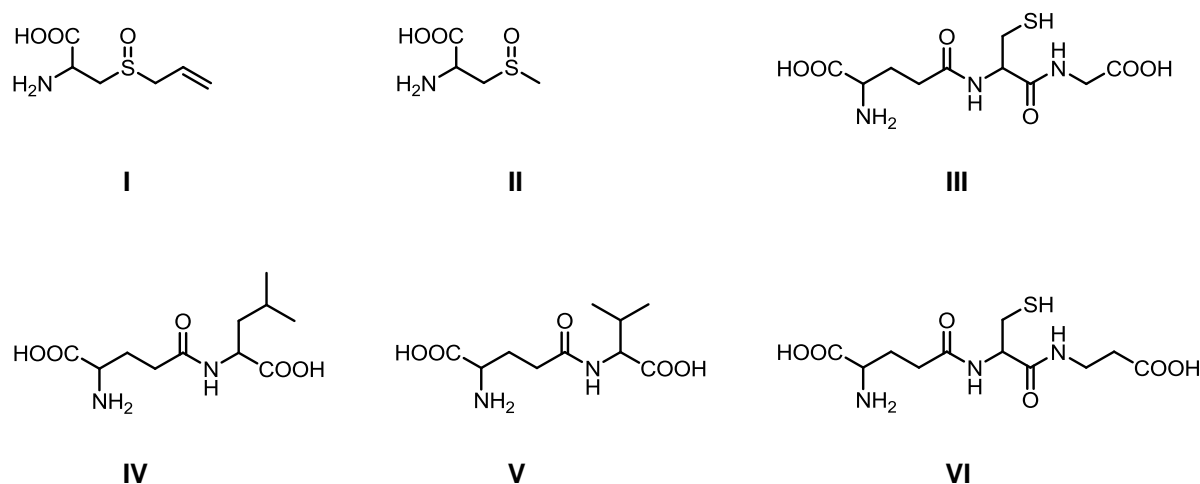


Abbildung 10: Strukturen ausgewählter Kokumi-Verbindungen: Alliin (I), (+)-S-Methyl-L-cysteinsulfoxid (II), Glutathion (III),  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-leucin (IV),  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-valin (V) sowie  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinyl- $\beta$ -alanin (VI).

Aus einem wässrigen Extrakt getrockneter Bohnen (*Phaseolus vulgaris* L.) gelang es Dunkel und Hofmann (2007) kokumi-aktive  $\gamma$ -Glutamylpeptide, wie das  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-leucin, das  $\gamma$ -

L-Glutamyl-L-valin oder das  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinyl- $\beta$ -alanin, zu identifizieren (Abbildung 10). Toelstede et al. (2009) konnten zudem diverse  $\gamma$ -Glutamylpeptide als Kokumi-Schlüsselverbindungen in 44 Wochen gereiftem Goudakäse lokalisieren.

Erste Versuche, den Kokumi-Effekt auf Rezeptorebene zu entschlüsseln, unternahmen jüngst Ohsu et al. (2010). Sie diskutieren in ihrer Arbeit die Rolle des calciumsensitiven Rezeptors (CaSR), einem Protein aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der beim Menschen aus 1078 Aminosäuren besteht. Die Arbeitsgruppe um Ohsu konnte dabei zeigen, dass bekannte Kokumi-Verbindungen wie z. B. die  $\gamma$ -Glutamylpeptide den CaSR aktivieren (Ohsu et al., 2010).

## **1.4 Methoden zur sensorischen Charakterisierung von Geschmacksstoffen**

Ziel der modernen Geschmacksstoff-Forschung ist zum einen, sensorisch aktive Verbindungen zu identifizieren und zu charakterisieren und zum anderen, deren Detektion auf Rezeptorebene aufzudecken. Die Lokalisierung und Identifizierung nicht-flüchtiger Schlüsselgeschmacksstoffe auf molekularer Ebene aus komplex zusammengesetzten Matrices erfolgt dabei mit Hilfe eines aktivitätsorientierten Screening-Verfahrens, das auf einer Kombination diverser instrumentell-analytischer Techniken mit humansensorischen Analysen beruht.

Voraussetzung für diese aktivitätsorientierte Vorgehensweise ist dabei die vollständige Isolierung der nicht-flüchtigen sensorisch aktiven Verbindungen mit gängigen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol, Pentan oder Ethylacetat. Zur Grobfractionierung und um erste Einblicke in die Polarität oder Molekülgröße sensorisch aktiver Verbindungen in den Lebensmittelextrakten zu bekommen, werden diverse Techniken wie z. B. aktivitätsorientierte Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität, säulenchromatographische Vortrennungen an RP-, HILIC- oder Kieselgelphasen, Gelpermeationschromatographie oder Ultrafiltration angewandt (Frank et al., 2001; Stark und Hofmann, 2005; Schwarz und Hofmann, 2007; Dunkel und Hofmann, 2007; Brock und Hofmann, 2008; Haseleu et al., 2009<sup>a</sup>). Durch Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) (Frank et al., 2001) auf die so gewonnenen Gesamt- oder Teilextrakte, konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl von geschmacksaktiven Verbindungen lokalisiert und identifiziert werden. Die GVA ermöglicht somit die Selektion der geschmacklich relevanten unter den vielen sensorisch inaktiven Verbindungen aus komplex zusammengesetzten Fraktionen, sodass sich anschließende Identifizierungsexperimente auf



Schlüsselgeschmacksstoffe beschränken. Neben adstringierenden Substanzen aus schwarzem Tee (Scharbert et al., 2004), geröstetem Kakao (Stark und Hofmann, 2005), roten Johannisbeeren (Schwarz und Hofmann, 2007), Rotwein (Hufnagel und Hofmann, 2008<sup>b</sup>) und Spinat (Brock und Hofmann, 2008), konnten weiterhin Bitterstoffe aus Kohlenhydrat/Aminosäuremischungen (Frank et al., 2001), aus Karotten (Czepa und Hofmann, 2003) und aus Hopfen (Haseleu et al., 2009<sup>a-b</sup>) charakterisiert werden. Auch eine mit (-)-Menthol vergleichbare kühlende Verbindungen aus Darr- und Röstmalz (Ottinger et al., 2001) und der Geschmacksverstärker Alapyridain in Maillardansätzen und Rinderbrühe (Ottinger et al., 2003<sup>a-b</sup>) konnten mit diesem sensorischen Assay detektiert werden. Mit dem Einsatz der von Ottinger et al. (2003<sup>a</sup>) entwickelten, modifizierten vergleichenden Geschmacksverdünnungsanalyse (vGVA) gelang es Dunkel und Hofmann (2007) ergänzend kokumi-aktive Verbindungen aus einem wässrigen Extrakt getrockneter Bohnen aufzuklären.

Die Identifizierung mittels LC/MS- und NMR-Experimenten und, wenn nötig, durch Synthesen, ermöglicht jedoch noch keine konkrete Aussage über die Geschmackswirksamkeit der sensorisch aktiven Moleküle. Um Geschmacksstoffe in ihrem Beitrag zum gesamten Geschmacksprofil eines Lebensmittels einzuordnen und auf Basis ihrer Konzentration zu gewichten, führten Warmke et al. (1996) den so genannten Geschmacksaktivitätswert (GAW) ein. Der GAW ist definiert als der Quotient aus der Konzentration eines Geschmacksstoffes im Lebensmittel und der Geschmacksschwelle und impliziert einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Geschmacksintensität. Dennoch vernachlässigt dieser Faktor, dass die Geschmacksstoffe mit weiteren Inhaltsstoffen aus der Lebensmittelmatrix interagieren können. Synergistische oder maskierende Wirkungen werden durch den GAW nicht mit berücksichtigt, sodass Scharbert und Hofmann (2005) den GAW durch den Begriff Dose-over-Threshold-Faktor (DoT-Faktor) ersetzen. Der DoT-Faktor ist ebenfalls definiert als der Quotient aus der Konzentration eines Stimulans im jeweiligen Lebensmittel und seinem Schwellenwert. Alle Stimulantien mit DoT-Faktoren über 1 tragen definitionsgemäß zum Geschmack bei. Liegt der Wert unter 1, kann der Geschmacksstoff dennoch zu synergistischen oder verstärkenden Effekten führen. Folglich bildet der DoT-Faktor ein Verhältnis zwischen der Konzentration und dem Schwellenwert, trifft aber noch keine konkrete Aussage über den Beitrag eines Stimulans zum Geschmacksprofil eines Lebensmittels. Durch die Aufzeichnung so genannter Dose-Response-Kurven von Stark et al. (2006), Glabasnia und Hofmann (2006) oder Brock und Hofmann (2008) konnte untermauert werden, dass die Konzentration einzelner Geschmacksstoffe wie z. B. das bittere Theobromin und (-)-Epicatechin oder das adstringierende Roburin C und 3',5,7-Trihydroxy-3,6-dimethoxy-flavon-4'-O- $\beta$ -D-glucuronid nicht mit dessen Intensität linear korreliert.

Voraussetzung für die Kalkulation des DoT-Faktors ist die vorherige Konzentrationsbestimmung im Nahrungsmittel. Für die quantitative Analytik von Naturstoffen sowie von Geschmacksstoffen ist die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) in Verbindung mit der Massenspektroskopie heutzutage die Methode der Wahl. Bei dieser Vorgehensweise werden mit stabilen Isotopen markierte Verbindungen ( $[^2\text{H}]$ ,  $[^{13}\text{C}]$ ), die die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie die jeweiligen Analyten besitzen, als interne Standards verwendet (Rychlik und Asam, 2009). Verluste bei der Isolierung und Aufarbeitung der Lebensmittelmatrix sind bei diesen Analysenverfahren kompensiert, da markierte Standards den gleichen Aufarbeitungsverlusten unterliegen wie die Analyten. Mit dieser Vorgehensweise haben Stark und Hofmann (2006) beispielsweise rauhadstringierende *N*-Phenylpropanoyl-L-aminosäuren über deren deuterierte Analoga wie das (-)-*N*-[3',4'-Dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-[2,5,6- $^2\text{H}$ ]-3-hydroxy-L-tyrosine in geröstetem Kaffee- und Kakao-pulver quantifiziert.

Mit Hilfe der Konzentrationsbestimmung einzelner Schlüsselinhaltsstoffe können weiterhin Rekombinations- und Omissionsexperimente durchgeführt werden, die die additiven und inhibitorischen Effekte von Einzelsubstanzen oder auch gesamter Verbindungsgruppen verdeutlichen. Besonders das Rekombinationsexperiment, bei dem alle identifizierten Geschmacksstoffe in natürlichen Konzentrationen gegen das authentische Lebensmittel in einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse gegeneinander evaluiert werden, zeigt, ob alle sensorisch aktiven Substanzen erfasst wurden. Bei Omissionsexperimenten werden Einzelsubstanzen oder komplette Stoffklassen weggelassen, um so deren Einfluss auf das gesamte Geschmacksprofil bewerten zu können. Sowohl Scharbert und Hofmann (2005) als auch Hufnagel und Hofmann (2008<sup>a</sup>) konnten diese Sensoriktechnik nutzen, um vertiefende Einblicke in die geschmacklichen Modulatoren von schwarzem Tee und Rotwein zu geben.

## 1.5 Allgemeines zum Spargel

Der Spargel, *Asparagus officinalis* L., gehört innerhalb der Klasse der Monokotyledonen zur Familie der Asparagaceae und zählt zu den Stängel- und Sprossgemüsen. Attribute wie das „königliche Gemüse“ oder „essbares Elfenbein“ verdeutlichen die Sonderstellung, die Spargel in Deutschland unter den Gemüsesorten einnimmt (Köster, 2011). Allein für Deutschland im Jahr 2009 gibt die FAO eine Erntemenge von 98.200 t Spargel an, während weltweit 7.289.903 t Spargel geerntet wurden (FAO, 2009). Bedeutende Anbauregionen in

Deutschland sind sowohl in Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen und Hessen als auch in Brandenburg, Bayern, Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz und Sachsen-Anhalt zu finden.

Bereits 500 v. Chr. wurde der Spargel vermutlich in seiner Wildform als Heilpflanze in China, Persien und Griechenland genutzt. Wie auch heute noch aus der botanischen Bezeichnung „*officinalis*“ abzuleiten ist, wurde Spargel in der Vergangenheit besonders in Medizingärten und Klöstern als Heilmittel gezogen (Englert et al., 1985). Obwohl Theophrast um 300 v. Chr. Spargel erstmals als Speisepflanze in der Literatur aufführt, wird er erst seit dem 16. Jahrhundert in Mitteleuropa in seiner kultivierten Form, dem *Asparagus officinalis* L., angebaut (Englert et al., 1985; Franke, 1997).

Der Spargel ist eine mehrjährige Pflanze, die größtenteils unterirdisch wächst. Während sich aus den Endknospen des Rhizoms oberirdisch Bäumchenartige Sprosse entwickeln, ist das sympodial senkrecht nach oben wachsende Rhizom mit seinen Wurzeln und Knospenanlagen unter der Erde zu finden. Verzehrt werden die unverholzten und nicht verdickten Sprossachsen des Stängelgemüses (Franke, 1997).

Je nach Witterung beginnt die Spargelernte in Deutschland zirka Ende April und dauert traditionell bis Johanni, dem 24. Juni. Vor allem um den Ertrag des nächsten Jahres gewährleisten zu können, muss eine ausreichende Regenerationszeit eingehalten werden, sodass die Spargelernte Ende Juni abgebrochen wird (Hartmann, 2001). Je nach Anbaumethode wird entweder Bleich- oder Grünspargel gewonnen. Bleichspargel kann kultiviert werden, indem sandiger Boden zu ca. 30 cm hohen Dämmen aufgeschüttet wird, sodass die Stangen während ihrer Wachstumsperiode und vor dem Ernten nicht ans Tageslicht gelangen. Erst wenn die Spargelspitzen die Erdoberfläche erreichen und anheben, werden sie gestochen. Violetter Spargel, dessen Stangen gleichmäßig weiß sind, wird dagegen gestochen, wenn die Spargelspitzen die Erdoberfläche schon leicht durchbrochen haben. Die Spitzen nehmen bei Lichteinwirkung, aufgrund von Anthocyanbildung, eine blaurötliche Färbung an (Franke, 1997), dabei ist die Rotfärbung abhängig von den Spargelsorten unterschiedlich ausgeprägt (Brückner et al., 2008). Grüner Spargel wird, anders als weißer und violetter Spargel, nicht unter der Erde in Wällen, sondern oberirdisch kultiviert. Durch die sofortige Lichteinwirkung kann der Spargel den grünen Farbstoff Chlorophyll ausbilden. Der geringere Arbeitsaufwand während des Anbaus begründet die weltweit größere Verbreitung des Grünspargels. Anders als beim Bleichspargel, muss der Grünspargel dem Gegendruck des Bodens nur geringfügig standhalten, sodass dessen Stangen einen geringeren Durchmesser aufweisen. Zum Verzehr werden die grünen Stangen auch lediglich im unteren Drittel geschält. Für alle drei Vermarktungsarten ist ein Sand- oder Lehmboden mit pH-Werten über 5,5 Voraussetzung für eine ertragreiche Ernte (Hartmann, 2001).

Den Spargelbauern in Deutschland steht durch verschiedene Züchtungen in der Vergangenheit ein weites Spektrum an Spargelsorten zur Verfügung. Bekannte Bleichspargelsorten, die in Deutschland zum Einsatz kommen, sind neben „Epos“, „Huches Alpha“, „Ravel“, „Gijnlim“, „Grolim“ und „Backlim“ auch die älteren Sorten „Huches Leistungsauslese“ sowie „Schwetzi-ger Meisterschuss“. Für die Grünspargelernte werden dagegen vermehrt die Sorten „Huches Schneewittchen“, „Gijnlim“, „Spaganiva“, „Schneekopf“ und „Steiniva“ gepflanzt (Hartmann, 2001). Die Sortenwahl ist jeweils abhängig von den Standortbedingungen sowie dem jeweiligen Ertragspotential (Brückner et al., 2008).

Insbesondere das Auftreten eines Bitterfehlgeschmacks wird im Zusammenhang mit Bleichspargel diskutiert (Schwarzbach, 2004). Besonders „Grolim“-Spargel soll dazu neigen, sporadisch auftretende Bitterstangen zu generieren. Aber auch über die Sorten „Gjinlim“ und „Thielim“ wird in der Literatur berichtet bei niedrigen Temperaturen einen Bitterfehlgeschmack aufzuweisen (Brückner et al., 2008).

Roher Spargel besitzt einen hohen Wassergehalt von 93,1 g/100 g und enthält neben zahlreichen Kohlenhydraten, Proteinen und Ballaststoffen verschiedene essentielle und nicht essentielle Aminosäuren, Vitamine, Fruchtsäuren, Carotinoide und Sterole (Souci et al., 2008). Über phenolische Spargelinhaltsstoffe, wie das Rutin, gibt es in der Literatur ebenfalls zahlreiche Arbeiten (Herrmann, 1977). Neben *Asparagus officinalis* L. sind diverse *Asparagus*-Arten insbesondere für ihre Saponine und deren biologische Wirkung bekannt. Aus den Wurzeln des indischen Shatavari (*Asparagus racemosus*) konnten Hayes et al. (2008) beispielsweise, neben den literaturbekannten Steroidsaponinen Shatavarin I, IV, V, Immunosid und Schidigerasaponin D5, fünf weitere Saponine (Shatavarin VI–X) isolieren. Auch in *Asparagus africanus*, *Asparagus gonocladus* oder *Asparagus filicinus* Buch.-Ham konnten zahlreiche Saponine identifiziert werden (Mandloi und Saint, 1981; Debella et al., 1999; Zhou et al., 2007).

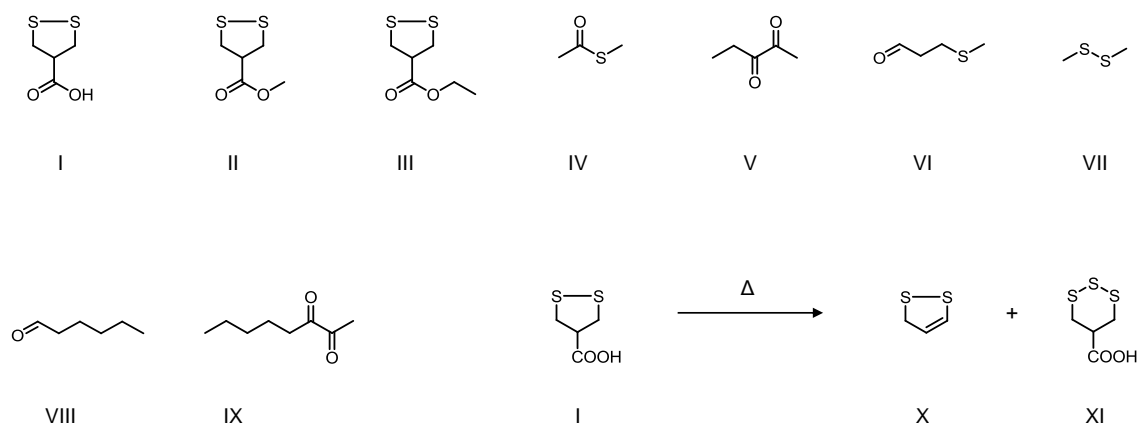
### **1.5.1 Sensorisch aktive Substanzen in Spargel**

Nicht nur für sein attraktives ansprechendes Aroma, sondern auch für seinen unverwechselbaren Geschmack wird der frische und vor allem auch gekochte weiße Spargel geschätzt. Während der rohe weiße Spargel eine süß-bittere Note und ein eher zurückhaltendes Aroma aufweist, werden besonders die aroma-aktiven Substanzen während des Kochens freigesetzt beziehungsweise gebildet (Ulrich et al., 2001).

Erste Arbeiten zu den flüchtigen Verbindungen in gekochtem Spargel führten Freytag und Ney (1967 und 1972) durch. Die Autoren konnten zeigen, dass das kohlarig riechende Dimethylsulfid, welches beim Kochen von Spargel aus S-Methylmethionin generiert wird, einen essentiellen Beitrag zum Spargelaroma darstellt. Basierend auf diesen Erkenntnissen korrelierten Scherb et al. (2009) mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse die Gehalte an S-Methylmethionin, das bereits 1954 von Challenger und Hayward in Spargel identifiziert worden war, in rohem und gekochtem Spargel mit der Dimethyldisulfidbildung während des Erhitzungsprozesses. Die Arbeitsgruppe um Schieberle ermittelte dabei Gehalte von 53 bis 109 mg/kg an S-Methylmethionin in Spargelstangen und höhere Gehalte von 94 bis 252 mg/kg für die Spargelspitzen. Um die Bildung von Dimethylsulfid zu S-Methylmethionin zu untersuchen, wurden in dieser Studie zudem die Konzentrationen von Dimethylsulfid in gekochten Spargelstangen (4,1 – 6,2 mg/kg) und Spitzen (9,4 – 21 mg/kg) evaluiert. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Aminosäure der einzige Prekursor für Dimethylsulfid in Bleichspargel ist, können Umsetzungsraten von 16 und 26 mol% berechnet werden. Weiterhin konnte bei deren Experimenten beobachtet werden, dass die Umsetzungsraten in den Spargelspitzen höher waren, als in den Stangen (Scherb et al., 2009).

Tressl et al. (1977<sup>a-b</sup>) konnten darüber hinaus, nach Anreicherung der Aromastoffe durch Flüssig/Flüssigextraktion bei unterschiedlichen pH-Werten und Säulenchromatographie über Kieselgel, 122 weitere flüchtige Verbindungen aus rohem sowie gekochtem Spargel mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie identifizieren. Hervorgehoben wurde von dieser Arbeitsgruppe die Bedeutung der schwefelhaltigen flüchtigen Verbindungen, darunter vor allem die 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure (Asparagussäure) sowie deren Methyl- und Ethylester. In deren Studie wurde zudem die thermische Fragmentierung der Asparagussäure sowohl zu 1,2-Dithiacyclopenten als auch zu 1,2,3-Trithian-5-carbonsäure, die den angenehmen Geruch von gekochtem Spargel tragen sollen, postuliert (Abbildung 11).

Um eine Objektivierung des Gesamtaromas von gekochtem Spargel bemühten sich erstmals Ulrich et al. (2001) durch die Kopplung der Gaschromatographie und des menschlichen Geruchssinnes als Detektor (GC/Olfaktometrie). Hiermit stellten sie den hohen Geruchsbeitrag von Methylthioacetat, 2,3-Pentandion, Hexanal, 2,3-Octandion, Methional und unterschiedlich substituierte Alkylpyrazine neben Dimethyldisulfid heraus. Diese Arbeitsgruppe widerlegte außerdem Tressls Theorie, dass Asparagussäure oder seine Ester zum Aroma des gekochten Spargels beitragen sollen (Ulrich et al., 2001).



**Abbildung 11: Ausgewählte Aromastoffe des Spargels: Asparagussäure (I), Asparagussäuremethylester (II), Asparagussäureethylester (III), Methylthioacetat (IV), Pentandion (V), Methional (VI), Dimethylsulfid (VII), Hexanal (VIII) und 2,3-Octandion (IX) sowie die thermische Fragmentierung von Asparagussäure (I) während des Kochens von Spargel zu 1,2-Dithiacyclopenten (X) und 1,2,3-Trithian-5-carbonsäure (XI) nach Tressl et al. (1977).**

Obwohl über die Aromastoffe einzelne Arbeiten in der Literatur vorliegen, ist über geschmacksaktive Substanzen in *Asparagus officinalis* L. dagegen bislang wenig publiziert worden. Dennoch stellt besonders auch der Geschmack neben der Beschaffenheit von Textur, Farbe und Aroma einen wichtigen Qualitätsparameter für den erfolgreichen Verkauf von Spargel dar. Als wertgebende Geschmacksrichtungen werden immer wieder der süße und bittere Geschmack von Spargel bewertet. Insbesondere der bittere Geschmack und das sporadische, unerwünschte Auftreten von bitteren weißen Spargelstangen werden in der Fachpresse immer wieder erwähnt und führen zu erheblichen Verbraucherreklamationen (Brueckner et al., 2010). Saponine werden dabei als Schlüsselsubstanzen bei der sporadisch auftretenden Bitterkeit von Spargel diskutiert (Brueckner et al., 2010).

In der Literatur sind neben den Asparagussaponinen einige weitere bittere Saponine in anderen Lebensmitteln beschrieben (Hostettmann und Marston, 1995), wie z. B. das aus Alfalfa (*Medicago sativa*) isolierte Tridesmosid der 16 $\alpha$ -Hydroxymedicagensäure oder die partiell acetylierten Sojasaponin Acetyl-sojasaponin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> (Kitagawa et al., 1988; Oleszek et al., 1992). Auch die Samenschalen der aus Südamerika stammenden Pflanze Quinoa (*Chenopodium quinoa*) beinhalten bittere Saponine, wie die 3,28-O-glycosylierten Hederagenine, die vor dem Verzehr durch Kochen als Kleie entfernt werden müssen (Mizui et al.,

1988; Koziol, 1991; Kuljanabagavad und Wink, 2009). Zudem identifizierten Sato et al. (1973) das Furostanolsaponin TFI als Schlüssel-Bitterstoff von Tomatensamen (*Lycopersicon esculentum* Miller).

### 1.5.2 Spargelsaponine und deren sensorische Relevanz

Literaturstudien zeigen, dass bis dato diverse steroidale Saponine aus unterschiedlichen Spargelstücken isoliert und mittels MS- und NMR-Techniken identifiziert wurden, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Während die monodesmosidischen Spargelsaponine lediglich am C(3) des Aglykons glykosidisch an eine Zuckerkette aus bis zu drei aneinander verknüpften Monosacchariden gebunden sind (Spirostanoltyp), besitzen die bidesmosidischen Saponine, deren Spirostanbindung zwischen dem E- und F-Ring geöffnet vorliegt, eine weitere glykosidisch verknüpfte Zuckerseitenkette am C(26) (Furostanol-Typ). Bekannte Beispiele hierfür sind zum einen das von Shao et al. (1997) identifizierte bidesmosidische Saponin Protodioscin oder zum anderen das von Shimoyamada et al. (1990) isolierte Monodesmosid AS-1 (Abbildung 12).

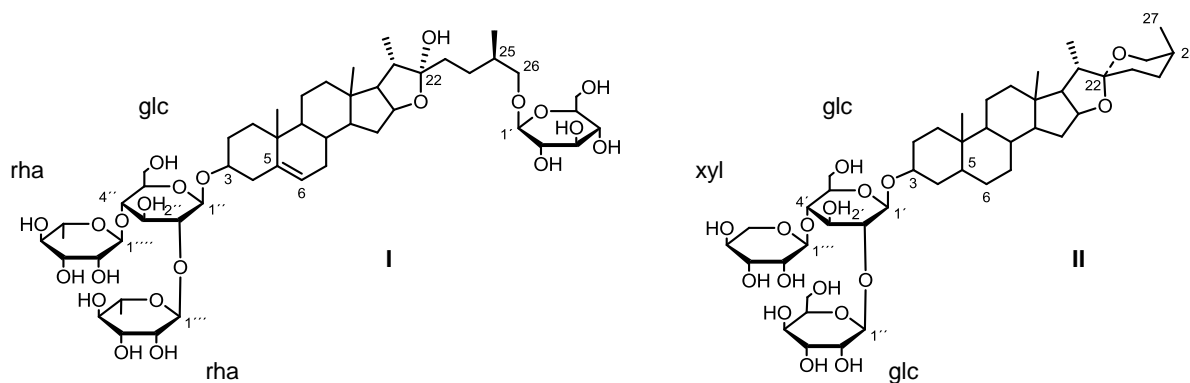
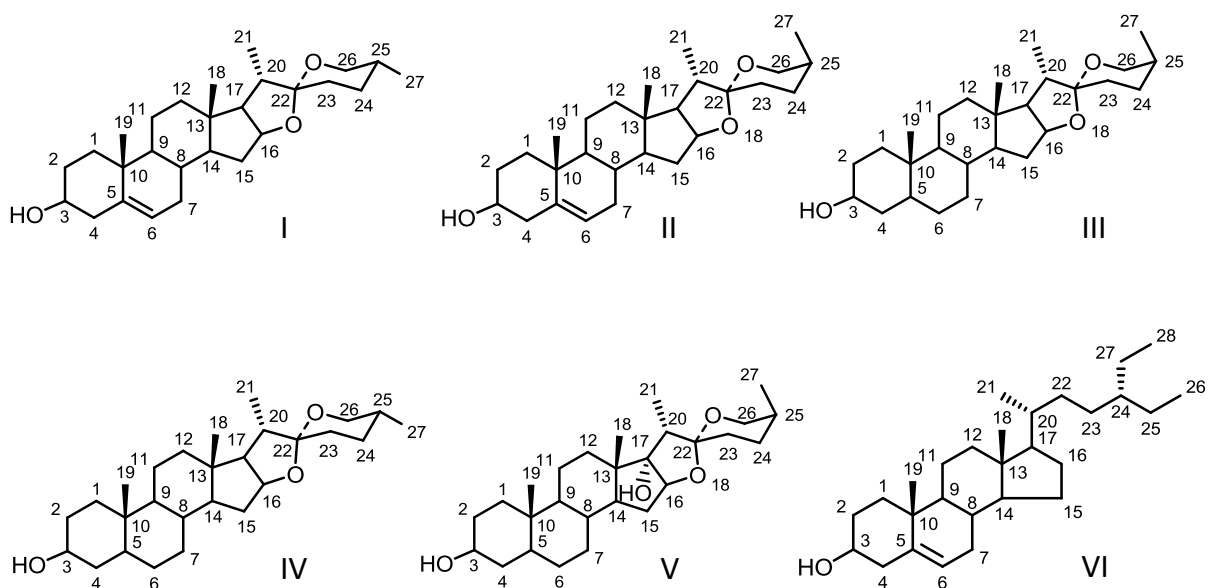


Abbildung 12: Strukturen von Protodioscin (I) und AS-1 (II).

Der Kohlenhydratanteil besteht im Allgemeinen bei den Asparagussaponinen ebenso aus Monosacchariden wie auch aus linearen und verzweigten Oligosacchariden. Im Spargel sind vor allem Glucose, Rhamnose und Xylose nachzuweisen, die sowohl in  $\alpha$ - als auch in  $\beta$ -glycosidischer Form vorliegen. Besonders häufig wurden Saponine aus Spargel isoliert, bei

denen eine 2,4-Di-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranose (Chalcotriose) an Position C(3) an das Aglycon verknüpft ist, wie es z. B. bei Protodioscin (I, Abbildung 12) zu erkennen ist.

Nach saurer Hydrolyse der Spargelsaponine konnte in der Vergangenheit auf verschiedene Aglyca, die auch als Genine oder häufiger als Sapogenine tituliert werden, zurückgeschlossen werden. In Abbildung 13 sind einige der bereits aus *Asparagus officinalis* L. isolierten Sapogenine aufgeführt.



**Abbildung 13: Ausgewählte Sapogenine aus *Asparagus officinalis* L..**

Allein die große Strukturvielfalt der möglichen Aglyca deutet auf die molekulare Vielfalt der Spargelsaponine hin. So ergeben sich Variationen nicht nur aufgrund von Unterschieden in einzelnen Stereozentren, Doppelbindungen und Hydroxylierungsmustern, sondern auch bedingt durch zahlreiche funktionelle Gruppen (Suhr, 2001). Während Diosgenin (I, Abbildung 13) und Yamogenin (II, Abbildung 13) beispielsweise eine Doppelbindung zwischen Position C(5) und C(6) aufweisen, stellen Sarsapogenin (III, Abbildung 13) und Smilagenin (IV, Abbildung 13) die möglichen Dihydroanaloga dar (Hostettmann und Marston, 1995; Agrawal et al., 1997; Wang et al., 2011). Bis dato sind jedoch lediglich Diosgenin, Yamogenin und Sarsapogenin in *Asparagus officinalis* L. ausfindig gemacht worden. Smilagenin konnte dagegen



aus diversen anderen Pflanzen isoliert werden (Hostettmann und Marston, 1995; Agrawal et al., 1997). Auch die Hydroxylierung der Position C(17) des Aglycons V (Abbildung 13), wie es bei Sarsapogenin M oder Sarsapogenin N gefunden wurde (Huang und Kong, 2006) oder der offenkettige F-Ring des  $\beta$ -Sitosterols (VI, Abbildung 13), sind weitere Beispiele für den Variantenreichtum der Genine (Huang et al., 2008) (Abbildung 13).

Unterschieden werden die Spirostangrundgerüste der Spargelsaponine und -sapogenine oftmals auch aufgrund ihrer beiden C(25) Epimere. In *Asparagus* konnte beispielsweise neben der stabileren (25*R*)-Konformation des Diosgenins ((25*R*)-Spirost-5-en-3 $\beta$ -ol) (I, Abbildung 13) auch die (25*S*)-Form, das Yamogenin ((25*S*)-Spirost-5-en-3 $\beta$ -ol) (II, Abbildung 13), identifiziert werden (Hostettmann und Marston, 1995). Das Verhältnis der Isomeren hängt nicht nur von den verschiedenen morphologischen Teilstücken, sondern auch vom Entwicklungsstadium der Pflanze ab (Kawano et al., 1975; Hostettmann und Marston, 1995). Hostettmann und Marston (1995) stellten darüber hinaus die Vermutung auf, dass generell viele in der Literatur beschriebene Saponine eigentlich Mischungen der 25*R*/25*S*-Epimere darstellen. Zumal seit Jahrzehnten bekannt ist, dass die chromatographische Separierung von Saponinen mit gleichen Zuckerresten, die sich nur an Position C(25) unterscheiden, extrem schwierig ist (Miyahara et al., 1983).

Sato und Sakamura gelang es nicht nur, das Furostanolsaponin 5 $\alpha$ -Furustan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-[O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosid] 26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid als Bitterprinzip von Tomatensamen (*Lycopersicum esculentum* Miller), sondern auch zwei Jahre später, zusammen mit Kawano und Sakaii, Officinalisin-I (Ia, Abbildung 14) und Officinalisin-II (Ib, Abbildung 14) als unangenehme Bitterstoffe aus den Speicherwurzeln von *Asparagus officinalis* L. zu identifizieren (Sato und Sakamura, 1973; Kawano et al., 1975). Trotz fehlender NMR-Daten veröffentlichten Kawano et al. (1975) die Strukturen von Officinalisin-I und Officinalisin-II auf Basis diverser Hydrolysen und Responsefaktorenvergleiche. Nach Partialhydrolyse gelang es dieser Forschergruppe beispielsweise neben Sarsapogenin auch Sophorose (2-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl- $\alpha$ -D-glucose) als die primären Bausteine von Officinalisin-I zu identifizieren. Zudem erbrachte die Hydrolyse des permethylierten Officinalisins-II die drei Zucker 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose, 2,3,4-Tri-O-methyl-D-xylopyranose und 3,6-di-O-Methyl-D-glucopyranose. Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerten Kawano et al. (1975), dass bei Officinalisin-II eine zusätzliche Xylose an Position C(4') der Sophorose des Officinalisin-I vorliegen sollte.

Aus den unteren Spargelteilstücken, den so genannten „bottom cuts“, konnten von Kawano et al. (1977) zwei weitere bidesmosidische Furostanolsaponine als ASP-I (IIa, Abbildung 14) und ASP-II (IIb, Abbildung 14) isoliert werden, die beide als 25*S*-Spirostanole charakterisiert

wurden. Während ASP-I neben der C(26)-gebundenen Glucose über eine C(3)-verknüpfte Chalcotriose-Einheit verfügt, besitzt ASP-II eine Rhamnoseeinheit weniger. Kawano et al. (1977) beschrieben jedoch lediglich für das 25S-Furost-5-en-3- $\beta$ -22,26-triol-3-O-(2,4-di-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (ASP-I) einen bitteren Geschmack. Auffällig ist bei diesen Studien jedoch die Strukturaufklärung, fehlende NMR-Daten lassen eine genaue Zuordnung der Konstitution und Konfiguration der Saponine nur erahnen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Shao et. al. (1997) erstmals das Isomer des ASP-I, das sich lediglich in der Position der Hydroxy-gruppe an C(25) unterscheidet, als 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2){ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R)-22 $\alpha$ -furost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol (ASC-II, Protodioscin) (IVa, Abbildung 14) beschrieben. Neben dem 22-Hydroxy-Furostanolglucosid Protodioscin (ASC-II) konnten Shao et al. (1997) zudem dessen 22-Alkoxy-Derivat, Methylprotodioscin (IIIa, Abbildung 14), aus Spargelsamen isolieren und die Struktur mittels NMR-Datensätzen absichern.

Weiterhin konnten Kawano et al. (1975) zeigen, dass durch eine Naringinase-Behandlung mit Naringin- $\alpha$ -1,2-rhamnosidase- und  $\beta$ -Glucosidaseaktivität der bitter schmeckende Spargelsaft, welcher aus den „bottom cuts“ gewonnen wurde, entbittert werden kann. Diese Erkenntnis macht die Bedeutung der Saponine mit einer 3-O- $\beta$ -Chalcotriosid- beziehungsweise einer 4-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranose-Einheit für die Bittere des Spargels wahrscheinlich.

Lazurévskii et al. (1976) führen darüber hinaus die neun Saponine Asparagosid A–I wie z. B. das Sarsapogeninglykosid (Asparagosid A) oder (25S)-5 $\beta$ -Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (Asparagosid B) in ihrer auf Russisch verfassten Publikation auf. Ein Großteil der von Lazurévskii et al. (1976) postulierten Asparasaponine weisen  $\beta$ -glycosidisch verknüpfte Glucopyranosen auf. Lediglich das Asparagosid F wurde mit einer zusätzlichen Xylopyranose charakterisiert. Eine genaue Strukturidentifizierung mit chromatographischen oder spektroskopischen Daten ist der Arbeit jedoch nicht zu entnehmen.

Auch aus den Früchten des Spargels isolierten Pant et al. (1988) ein monodesmosidisches Saponin (VIIb, Abbildung 14) bestehend aus Sarsapogenin, zwei Glucose- und einem Rhamnoseteilmolekül. Ausführliche Studien zu Saponinen und Sapogeninen aus den Rhizomen des *Asparagus officinalis* L. führten Huang und Kong sowie Huang et al. (2006 und 2008) durch, bei denen sie neun monodesmosidische und ein bidesmosidisches Saponin, sowie sieben Genine strukturell charakterisierten. Huang und Kong (2006) konnte neben Sarsapogenin M (VIIIb, Abbildung 14) auch Sarsapogenin N (VIIIa, Abbildung 14) aus einem Ethanolextrakt (80%) der getrockneten Spargelwurzeln gewinnen. Abweichend zu den bis dato identifizierten Saponinen wiesen die Aglyca von Sarsapogenin N und M im HMBC-

Spektrum jeweils Kopplungen einer zusätzlichen Hydroxygruppe zu den Kohlenstoffatomen an Position C(17) auf. Neben diesen zwei (25S)-5 $\beta$ -Spirostan-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ -diol-Derivaten sind in der Publikation von Huang und Kong (2006) fünf weitere bekannte Saponine beschrieben: (25S)-5 $\beta$ -Spirostan-3 $\beta$ -ol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,2)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1,4)]- $\beta$ -D-glucopyranosid, (25S)-5 $\beta$ -Spirostan-3 $\beta$ -ol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,2)- $\beta$ -D-glucopyranosid, (25S)-5 $\beta$ -Spirostan-3 $\beta$ -ol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1,2)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1,4)]- $\beta$ -D-glucopyranosid, Sitosterol- $\beta$ -D-glucosid und (25S)-26-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-5 $\beta$ -furost-20(22)-ene-3 $\beta$ ,26-diol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,2)- $\beta$ -D-glucopyranosid (Va, Abbildung 14). Huang et al. (2008) konnten darüber hinaus Sarsapogenin O, bei dem eine  $\beta$ -D-6-O-Acetylglucopyranose an das Aglycon gebunden vorliegt, aus den Wurzeln von *Asparagus officinalis* L. isolieren und spektroskopisch bestätigen.

Aus den getrocknete Stängeln von *Asparagus officinalis* L. wurde zudem Yamogenin II mit einem weiteren Aglycon, das bis dato in der Literatur nicht anderweitig aufgeführt ist, beschrieben (Sun et al., 2010). Bei dem Aglycon handelt es sich um ein Yamogenin-Derivat, bei dem an Position C(21) anstelle der Methyl-, eine Hydroxymethylgruppe zu finden ist. Außerdem fanden Shimoyamada et al. (1990 und 1996) zwei monodesmosidische Spirostanolsaponine in den Spargelsamen, die die Abkürzungen AS-1 (VIIa, Abbildung 14) und AS-2-I (VIa, Abbildung 14) erhalten haben.

Ein besonderes Augenmerk vieler Forschergruppen lag in der Vergangenheit auf den fungiziden Eigenschaften der monodesmosidischen Saponine (Hostettmann et al., 1995; Suhr, 2001). Shimoyamada et al. (1996) untersuchten erstmals die fungiziden Eigenschaften der Spargelsaponine AS-1 und AS-2-I mittels Agar-Diffusionstest. Beispielsweise bestimmten sie mit einem MIC-Wert von 10  $\mu$ g/ml eine wesentlich höhere Aktivität für AS-2-I gegen *Candida albicans*, als für AS-1. Weiterhin konnten die fungiziden Eigenschaften der beiden Verbindungen gegen *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton floccosum* ermittelt werden.

Es wird generell vermutet, dass die biologisch inaktiven bidesmosidischen Saponine als Kohlenhydrattransportformen in Pflanzen fungieren, die durch enzymatische Hydrolyse in die aktivere monodesmosidische Form, die oft gegen Pilzbefall bei Verletzung der Pflanze schützt, umgewandelt werden können (Hostettmann et al., 1995; Suhr, 2001).

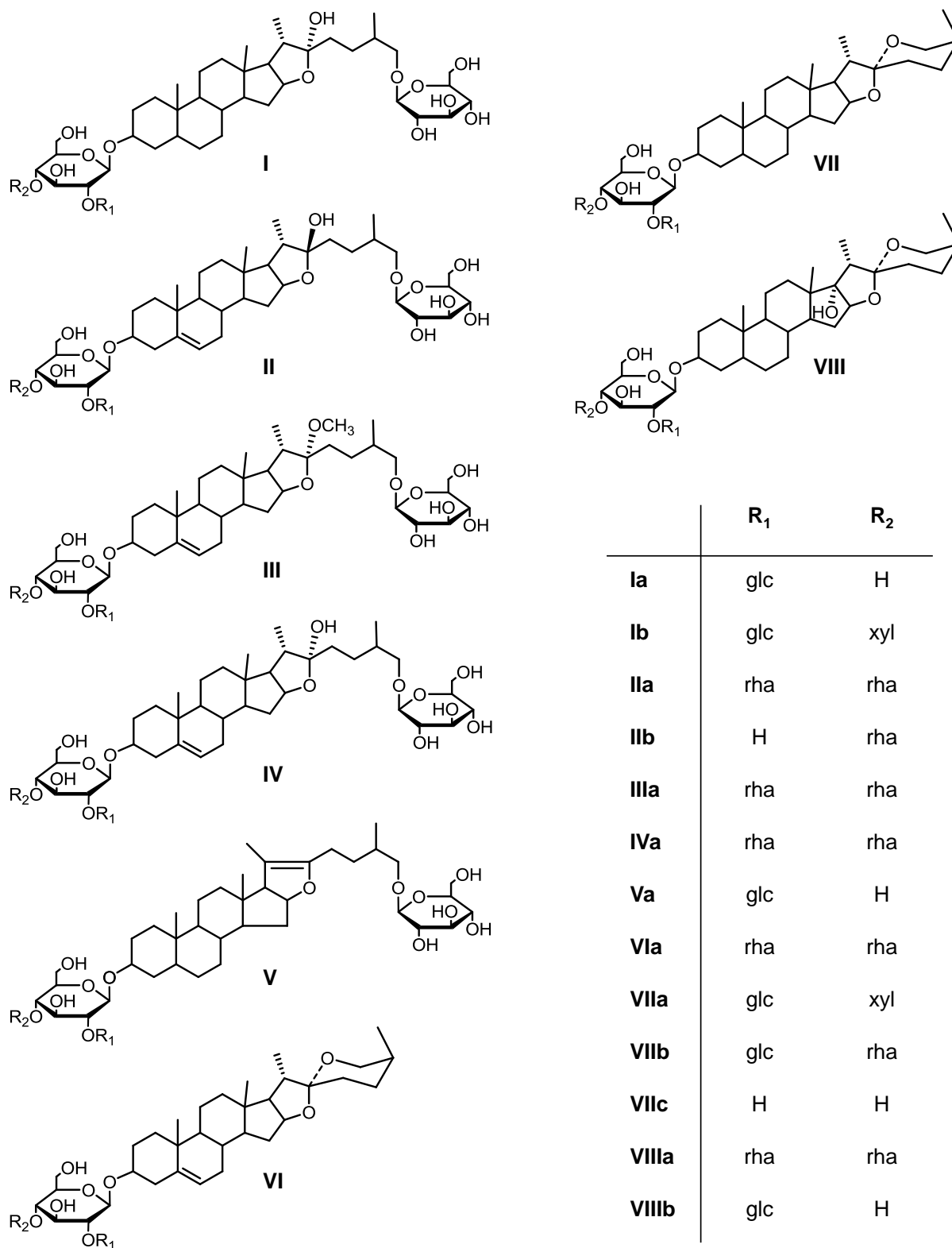


Abbildung 14: Ausgewählte Saponine aus *Asparagus officinalis* L..

Systematische Korrelationen zwischen dem Umweltstress auf die chemischen und sensorischen Eigenschaften des Spargels sowie dessen Saponinhaushalt wurden jedoch bis dato nicht durchgeführt.

In der Vergangenheit wurden zudem die zahlreichen pharmakologischen und biologischen Eigenschaften der Spargelsaponine herausgestellt. Das Asparagussaponin Protodioscin wurde beispielsweise erfolgreich auf antivirale (Ikeda et al., 2000), cytostatische, spermizide (Adimoelja et al., 2000) und neoplastische (Hu et al., 1999) Aktivitäten getestet. Protodioscin soll zudem auch cytotoxisch gegen humane Leukämie HL-60 Zellen (Chin et al., 2002) wirken.

Die Spargelsaponine wurden bisher hauptsächlich entweder densitometrisch (Gyulemetova et al., 1982; Wang et al., 2003) oder nach saurer Hydrolyse mittels aufwendiger GC/MS-Analysen (Tosun et al., 1991) quantifiziert. Schwarzbach et al. (2006) entwickelten eine Quantifizierungsmethode zur Bestimmung von sechs Spargelsaponinen, bei der nach einer Saponinanreicherung mittels SPE der methanolische Spargelextrakt mittels HPTLC analysiert wurde. Bei dieser Studie konnten die Forscher zeigen, dass „Grolim“-Spargel mit 0,527 g/kg höhere Saponingehalte als beispielsweise der weniger bitter schmeckende „Backlim“-Spargel aufweist. Darüber hinaus konnten sie feststellen, dass eingefrorener Spargel nach 28 Wochen einen Verlust an Saponinen aufweist. Mit Hilfe der Quantifizierungsmethode von Schwarzbach et al. (2006) analysierten Brueckner et al. (2010) diverse Spargelproben und konnten erstmals zeigen, dass die Bitterkeit von Bleichspargel mit dem Saponingehalt korreliert. Lediglich für das Protodioscin ist in der Literatur eine analytische Methode beschrieben, mit der sich das mengenmäßig dominierende Saponin in Spargel mittels LC/MS und externer Standardkalibrierung quantifizieren lässt (Wang et al., 2003). In dieser Studie wurden Protodioscingehalte von 0,24 mg/100 g in den Spargelspitzen und 25 mg/100 g in den Endstücken des frischen Spargels gefunden. Die quantitative Bestimmung weiterer im Spargel bekannter Saponine ist mittels LC/MS-Verfahren noch nicht beschrieben worden. Darüber hinaus postulierten Wang et al. (2003) anhand von LC-MS/MS-Spektren neben Protodioscin das Vorliegen von ASP-II und des aus *Asparagus cochinchinensis* bekannten (3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,25S)-26-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-22-hydroxyfurostan-3-yl-6-O-(6-desoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosid in weißen Spargelstangen. Methylprotodioscin wurde von dieser Arbeitsgruppe jedoch explizit nicht gefunden.

Trotz jahrzehntelanger Forschung auf dem Gebiet der nicht-flüchtigen Inhaltsstoffe des Spargels (*Asparagus officinalis* L.), liegen bislang jedoch keine systematischen Studien über die wertgebenden Geschmacksstoffe auf molekularer Ebene vor, die zum einen den ange-

nehmen spargeltypischen buttrigen Geschmackseindruck und zum anderen die unerwünschte Bittere hervorrufen.

## 1.6 Allgemeines zum Pfeffer

Das schon sehr lange gehandelte und weltweit beliebte Würzmittel Pfeffer ist die Frucht des immergrünen Kletterstrauches *Piper nigrum* L. aus der Familie der Piperaceae. Die globale wirtschaftliche Bedeutung des scharfen Gewürzes spiegelt sich vor allem in der hohen Produktionsmenge wieder, allein im Jahr 2008 wurden weltweit 414.849 t Pfeffer geerntet (FAO, 2008). Zudem war Pfeffer 2008 in Deutschland, mit einem Import von insgesamt 28.163 t und einem Wertanteil von 28% an den Gewürzimporten (ohne Gewürzmischungen), das wichtigste gehandelte Würzmittel (Fachverband der Gewürzindustrie, 2009).

*Piper nigrum* L. stammt ursprünglich aus Malabar, einer Region an der Südwestküste Indiens (Tainter und Grenis, 2001) und wird seit Jahrtausenden in tropischen Regionen kultiviert. Heutzutage wird Pfeffer an Stützpflanzen wie z. B. Kokospalmen vor allem in Indien, Indonesien, Sarawak und Brasilien angebaut (Hänsel et al., 1994). Während die Wildform der Pfefferpflanze eine mehrjährige Kletterpflanze ist, die mit Hilfe ihrer sprossbürtigen Haftwurzeln bis zu 15 m hoch empor wachsen kann, wird die Kulturpflanze an Pfählen oder Drahtgerüsten lediglich bis zu 3–5 m hochgezogen, sodass diese sich eher buschartig 1–1,5 m in die Breite entwickelt (Franke, 1997; Weiss, 2002). Als Gewürz werden die beerenartigen, in Rispen angeordneten Steinfrüchte, die erst ab dem dritten Jahr aus den befruchteten weißen Blüten entstehen, bei der Zubereitung von zahlreichen Speisen ganz oder gemahlen verwendet. Die scharfen Früchte bestehen neben dem Endokarp und der Samenschale aus einem außen hornigen, innen mehligem Perisperm sowie einem schwach ausgebildeten Endosperm, in das der winzige Embryo eingebettet liegt (Franke, 1997). Je nach Erntezeitpunkt und Verarbeitung werden die Steinfrüchte in vier unterschiedlichen Handelsformen konsumiert.

Bei schwarzem Pfeffer handelt es sich um die kurz vor der Vollreife bei beginnender Rötung geernteten Früchte, die in der Sonne oder am Feuer getrocknet werden. Während des langsamen Trocknungsprozesses werden die Inhaltsstoffe der Schale durch Polyphenoloxidasen oxidiert, sodass der zuvor grüne, zu schwarzem Pfeffer fermentiert wird. Werden dagegen die Steinfrüchte aus voll ausgereiften, roten Früchten gewonnen und deren äußeres Mesokarp mechanisch entfernt, wird der weiße Pfeffer erhalten. Grüner Pfeffer besteht aus den unreifen, ungeschälten Steinfrüchten, deren Braunfärbung durch Einlegen in Salzlake oder

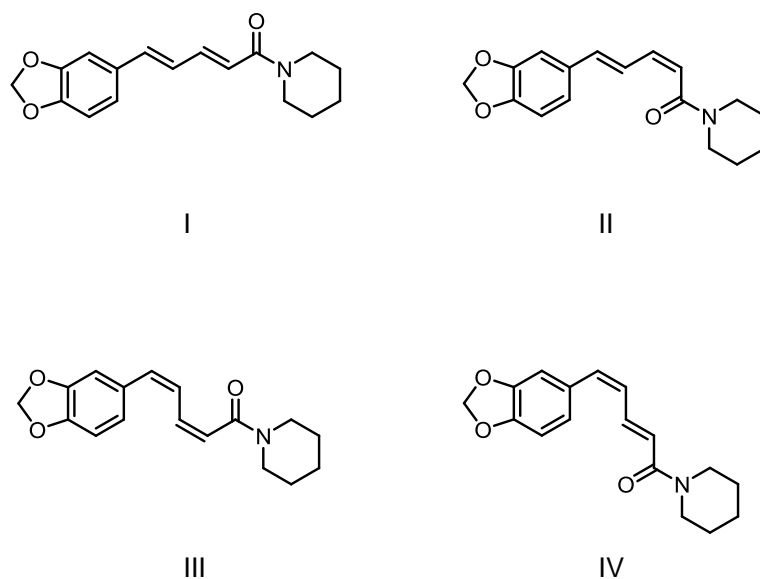
Gefriertrocknung unterbunden wird (Franke, 1997). Die ausgereiften roten Früchte werden dagegen sehr selten getrocknet gehandelt (Rimbach et al., 2010). Der rote Pfeffer darf jedoch nicht mit den rosa Beeren (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) aus Südamerika, die sich in Pfeffergewürzmischungen befinden, verwechselt werden. Auch der tingelnd wirkende Szechuanpfeffer (*Zanthoxylum piperitum*) aus China und Japan wird oftmals versehentlich in der Trivalliteratur der Piperaceae-Familie zugeordnet (Katzner, 2011). Für Gewürzzwecke werden neben *Piper nigrum* L. dennoch verwandte, ebenfalls scharf wirkende Pfefferarten aus der Familie der Piperaceae eingesetzt. Neben den Beeren von Langem Pfeffer (*Piper longum* L.) aus Indien, *Piper retrofractum* VAHL. aus Indonesien und Kubebenpfeffer (*Piper cubeba* L.) werden auch die Blätter des Betelpfeffers (*Piper betle* L.) gehandelt (Franke, 1997; Weiss, 2002). Zu den kulinarischen Eigenschaften von Vertretern der *Piper* spp. kommt noch deren medizinische und pharmakologische Bedeutung (Scott et al., 2008).

### 1.6.1 Pfefferinhaltsstoffe und deren sensorische Relevanz

Besonders der Geruch des schwarzen und weißen Pfeffers lag in der Vergangenheit im Fokus der Forschung. Jagella und Grosch (1999<sup>a-c</sup>) untersuchten beispielsweise die Aromastoffzusammensetzung von *Piper nigrum* L. und konnten mit Hilfe von Omissionsexperimenten zeigen, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen, Myrcen,  $\alpha$ -Phellandren, Limonen, Linalool, Methylpropanal, 2- und 3-Methylbutanal, Buttersäure sowie 3-Methylbuttersäure die wertgebenden flüchtigen Verbindungen des schwarzen Pfeffers darstellen. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe um Grosch (1999<sup>b</sup>) den Verlust an  $\alpha$ -Pinen, Limonen und 3-Methylbutanal als Grund für das gegenüber frisch gemahlene Pfefferkörnern weniger pfeffer-, zitrus- und auch terpenartige Aroma von Pfefferpulver ausfindig machen. Auch die Verbindungen, die die Fehlgerüche von schwarzem und weißem Pfeffer verursachen, konnten in den letzten Jahren entschlüsselt werden. Während der modrige Off-Flavour des schwarzen Pfeffers auf 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin und 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin zurückzuführen ist (Jagella, 1999<sup>b</sup>), haben Steinhaus und Schieberle (2005<sup>a-b</sup>) gezeigt, dass die fäkalisch riechenden Verbindungen 3-Methylindol und 4-Methylphenol sowie das phenolische 3-Methylphenol und die käsig wirkende Buttersäure in erster Linie für das Fehlgeruch von weißem Pfeffer verantwortlich sind.

Die weltweite Beliebtheit von schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum* L.) basiert neben seinem unvergleichbaren Aroma vor allem auf seiner maßgeblichen Schärfe. Laut Literatur verdankt das global am meisten gehandelte Gewürz sein scharfes Prinzip vor allem dem alkaloidähnlichen Piperin, einem Amid aus der (2*E*,4*E*)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2,4-pentadiensäure (Piperinsäure) und Piperidin (Freist, 1991; Srinivasan et al., 2007), das von Oersted (1820),

Rügheimer (1882) und Ladenburg (1884) isoliert und strukturell charakterisiert wurde (I, Abbildung 15) (Freist, 1991). Die Biosynthese von Piperin in *Piper nigrum* L. ist erstmals von Geisler und Gross (1990) näher untersucht worden. Sie verläuft über die Reaktion von Piperoyl-Coenzym A mit Piperidin, katalysiert durch die Piperoyltransferase. Diese Acetyltransferase überträgt hauptsächlich Piperidin auf das Piperoyl-CoA, wenngleich auch eine Affinität gegenüber Pyrrolidin als Substrat beobachtet wurde (Geisler und Gross, 1990). Indem Grewe et al. (1970) die drei möglichen Isomere des Piperins Chavicin (*cis-cis*), Isochavicin (*trans-cis*) und Isopiperin (*cis-trans*) synthetisierten, konnten sie die besondere Bedeutung der *trans-trans*-konfigurierten Doppelbindung in Bezug auf die Scharfintensität herausstellen, denn lediglich Piperin weist als einziges Stereoisomer eine hohe Schärfe auf (Abbildung 15). Ferner wird vermutet, dass während der Lagerung von Piperin eine langsame Umwandlung in dessen Isomere stattfindet, die zu einem Schärfeverlust führt (Hashimoto et al., 1996; Tainter und Grenis, 2001).



**Abbildung 15: Strukturen von Piperin (2E,4E) (I), Isopiperin (2Z,4E) (II), Chavicin (2Z,4Z) (III) und Isochavicin (2E,4Z) (IV) nach Friedman et al. (2008).**

Phytochemische Forschungen an *Piper nigrum* L. haben neben Piperin, Alkaloiden, Chalkonen, Flavonen, Flavanonen, Lignanen, Norlignanen, Steroiden, Terpenen, Pyrrolen und Piperoleminen vor allem zur Identifizierung zahlreicher weiterer Amide geführt (Parmar et al., 1997), von denen lediglich die Säureamide scharf wirken und zur Schärfe des Pfeffers beitragen sollen (Labruyère, 1966; Traxler, 1971; Freist, 1991; Srinivasan et al., 2007). Abhän-



gig von ihrer Struktur können diese Säureamide in zwei Gruppen unterteilt werden, von denen ausgewählte Beispiele in Abbildung 16 dargestellt sind. Auf der einen Seite wurden zahlreiche Piperinanloga, denen eine Piperonaleinheit gemeinsam ist, wie Piperlonguminin (IIa), Piperilin (IIb), Piperettin (IVc), oder Retrofractamid A (Va) und auf der anderen Seite einige langkettige, ungesättigte Fettsäureamide, wie z. B. (2E,4E,12Z)-N-Isobutyloctadeca-2,4,12-trienamid (Xa) aus Pfeffer isoliert (Spring et al., 1950; Grewe et al., 1970; Park et al. 2002; Wei et al., 2004; Lin et al., 2007) (Abbildung 16). Beiden Grundstrukturen gemein ist die Amidbindung mit den Basen Pyrrolidin, Piperidin und Isobutylamin, die aus Lysin, Ornithin und Valin biosynthetisiert werden (Hänsel et al., 1994; Teuscher et al., 1997).

Zu den piperin-analogen Verbindungen, die insgesamt bis zu 5% im Pfeffer enthalten sein können (Gerhardt, 1994; Roth und Kormann, 1996), zählen unter anderem Piperettin (IVc), das Heptatriensäureanalog des Piperins (IIc) (Spring und Stark, 1950; Wei et al., 2004) oder Piperanin (IIIc), bei dem das Kohlenstoffgerüst der Piperinsäure partiell hydriert ist (Traxler, 1971; Wei et al., 2004). Auch die Pyrrolidin- (Piperilin (IIb)) oder Isobutylaminderivate des Piperins (Piperlonguminin (IIa)) oder des Piperettins (Piperolein (IVb)) wurden in schwarzem Pfeffer gefunden (Grewe et al., 1970; Wei et al., 2004; Lin et al., 2007). Retrofractamid A (Va), 1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin (Vb) und Dehydropiperonalin (Vc) mit den Basen Isobutylamin, Pyrrolidin und Piperidin konnten zudem in der Vergangenheit in Pfeffer ebenso ausfindig gemacht werden wie deren Di- oder Tetrahydroanaloge Piperonalin (IVc) und Piperolein B (VIIc) (Park et al., 2002; Wei et al., 2004; Lee et al., 2006). Weiterhin konnten Nakatani und Inatani (1981) aus dem Dichlormethanextrakt von *Piper nigrum* L. neben dem bekannten Piperacid (VIIIa) auch noch das im Kohlenstoffgerüst um zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen verlängerte Guaneensin (IXa) finden.

Der umfangreichen Arbeit von Wei et al. (2004) ist, neben den Spektrensätzen von 32 bekannten Pfefferamiden, auch der Datensatz des erstmals beschriebenen Piperinanalogons 1-[1-Oxo-3(3,4-methylenedioxy-5-methoxyphenyl)-2Z-propenyl]piperidin (Ib) zu entnehmen. Tsukamoto et al. (2002<sup>a-b</sup>) isolierten darüber hinaus fünf Bisalkaloide, die Dipiperamide A–E, aus weißem Pfeffer. Dipiperamid E ist beispielhaft in Abbildung 16 unter XIXc zu finden. Weitere Piperinanloga mit der charakteristischen Benzodioxolteilstruktur sind zum einen dem Übersichtsartikel von Parmar et al. (1997) und zum anderem Dyer und Palmer (2004) zu entnehmen.

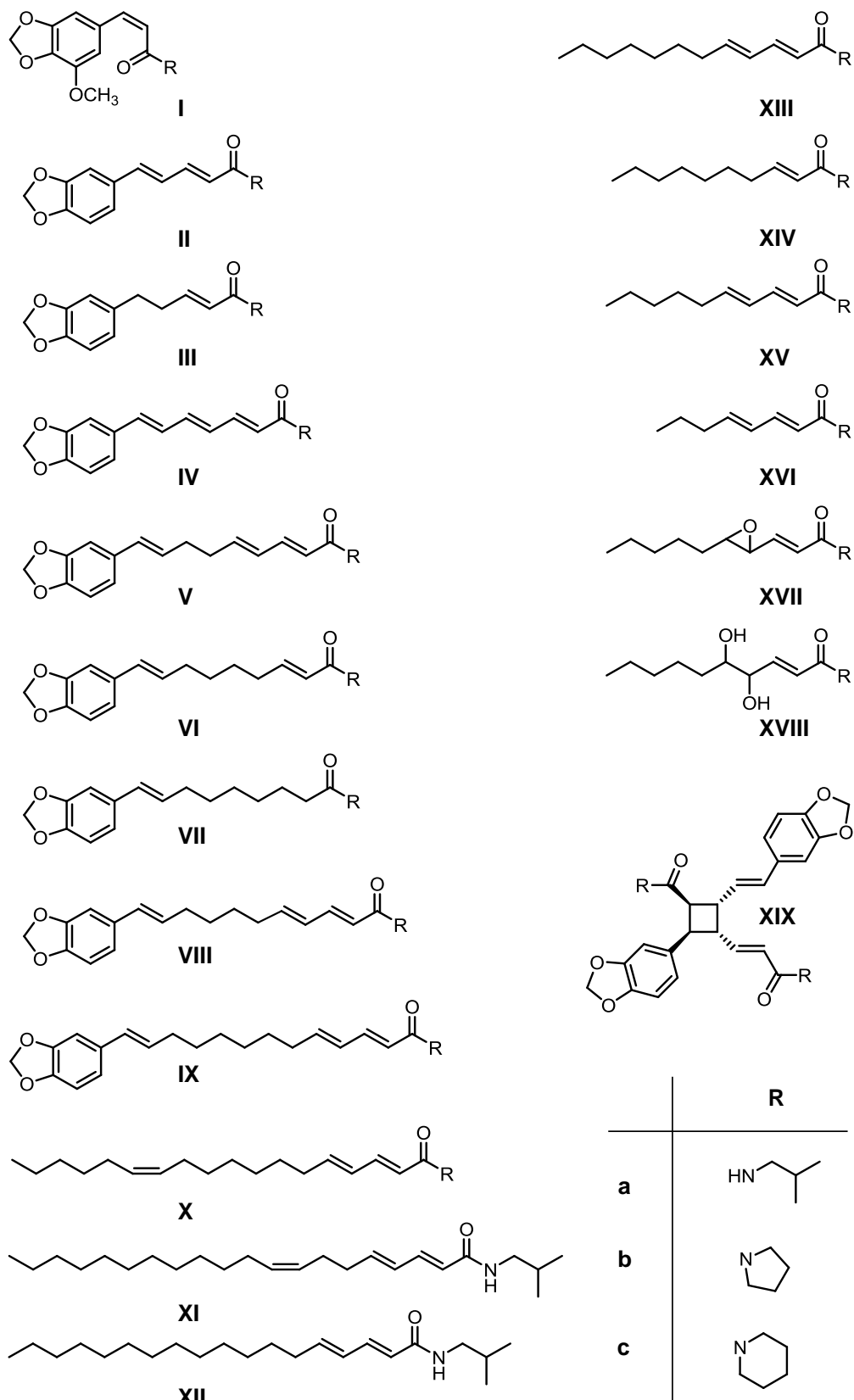


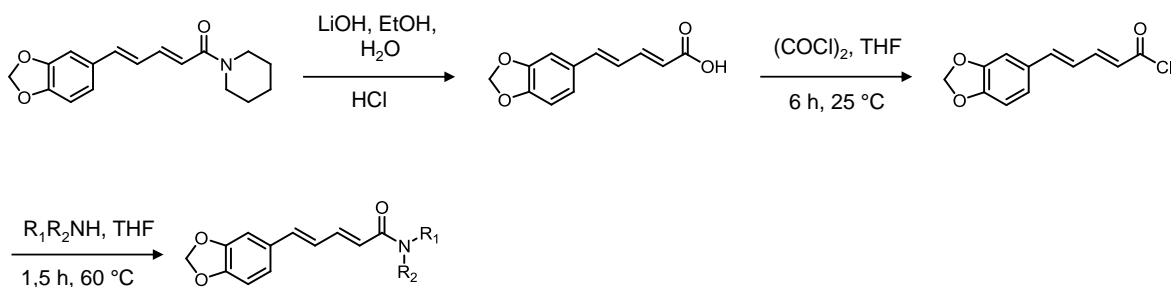
Abbildung 16: Ausgewählte Säureamide aus *Piper nigrum* L..

Neben den bereits aufgeführten Piperinanaloga sind in der Literatur zahlreiche Alkylamide aus dem Pfeffer, denen eine 2,4-Dienamid-Struktur gemein ist, beschrieben. Neben kurzkettingen Fettsäureamiden wie 1-(1-Oxo-2*E*,4*E*-dodedienyl)-pyrrolidin (XIIIb), 1-(1-Oxo-2*E*,4*E*-decadienyl)-pyrrolidin (XVb), 1-(1-Oxo-2*E*-decaenyl)-piperidin (XIVc), 1-(1-Oxo-2*E*,4*E*-decadienyl)-piperidin (XVc), *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*-decadienamid (XVa), seinem Dihydroxyanalogum *N*-Isobutyl-4,5-dihydroxy-2*E*-decaenamid (XVIIIa), seinem Epoxid *N*-Isobutyl-4,5-epoxy-2*E*-decaenamid (XVIIa), *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*-octadienamid (XIa) und *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*-dodedienamid (XIIIa) gelang es Wei et al. (2004), das langkettige Alkylamid mit einem C 18:3 Fettsäureteil, (2*E*,4*E*,12*Z*)-*N*-isobutyloctadeca-2,4,12-trienamid (Xa), zu isolieren. Nakatani und Inatani (1981) isolierten ebenfalls zahlreiche Isobutylamide aus *Piper nigrum* L.. Darunter befinden sich Pellitorin (XVa), *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*,8*Z*-eicosatrienamid (XIa), *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*-octadecadienamid (XIIa) oder *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*-decadienamid (XIVa). Die Bestimmung der Position der *cis*-ständigen Doppelbindung von *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*,8*Z*-eicosatrienamid (XIa) erfolgte dabei nach *cis*-Dihydroxylierung mit OsO<sub>4</sub> und der anschließenden Identifizierung der nach Malaprade-Oxidation erhaltenden Aldehyde via GC.

Auch aus weiteren Mitgliedern der Familie der Piperaceen konnten langkettige Alkylamide isoliert und spektroskopisch verifiziert werden, die ebenfalls neben dem 2,4-Dienamid-Strukturelement in  $\gamma$ -Position zum Säureamid eine weitere *cis*-ständige Doppelbindung aufwiesen (Kikuzaki et al., 1993; Morikawa et al., 2004, Wu et al., 2004). Kikuzaki et al. (1993) isolierten sieben langkettige Alkylamide aus *Piper retrofractum*, wie das *N*-Isobutyl-2*E*,4*E*,14*Z*-eicosatrienamid. Anders als bei der Arbeit von Nakatani und Inatani (1981) bestimmten Kikuzaki et al. (1993) jedoch mittels OsO<sub>4</sub> die Position der *cis*-ständigen Doppelbindung an Position C(14) und nicht an C(8).

Zahlreiche Arbeiten in der Literatur befassen sich zudem mit der Synthese von Pfefferamiden sowie deren Analoga. Zur Variierung der basischen Leitstruktur von Piperin wurde dieses in der Vergangenheit in einem ersten Schritt alkalisch gespalten. Während Chatterjee und Dutta (1967) dazu Piperin in einer methanolischen Kaliumhydroxidlösung für 24 h unter Rückfluss kochten, verwendeten de Paula et al. (2000) dazu eine ethanolische Lithiumhydroxid-Lösung in der Hitze. Die typische Generierung von Amiden erfolgt anschließend oftmals im Schlüsselschritt mit Hilfe der Kondensation eines Acylchlorides mit dem entsprechenden Amid (Dyer et al., 2004). Beispielsweise beschreiben de Paula et al. (2000) eine Möglichkeit zur Synthese von insektiziden, piperinanalogen Amiden (Abbildung 17). Diese Arbeitsgruppe setzte Piperin, das aus dem Ethanolextrakt von *Piper nigrum* L. isoliert wurde, mit ethanolischem Lithiumhydroxid in der Hitze zu Piperinsäure um. Nach der Aktivierung zum Piperinsäurechlorid durch Zugabe von Oxalylchlorid wurden abschließend die ge-

wünschten Piperinanaloga durch Substitution der gewünschten Amide erfolgreich gewonnen (de Paula et al., 2000).



**Abbildung 17: Schema der Generierung von Amiden ausgehend von Piperin nach de Paula et al. (2000).**

Außerdem zeigen die Synthesen von Koul et al. (2000), die sie für Struktur/Wirkungsbeziehungen von Piperin und seinen Analoga in Bezug auf die Cytochrom P450 Aktivität durchgeführt haben, dass die Aktivierung zu den Säurechloriden auch gut mit Thionylchlorid zu erzielen ist. Neben den Kopplungen der Säureamide über die Acylchloride setzten sowohl Nakamura et al. (1988) als auch Venkatasamy et al. (2004) Piperinsäure mit Methansulfonylchlorid und Triethylamin zum Ester um. In situ wurde anschließend auch hier mit Zugabe des Amins das gewünschte Piperinanaloga gewonnen. Eine weitere Synthesemöglichkeit zur Generierung von Piperinanaloga wird von Venkatasamy (2003) beschrieben, bei der die Piperinsäure durch Zugabe von Dicyclohexylcarbodiimid und 2-Mercaptothiazolidin sowie von Dimethylaminopyridin zu deren 2-Mercaptothiazolidinderivaten umgesetzt wird, die wiederum mit den entsprechenden Aminen reagieren können.

Dyer et al. (2004) verdeutlichen zudem in ihrem Übersichtsartikel über die Synthese von Pfefferamiden und deren Analoga, dass bei einer notwendigen Kettenverlängerung des ungesättigten Säureteils der Piperin-verbundenen Verbindungen oftmals Phosphoniumsalze oder Phosphonatester in der Wittig-Reaktion zum Einsatz kommen. Auch Hinweise auf die Literatur zu zahlreichen Totalsynthesen der Pfefferinhaltsstoffe sind dem Review von Dyer et al. (2004) zu entnehmen. Mit der Totalsynthese von Dehydropiperonalin, Piperonalin, Pelitorin und verwandten Amiden führten Kaga et al. (1994) den stereoselektiven Aufbau konjugierter Doppelbindungen durch die Kopplung von (*E*)- $\beta$ -Bromacrylamiden mit Alkenyl- und Alkylboronaten durch. Die Totalsynthesen von Piperolein und Piperettin wurden dagegen

z. B. von Venkatasamy et al. (2004) nach einer modifizierten Methode von Dehmlow und Shamout (1981) über eine Aldolkondensation von Piperonal an 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin beziehungsweise 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin durchgeführt.

Darüber hinaus haben einige Forschergruppen in den letzten Jahren begonnen, die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Prozesse zu erarbeiten, die erste Einblicke in die Scharfwahrnehmung des Pfeffers ermöglichen. McNamara et al. zeigten bereits 2005, dass Piperin ähnlich wie Capsaicin den TRPV1 aktivieren und desensibilisieren kann. Im Vergleich zu Capsaicin wirkt Piperin zwar erst in höheren Konzentrationen, ist aber wesentlich effizienter bei der Desensibilisierung des Rezeptors (McNamara et al., 2005). Neben Piperin fungieren 18 weitere Säureamide, die aus *Piper nigrum* L. isoliert wurden, als chemische Agonisten auf den TRPV1 und den TRPA1 (Okumura et al., 2010). Die Untersuchungen von Okumura et al. (2010) verdeutlichen, dass besonders die Pfefferinhaltsstoffe Piperin, Isopiperin, Isochavicin, Piperanin, Pipernonalin, Dehydropipernonalin, Retrofractamid C, Piperolein A sowie Piperolein B mit EC<sub>50</sub>-Werten zwischen 0,6 und 128 µM als potente TRPV1 Agonisten fungieren. Ferner führten Piperin, Isopiperin, Isochavicin, Piperanin, Piperolein A, Piperolein B und *N*-Isobutyl-(2*E*,4*E*)-tetradeca-2,4-dienamid zur Aktivierung des TRPA1 mit EC<sub>50</sub>-Werten zwischen 7,8 und 148 µM. Correa et al. (2010) konnten weiterhin verdeutlichen, dass neben natürlichen Piperinderivaten auch diverse Piperinanaloga die in humanen TRPV1 exprimierten HEK293-Zellen aktivieren können. Mit ihren systematischen Struktur/Wirkungsbeziehungen konnten Correa et al. (2010) zeigen, dass im Gegensatz zur Stereochemie und der Anzahl der Doppelbindungen, die Länge der aliphatischen Seitenkette ein entscheidendes Aktivierungskriterium für den TRPV1 darstellt. Das Öffnen des Methylendioxyrings führte, ebenso wie strukturelle Änderungen an dem basischen Teil der Piperinanaloga, zu einer Aktivitätsänderung am TRPV1.

Neben der scharfen Wirkung konnten für einige der aufgeführten Pfeffersäureamide auch biologische und pharmakologische Eigenschaften nachgewiesen werden. Neben antibakteriellen (Huhtanen, 1980; Ghoshal et al., 1996; Khan et al., 2006), antikarzinogen (Reen et al., 1997; Pradeep et al., 2002; Selvendiran et al., 2004; Sunila und Kuttan, 2004; Bezerra et al., 2006; Das et al., 2007), antidepressiven (Lee et al., 2005; Li et al., 2007<sup>a</sup>; Li et al. 2007<sup>b</sup>), antidiarrhöischen (Bajad et al., 2001), antimikrobiellen (Hiwale et al., 2002; Khan et al., 2006; Huhtanen et al., 1980; Veerareddy et al., 2004; Ghoshal et al., 1996; Ghoshal et al., 2002; Ribeiro et al., 2004) und antioxidativen (Vijayakumar et al., 2004; Vijayakumar und Nalini, 2006) weisen sie auch insektizide und larvizide Wirkungen auf (Miyakado et al., 1979 und 1980; Yang et al., 2002; Park et al., 2002; Siddiqui et al., 2004; Scott et al., 2005).

Eine Übersicht und Hinweise über die Inhaltsstoffe, die aus diversen Mitgliedern der Piperaceae isoliert und identifiziert wurden, ist zum einen dem Artikel von Parmar et al. (1997) und zum anderen Dyer et al. (2004) zu entnehmen.

Trotz jahrzehntelanger Forschung auf dem Gebiet der nicht-flüchtigen Inhaltsstoffe des Pfeffers und obwohl seit Kurzem bekannt ist, dass neben Piperin auch weitere Pfeffersäureamide den Rezeptor TRPV1 ebenso wie den TRPA1 aktivieren, liegen neben der Kenntnis des Piperins, bislang jedoch keine systematischen Studien zu den den typischen Scharfgeschmack von Pfeffer prägenden Amiden vor.

## 2 Ziel der Untersuchungen

Züchtungsprogramme zur gezielten Verbesserung der sensorischen Qualität pflanzlicher Lebensmittel setzen die Kenntnis der wertgebenden Schlüsselgeschmacksstoffe voraus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher die den typischen Geschmack von Bleichspargel (*Asparagus officinalis* L.) sowie von Pfeffer (*Piper nigrum* L.) ursächlich prägenden Verbindungen identifiziert werden.

Für den deutschen Gemüseproduzenten ist Bleichspargel (*Asparagus officinalis* L.) eine bedeutende wirtschaftliche Größe. Neben der Beschaffenheit von Textur, Farbe und Aroma ist besonders auch der exquisite Geschmack ein wichtiger Qualitätsparameter bei der Vermarktung von Spargel. Häufig führt jedoch ein gelegentlich auftretender Bittergeschmack zu Verbraucherreklamationen. Obwohl Saponine als Bittergeschmacksträger und vor allem als Markersubstanzen der sporadisch auftretenden Bitterkeit von Spargel diskutiert werden (Kawano et al., 1975; 1977), ist bislang keine analytische Objektivierung des Bittergeschmacks von Spargel in der Literatur zu finden.

Das Ziel im ersten Teil dieser Arbeit war damit die Isolierung sowie die strukturelle und sensorische Charakterisierung geschmacksaktiver Verbindungen in rohem und gekochtem Bleichspargel. Um die geschmacksaktiven Substanzen systematisch aufzuspüren, sollten diese durch Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität angereichert und anschließend mittels Geschmacksverdünnungsanalyse aktivitätsorientiert fraktioniert werden. Des Weiteren sollten die Geschmacksstoffe nicht nur präparativ isoliert, sondern auch mittels LC/MS- und NMR-Experimenten in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Da in der Vergangenheit Analoga zu den bereits als bitter charakterisierten Saponinen überwiegend aus Spargelpflanzen (*Asparagus officinalis* L.) isoliert und identifiziert wurden (Huang and Kong, 2006), sollte im Verlauf der Arbeit in weiteren Spargelpflanzenteilen nach Bitterstoffen gesucht werden. In sensorischen Studien sollten außerdem die isolierten Verbindungen bezüglich ihres Geschmacksschwellenwertes und ihrer Geschmacksqualität beurteilt werden. Um den Beitrag einzelner Komponenten zum Geschmack des Spargels abschätzen zu können, sollten darüber hinaus ihre Dose-over-Threshold (DoT)-Faktoren nach ihrer Quantifizierung ermittelt werden.

Die Früchte von *Piper nigrum* L. werden hauptsächlich wegen ihres scharfen Geschmacks geschätzt und als Gewürz bei der Speis Zubereitung verwendet. Bei der Beurteilung der Würzqualität von Pfeffer ist folglich die Analyse seiner Scharfstoffe erforderlich. In der Literatur wird das Säureamid Piperin als das eigentliche scharfe Prinzip des Pfeffers beschrieben (Franke, 1997). Trotz jahrzehntelanger Forschung auf dem Gebiet der nicht-flüchtigen Inhaltsstoffe des Pfeffers, liegen neben Piperin bislang keine systematischen Studien über die wertgebenden Scharfstoffe auf molekularer Ebene vor.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher zunächst die natürlich vorkommenden, sensorisch aktiven Verbindungen aus schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum* L.) strukturell und psychophysikalisch charakterisiert werden. Zur systematischen Lokalisierung der aktiven Substanzen sollten diese durch Extraktion mit Ethanol angereichert und anschließend mittels Geschmacksverdünnungsanalyse aktivitätsorientiert fraktioniert werden. Des Weiteren sollten die Geschmacksstoffe präparativ isoliert und mittels LC/MS- bzw. NMR-Experimenten und gegebenenfalls durch Synthesemethoden in ihrer Struktur geklärt werden. Zudem sollten Strukturabhängigkeiten einzelner Verbindungen auf molekularer Ebene in Bezug auf ihren resultierenden Geschmack anhand von Geschmacksschwellenwerten diskutiert werden. Um den Beitrag einzelner Komponenten zum sensorischen Profil des Pfeffers abschätzen zu können, sollten diese quantitativ bestimmt und abschließend auf Basis von Dosis/Wirkungs-Überlegungen in deren Scharf- beziehungsweise Tinglingaktivität gewichtet werden. Weitergehende Studien zu Struktur/Aktivitäts-Zusammenhängen sollten darüber hinaus die strukturellen Voraussetzungen für eine sensorische Aktivität der Säureamide offen legen. Erste Einblicke in die Geschmacksstoffverteilung in unterschiedlichen Pfefferhandelsproben sollten abschließend mit Hilfe von Quantifizierungsexperimenten gewonnen werden.



### **3 Spargel (*Asparagus officinalis* L.) – Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 Untersuchungen zum Geschmack des rohen und gekochten Spargels (*Asparagus officinalis* L.)**

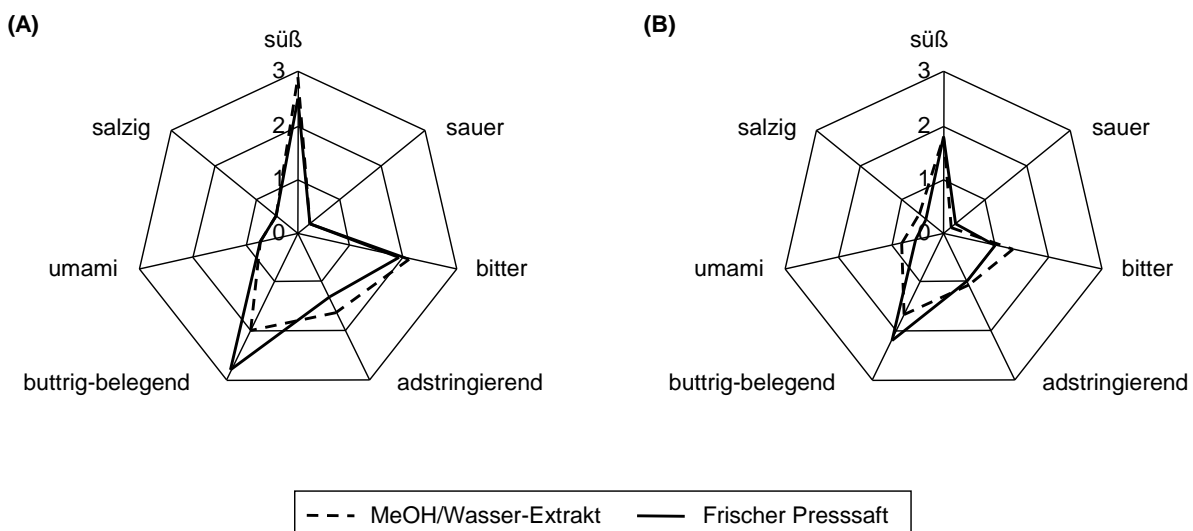
Literaturstudien zeigen, dass die holländische Spargelsorte Grolim im Vergleich zu anderen weißen Spargelsorten durch eine ungewöhnlich starke Bitternote auffällt, die bei der Direktvermarktung häufig von Kunden beansprucht wird (Brückner et al., 2008). Um die Bitterstoffe in möglichst großen Mengen aus dem weißen Spargel isolieren zu können, wurde daher die Sorte Grolim als Untersuchungsobjekt gewählt.

##### **3.1.1 Geschmacksprofilanalyse**

Zur Beschreibung des gesamten sensorischen Eindrucks des geschälten rohen und gekochten Grolim-Spargels wurden zu Beginn der Untersuchungen vergleichende Geschmacksprofilanalysen durchgeführt. Dazu wurden die weißen, geschälten Spargelstangen längs halbiert und roh beziehungsweise gekocht entsaftet, sodass die entstandenen Presssäfte filtriert und gegeneinander verkostet werden konnten. Die Intensität der verschiedenen Geschmacksrichtungen süß, sauer, salzig, bitter, umami, adstringierend und buttrig-belegend wurden dabei von einem, anhand von Referenzgeschmackstoffen geschulten Sensorikpanel auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) eingestuft.

Eine Gegenüberstellung der so erhaltenen Daten (Netzdiagramme in Abbildung 18) zeigt, dass der Presssaft des rohen Spargels am geschmacksintensivsten bewertet wurde. Dennoch sind die Profile der beiden Presssäfte untereinander, bezogen auf die jeweiligen Geschmacksrichtungen, ähnlich. Mit einem Wert von 2,5 empfand das Sensorikpanel den süßen Geschmackseindruck des rohen Spargels als dominierend, gefolgt von der Süße des gekochten Spargels mit 1,8. Die höchste Bitterintensität wies ebenfalls der rohe Spargel mit 1,9 auf (gekocht 1,3).

Weiterhin wurde eine neue, in der Literatur noch nicht beschriebene, Facette der Mundfülle wahrgenommen. Bei der Unterscheidung verschiedener somatosensorischer Qualitäten des Spargels fiel auf, dass der Spargel neben einer weichen, samtigen Adstringenz noch eine Mundfülle aufweist, die sich langsam im Mund ausbreitet und die Zunge belegt, ähnlich wie ein auf der Zunge zergehendes Stückchen Butter. Dieser als „für Spargel typisch“ empfundene Geschmackseindruck, wurde als „buttrig-belegend“ definiert. Besonders der rohe Spargel fiel dem Sensorikpanel mit einer Intensität von 2,8 gegenüber dem gekochten mit 2,2 auf. Die sauren, salzigen und umamiartigen Geschmackseindrücke wurden bei den Verkostungen weniger stark wahrgenommen.



**Abbildung 18: Geschmacksprofilanalysen des weißen, geschälten, rohen (A) und des gekochten (B) Spargels.**

Mit dem Ziel, den ermittelten Geschmacksprofilen auf molekularer Ebene die Schlüsselgeschmacksstoffe entgegen zu stellen, wurden diese mittels eines Methanol/Wasser-Gemisches sowohl aus frischen als auch aus gekochten weißen Spargelstangen extrahiert. Dazu wurden die Spargelproben homogenisiert und mit Methanol (pH 5,5) versetzt. Nachdem die Extrakte für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt und unter Vakuum abfiltriert wurden, wurden die Rückstände drei weitere Male mit einer Methanol/Wasser-Mischung (70/30; v/v) extrahiert. Die daraus resultierenden Filtrate wurden vereint und der Methanolanteil im Vakuum bei 40 °C entfernt. Die Spargelrückstände und die Filtrate wurden eingefro-

ren, gefriergetrocknet und deren Ausbeuten gravimetrisch bestimmt (vgl. Tabelle 17 im Anhang).

Um Verluste von Geschmacksstoffen während der Lösungsmittlextraktion und Gefrier Trocknung auszuschließen und die quantitative Extraktion von geschmacksaktiven Inhaltsstoffen zu überprüfen, wurden die Geschmacksprofile der Methanolextraktlyophilisate des rohen und gekochten Spargels, die auf ihre natürlichen Ausgangskonzentrationen rückverdünnt wurden, vergleichend zu deren Spargelpresssäften evaluiert (Abbildung 18).

Während sich die Profile der Lyophilisate und der entsprechenden Presssäfte bei den Geschmacksqualitäten süß, salzig, umami, bitter und adstringierend nur marginal unterscheiden, konnte eine Abnahme der buttrig-belegenden Wirkung während des Aufarbeitungsprozesses detektiert werden. Im Gegensatz zu den Presssäften, die Werte für die außergewöhnliche Mundfülle von 2,8 (roh) und 2,2 (gekocht) erreichten, wurden die Lyophilisate bei 2,0 (roh) und 1,7 (gekocht) eingeordnet. Um die Verluste während der Aufarbeitung zu minimieren, wurden folglich zwischen den Fraktionierungs- und Aufarbeitungsschritten keine Gefrier Trocknungsprozesse angewandt.

Der Extraktionsrückstand wurde durch das Sensorikpanel als geschmacklos bewertet. Somit konnte die Methanolextraktion bezüglich geschmacksaktiver Inhaltsstoffe als vollständig angesehen werden.

Da der Spargel bedingt durch seinen kurzen Erntezeitraum nicht ganzjährig zur Verfügung stand, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Lyophilisate der Methanolextrakte als Referenzen bei den Geschmacksprofilsensoriken eingesetzt.

Die Bedeutung einzelner Inhaltstoffe auf den sensorischen Gesamteindruck des Spargels sollte nun auf molekularer Ebene untersucht werden. Um Einzelverbindungen zu lokalisieren und identifizieren, wurde im Folgenden eine mehrstufige Fraktionierung durchgeführt.

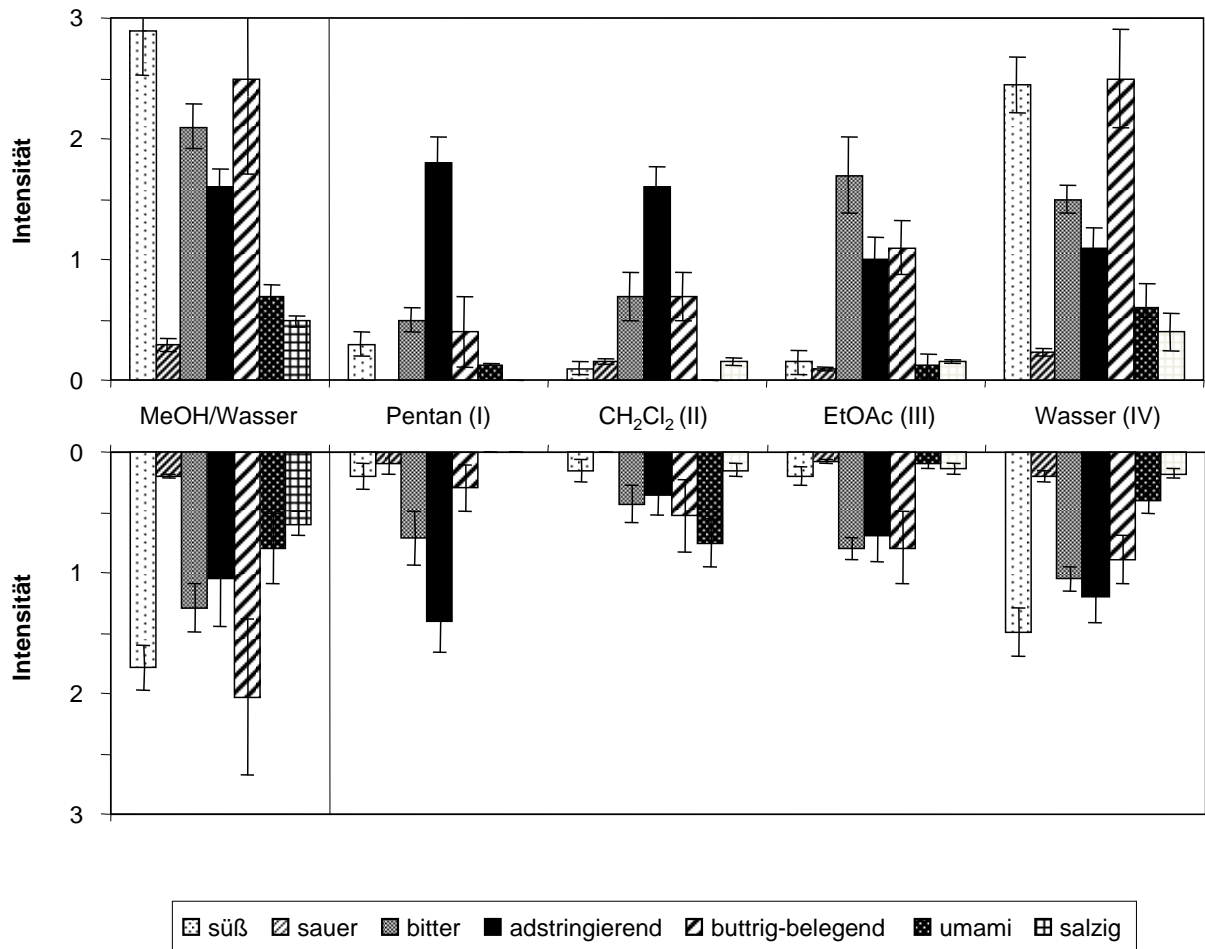
## 3.2 Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierung von Geschmacksstoffen in Spargel

### 3.2.1 Aktivitätsorientierte Fraktionierung von *Asparagus officinalis* L. var. Grolim

Um die nichtflüchtigen, sensorisch aktiven Verbindungen des Spargels aktivitätsorientiert zu fraktionieren, wurden die Geschmacksstoffe durch Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität aus rohem und gekochtem Spargel extrahiert.

Dazu wurden die Methanol/Wasser-Extrakte vom Lösungsmittel befreit, mit Milliporewasser (Fraktion IV) aufgenommen und sukzessiv mit Pentan (Fraktion I), Dichlormethan (Fraktion II) und Ethylacetat (Fraktion III) im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die Ausbeuten der erhaltenen Extraktionsrückstände und Fraktionen wurden nach Gefriertrocknung gravimetrisch bestimmt und sind der Tabelle 18 im Anhang zu entnehmen. Die vier Fraktionen I–IV sowohl des rohen als auch des gekochten Spargels wurden anschließend auf ihre „natürlichen“ Ausgangskonzentrationen mit mineralstoffarmem Wasser (pH 5,9) rückverdünnt und von einem geschulten Sensorikpanel vergleichend zu den lyophilisierten Methanolextrakten (Referenz) des rohen und gekochten Spargels aus 3.1.1 bewertet. Die Prüfergruppe evaluierte dabei die Geschmacksintensitäten der einzelnen Extrakte hinsichtlich ihrer Geschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, bitter, umami, buttrig-belegend und adstringierend auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar).

In Abbildung 19 sind die unterschiedlichen Geschmacksintensitäten einzelner Extrakte der rohen (oben) sowie der gekochten (unten) Spargelstangen gegeneinander dargestellt. Keine der einzelnen Lösungsmittelfractionen war so geschmacksintensiv wie der Methanol/Wasser-Extrakt des rohen Spargels. Dennoch fielen die Lösungsmittelfractionen des rohen Spargels, im Vergleich zu denen des gekochten Spargels durch ihre höheren Geschmacksintensitäten auf. Besonders süß, buttrig-belegend und bitter wurden die Wasser- und Ethylacetatextrakte bewertet. Die Pentan- und Dichlormethanextrakte fielen dagegen eher durch ihren dominierend adstringierenden Eindruck auf. Wird das Geschmacksprofil des rohen Spargels mit dem des gekochten verglichen, wird deutlich, dass zahlreiche Geschmackstoffe während des Kochprozesses aus den Spargelstangen extrahiert bzw. abgebaut wurden.



**Abbildung 19: Vergleichende sensorische Bewertung der verschiedenen Lösungsmittelfraktionen des rohen (oben) und des gekochten (unten) Spargels. Dabei wurde der Methanol/Wasser-Extrakt des rohen Spargels als Referenz verwendet. Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall (P = 95%) des Mittelwertes.**

Bei der sensorischen Beurteilung des Spargels fiel insbesondere der unbehandelte, rohe im Vergleich zum gekochten weißen Spargel durch seine intensiveren Geschmacksnoten auf. Um ausreichende Mengen der sensorisch aktiven Verbindungen aus Spargel isolieren zu können, wurde somit der rohe Spargel für weitere Aufarbeitungs- und Isolierungsexperimente verwendet.

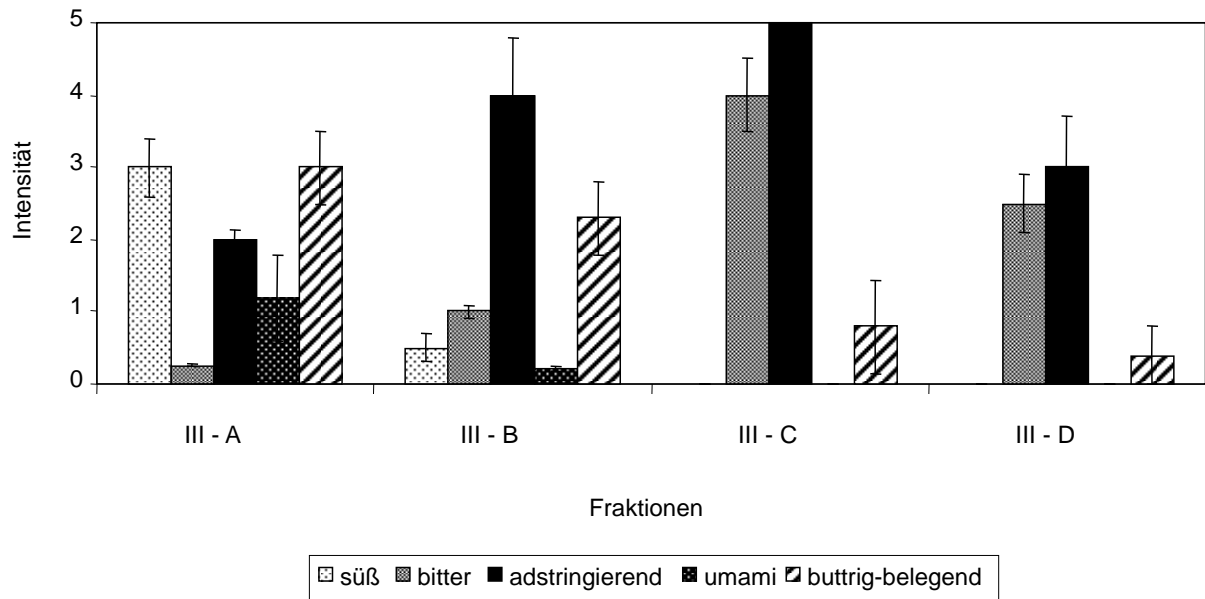
Da bei den Lokalisierungs- und Identifizierungsexperimenten ein besonderes Augenmerk auf die Bitterkeit und den buttrig-belegenden Geschmackseindruck gelegt werden sollte, wurde die intensiv schmeckende Ethylacetatfraktion (III) des rohen Spargels weiter subfraktioniert.

### **3.2.2 Lokalisierung und Identifizierung geschmacksaktiver Substanzen in Fraktion III**

#### **3.2.2.1 Lokalisierung von Geschmacksstoffen mittels Festphasenextraktion**

Der Ethylacetatextrakt (Fraktion III) des rohen Spargels zeigte bezüglich der Geschmacksrichtungen Bitter und Buttrig-belegend hohe Intensitäten. Folglich wurde dieser als erste der Fraktionen genauer untersucht.

Um die geschmacksaktiven Verbindungen in Fraktion III von den weniger oder nicht geschmacksaktiven abzutrennen und diese zu gewichten, wurde sie mittels Festphasenextraktion (RP18-SPE) subfraktioniert. Analog zum angewendeten Methanol/Wasser-Gradienten wurden die gewonnenen Fraktionen wie folgt bezeichnet: Fraktion III-A (0/100, v/v; Ausbeute: 68,7%), Fraktion III-B (30/70, v/v; Ausbeute: 8,9%), Fraktion III-C (70/30, v/v; Ausbeute: 12,8%) und Fraktion III-D (100/0, v/v; Ausbeute: 9,6%). Die resultierenden vier Eluate wurden gefriergetrocknet, ausgewogen und sensorisch analysiert. Dazu wurden Aliquote der lyophilisierten Subfraktionen des Ethylacetatextraktes des rohen Spargels in gleichen Volumina mineralstoffarmem Wasser (pH 5,9; 1% Ethanol) gelöst und sensorisch gegeneinander gewichtet, indem ihre Geschmacksqualitäten auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) eingeordnet wurden. Dabei wurden die Fraktionen dreifach konzentriert, ausgehend von den natürlichen Konzentrationen, eingesetzt (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Sensorische Bewertung der verschiedenen SPE-Fraktionen III-A bis III-D. Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall (P = 95%) des Mittelwertes.**

Die Ergebnisse zeigten, dass alle Subfraktionen des Ethylacetatextraktes geschmacksaktiv waren. Die Fraktionen mit den größten Bitterintensitäten waren die Fraktionen III-C und III-D mit Intensitäten zwischen 3 und 4. In der Fraktion III-A waren wahrscheinlich noch süße Zucker oder Polyole anzutreffen, die beim Ausschütteln nicht vollständig in die Wasserphase übergegangen waren. Es fiel auf, dass die Verbindungen mit einem buttrig-belegenden Effekt verstärkt in den polaren Fraktionen III-A und III-B mit Werten bis zu 3 anzufinden waren. Da Fraktion III-B im Vergleich zu Fraktion III-A chromatographisch weniger komplex zusammengesetzt war, wurde diese im Folgenden im Hinblick auf ihre buttrig-belegenden Eigenschaften näher betrachtet.

### 3.2.2.2 HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA) der Fraktion III-B

Mit dem Ziel, den ermittelten Geschmacksprofilen auf molekularer Ebene die Schlüsselgeschmacksstoffe entgegen zu stellen, wurde die Fraktion III-B mittels HPLC-ELSD an RP-18-Material in 19 Fraktionen aufgetrennt und diese durch Verwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse in ihren relativen Geschmacksintensitäten gewichtet. Die Geschmacksverdünnungsanalyse (Frank et al., 2001) ermöglichte dabei die Lokalisierung und Selektion einzelner sensorisch relevanter Spargelinhaltsstoffe aus einer komplex zusammengesetzten Matrix, sodass sich die Identifizierungsexperimente auf ausgewählte Inhaltsstoffe aus dem weißen Spargel beschränkte. Dazu wurden die gefriergetrockneten Fraktionen in gleichen Volumina mineralstoffarmem Wasser (1% Ethanol) gelöst und solange sukzessiv 1:1 verdünnt, bis kein Geschmack mehr wahrnehmbar war. Die Verkostung dieser Verdünnungsreihe erfolgte nach steigender Konzentration im Duotest gegen Blindwasser. Dabei wurde der sogenannte „Half-Mouth“-Test (Scharbert et al., 2004) verwendet, um bei der Wahrnehmung der adstringierenden Verbindungen einen Memory-Effekt zu vermeiden. Die Verdünnungsstufe, bei der ein Unterschied zu einem Blindwert festgestellt wurde, wurde als Geschmacksverdünnungs (GV)-Faktor definiert. Da der GV-Faktor jeder Verbindung definitionsgemäß proportional zu deren Geschmack ist, konnten so die 19 HPLC-Fraktionen in ihren relativen Geschmacksintensitäten gewichtet werden. In Abbildung 21 sind die HPLC-Trennung als Chromatogramm (linke Seite) sowie die für die einzelnen Fraktionen bestimmten GV-Faktoren (rechte Seite) dargestellt.

Durch ihre hohen GV-Faktoren von 512 gehörten die Verbindungen in den Fraktionen III-B1, III-B3, III-B5, III-B10 sowie III-B11 zu den Substanzen, die für die Adstringenz von Relevanz waren. Die schon aus der Beurteilung des Geschmacksprofils der Fraktion III-B hervorgegangene dominierende Geschmacksrichtung der buttrig-belegenden Mundfülle war auch in der GVA wieder zu finden. Dieser für Spargel typisch empfundene Geschmackseindruck trat in den Fraktionen III-B7, III-B12 und III-B14 mit Geschmacksverdünnungsfaktoren von 64 und 1024 auf.

Insbesondere um detaillierte Kenntnisse über die molekulare Zusammensetzung der potentiellen Fraktionen III-B5, III-B12 und III-B14 zu gewinnen, wurden diese wie im Folgenden beschrieben isoliert und mittels spektroskopischer Analysen identifiziert.



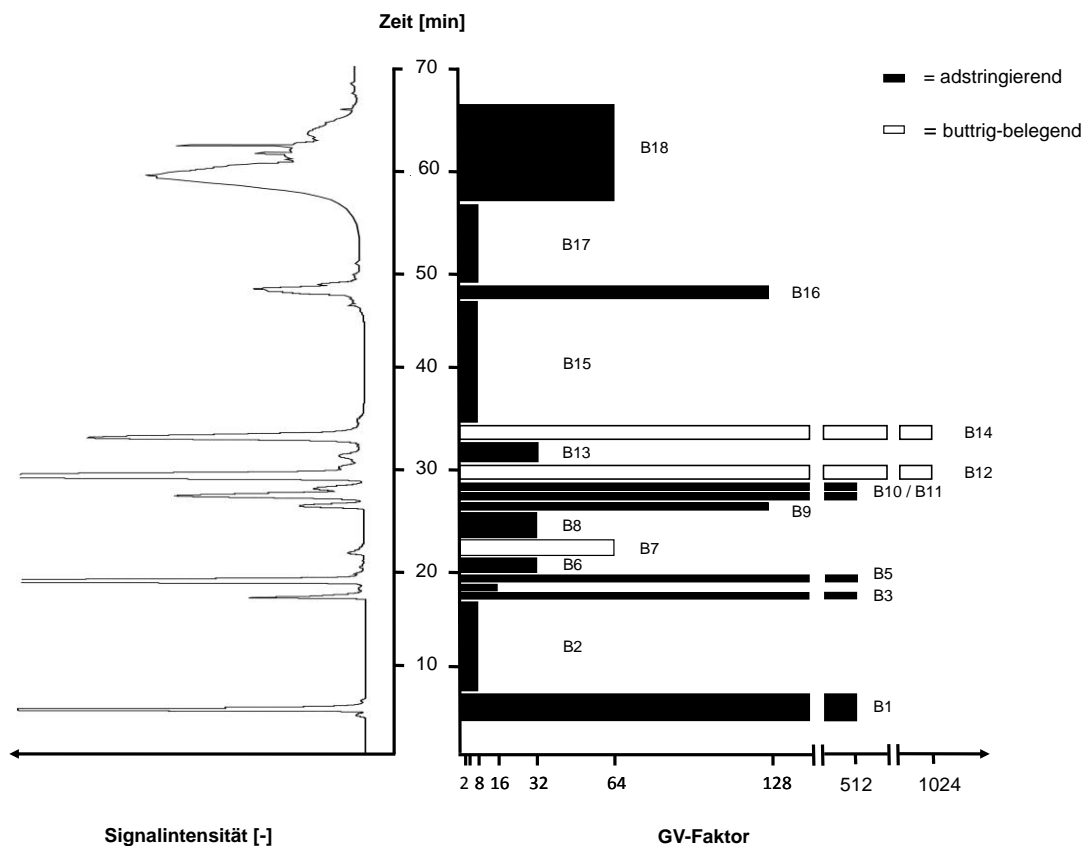


Abbildung 21: RP-HPLC Chromatogramm (linke Seite) und Geschmacksverdünnungsanalyse mit GV-Faktoren (rechte Seite) der Fraktion III-B.

### 3.2.2.3 Identifizierung der Verbindungen in den GV-Fractionen III-B5, III-B12 und III-B14

#### **Identifizierung der adstringierenden Verbindung in der GV-Fraktion III-B5**

Aus Fraktion III-B5 konnte nach der Gefriertrocknung ein adstringierend wirkender Inhaltsstoff als weißes Pulver gewonnen werden. Mittels HPLC-DAD, LC/MS, Cochromatographie und eines Vergleich der spektroskopischen Daten mit denen der käuflichen Reinsubstanz wurde in Fraktion III-B5 Inosin (**1**) identifiziert.

**Identifizierung der buttrig-belegenden Substanzen in den GV-Fractionen III-B12 und III-B14**

Die bei den Degustationsexperimenten am höchsten buttrig-belegend bewerteten Fraktionen III-B12 und III-B14 wurden jeweils einzeln semipräparativ isoliert. Bei der Überprüfung der isolierten Verbindungen mittels HPLC-ELSD fiel jedoch auf, dass diese sich jeweils in ein identisches Gleichgewicht beider Fraktionen umlagerten. Die Auswertung der LC-TOF-MS-Analyse erbrachte für die Verbindungen **2** und **3** in den Fraktionen III-B12 und III-B14 die gleiche Summenformel von  $C_{10}H_{16}O_7S_2$ . Bei der massenspektrometrischen Überprüfung (ESI-Modus) des Gemisches zeigte sich sowohl für **2** als auch für **3** das gleiche Abspaltungsmuster mit einem Massenverlust von 162 amu, der auf je eine Hexoseeinheit hindeutete. Die Betrachtung des  $^1H$ -NMR-Spektrums ergab vicinale Kopplungskonstanten zweier anomerer Protonen bei  $\delta_H$  4.27 ppm mit  $J=7.9$  Hz [d, H-C(1' $\beta$ )] und bei  $\delta_H$  4.87 ppm mit  $J=3.6$  Hz [d, H-C(1' $\alpha$ )], die die Vermutung zuließen, dass die Zweiermischung aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -glycosidisch gebundenen Isomeren besteht. Das  $^1H$ -NMR-Spektrum wies außerdem einen für Zucker typischen Protonenfingerprint zwischen 3.02 und 4.87 ppm auf. Ausgehend von den anomeren Protonen erfolgte die Zuordnung der Zuckerprotonen insbesondere mit Hilfe von COSY- und HMBC-Experimenten. Die Verknüpfung der beiden Glucose-Einheiten über C(6') zum Aglycon konnte aus dem HMBC-Spektrum durch long-range Kopplungen herausgelesen werden (Abbildung 22).

Zur eindeutigen Identifizierung der Zucker wurden die Verbindungen **2** und **3** anschließend alkalisch hydrolysiert und ionenchromatographisch mit gepulster amperometrischer Detektion analysiert. Nach alkalischer Hydrolyse wurden nicht nur die Zucker beider Verbindungen als Glucose, sondern auch das Aglycon als Asparagussäure (**4**) mittels LC/MS-TOF- und NMR-Experimenten sowie durch Literaturdatenabgleich (Bretthauer, 2007) identifiziert.

Zudem diente die alkalische Hydrolyse zur Absicherung der Ester-Teilstruktur. Zur Bestätigung der Struktur des Aglycons erfolgte darüber hinaus die Synthese der Verbindung (**4**) modifiziert nach der Methode von Bretthauer (2007) in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TU München. Ein Vergleich der erhaltenen spektroskopischen und chromatographischen Daten der synthetisierten Referenzsubstanz mit den Verbindungen aus III-B-12 und III-B-14 bestätigte die Vermutung, dass es sich bei beiden Aglyca um Asparagussäure handelt.

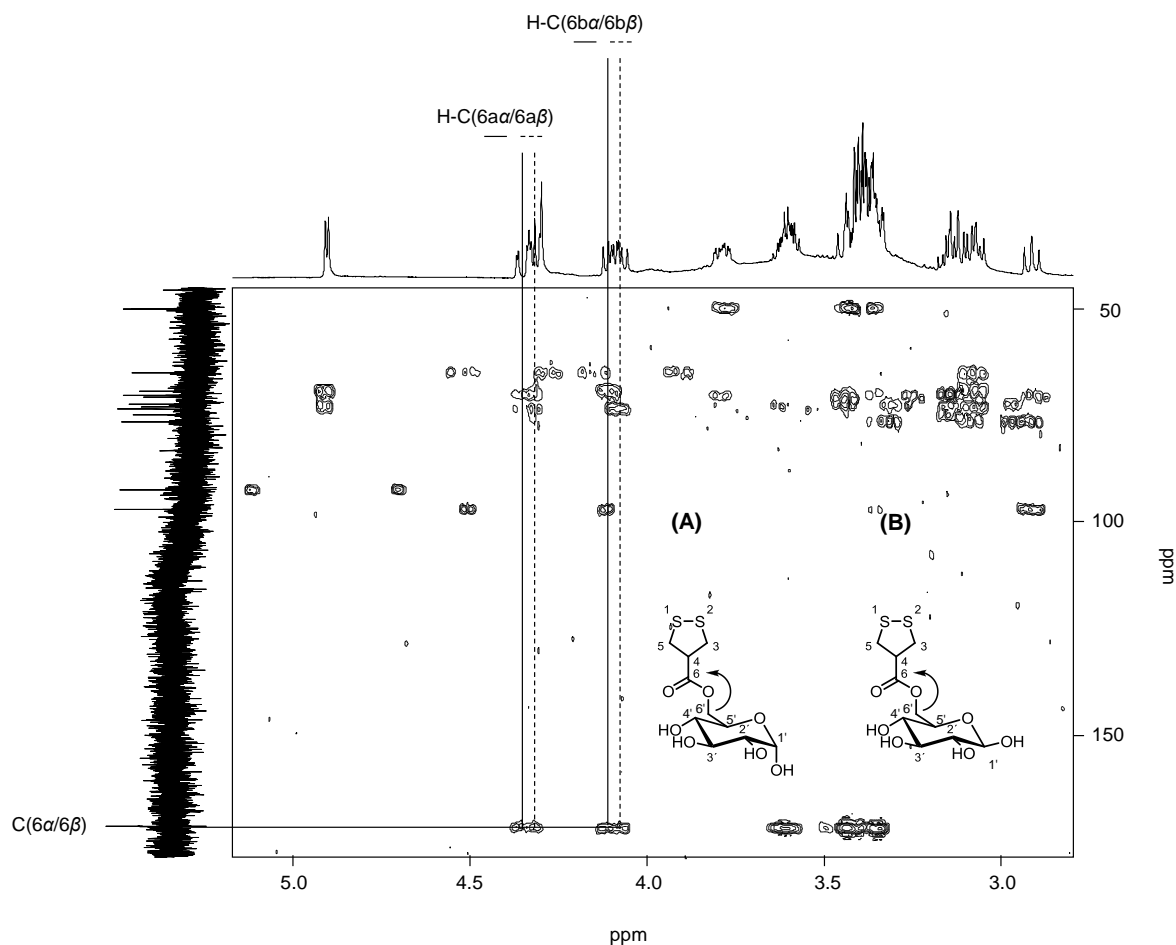


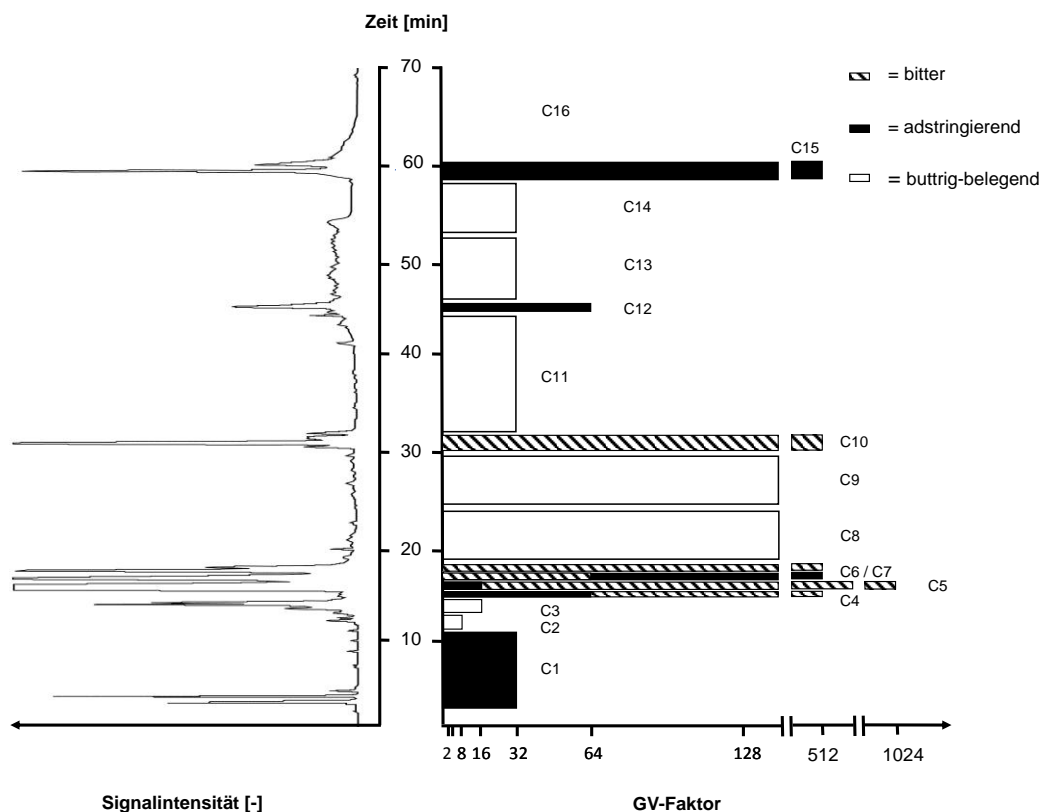
Abbildung 22: HMBC-Spektrum von 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\alpha$ -glucopyranoseester (A, 2) und 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\beta$ -glucopyranoseester (B, 3).

Basierend auf allen 1D- und 2D-NMR-Ergebnissen sowie LC-MS/MS-Daten wurden die in Abbildung 22 dargestellten Verbindungen **2** und **3** aus den Fraktionen III-B-12 und III-B-14 als die in der Literatur bisher nicht beschriebenen 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\alpha$ -glucopyranoseester (**2**) und 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\beta$ -glucopyranoseester (**3**) identifiziert. Weiterhin gelang es mit Hilfe der Integration des freistehenden Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}$  4.27 ppm von H-C(1' $\alpha$ ) und des Triplets bei  $\delta_{\text{H}}$  4.27 ppm von H-C(2' $\beta$ ), das Verhältnis von 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\alpha$ -glucopyranoseester zu 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\beta$ -glucopyranoseester auf 2:3 zu bestimmen. Bei der Rechromatographie der isolierten Fraktionen III-B-12 und III-B-14 stellte sich ebenfalls ein Verhältnis beider Peaks von 3:2 ein, so-

dass davon ausgegangen werden kann, dass der früher eluierende Peak auf der RP-18-Phase Verbindung **3** ist.

### 3.2.2.4 HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA) der Fraktion III–C

Zur näheren Lokalisierung und Charakterisierung der potentesten Bitterstoffe in weißem Spargel wurde die bittere Ethylacetatsubfraktion III-C näher untersucht. Die Anwendung der HPLC/GVA auf diese Fraktion erbrachte fünf bitter schmeckende Fraktionen mit GV-Faktoren von 64 bis 1024 (Abbildung 23).



**Abbildung 23: RP-HPLC Chromatogramm (linke Seite) und Geschmacksverdünnungsanalyse mit GV-Faktoren (rechte Seite) der Fraktion III-C.**

Um für die Isolierung der Schlüsselbitterstoffe aus der Fraktion III-C ausreichend Substanzmengen zu erhalten, wurden 100 kg frischer, roher, ungeschälter Spargel aufgearbeitet. Aufgrund der Komplexität der HPLC-Fraktion und um die Bitterstoffe in hoher Reinheit zu isolie-

ren, wurden die aktivsten Fraktionen III-C4 bis III-C7 semi-präparativ aufgereinigt. Die Strukturaufklärung der einzelnen Subfraktionen, die mittels LC/MS- und NMR-Spektroskopie erzielt wurde, wird im Folgenden beschrieben.

### 3.2.2.5 Identifizierung der Verbindungen in den GV-Fraktionen III-C5, III-C6 und III-C7

#### ***Identifizierung des bitteren Geschmacksstoffgemisches in Fraktion III-C5***

Die Substanzmischung, die aus Fraktion III-C5 isoliert wurde, zeigte nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz auf der Dünnschichtchromatographie einen grünen Spot, sodass für alle Verbindungen dieser Fraktion eine Saponinstruktur abgeleitet werden konnte (Schwarzbach, 2004). Die isolierte weiße Mischung wies weiterhin im ESI<sup>-</sup>-Modus ein Molekülion [M-H]<sup>-</sup> bei  $m/z$  1047 auf, wohingegen die LC/MS-Analyse im ESI<sup>+</sup>-Modus für diese Verbindungen neben dem [M+H]<sup>+</sup> bei  $m/z$  1049 ein dominierendes Quasimolekülion [M-18+H]<sup>+</sup> bei  $m/z$  1031 ergab. In der Massenspektrometrie von Saponinen sind Wasserabspaltungen insbesondere bei positiver Ionisierung typisch (Ikeda et al., 2004). Aufgrund der identischen Massen aller Komponenten aus Fraktion III-C5 konnte auf eine chromatographisch bis dato nicht trennbare Isomerenmischung geschlossen werden. In LC-TOF-MS/MS-Experimenten mit dem mengenmäßig am stärksten gebildeten Ion [M-18+H]<sup>+</sup> konnten Fragmentationen durch Zuckerabspaltungen beobachtet werden. Nicht nur  $m/z$  869 [M-18-Glc+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  723 [M-18-Glc-Rha+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  577 [M-18-2Rha-Glc+H]<sup>+</sup>, sondern auch das Aglycon bei  $m/z$  415 [M-18-2Rha-2Glc+H]<sup>+</sup> konnte dabei nachgewiesen werden. Das Abspaltungsmuster ließ sowohl auf den Verlust von zwei Hexosen als auch auf den von zwei Desoxyhexosen schließen. Zur eindeutigen Identifizierung der Zucker wurde die Mischung anschließend sauer hydrolysiert und ionenchromatographisch mit gepulster amperometrischer Detektion analysiert. Der Vergleich mit Referenzsubstanzen zeigte, dass es sich bei den beiden Hexosen um Glucose und bei den beiden Pentosen um Rhamnose handelte. Außerdem konnte aus dem wässrigen Hydrolyseansatz mit Ethylacetat das Aglycon extrahiert werden, sodass mittels hochauflösender Massenspektrometrie nicht nur die Elementarzusammensetzung des Molekülions ( $m/z$  1071.5360, berechnet für [C<sub>51</sub>H<sub>84</sub>O<sub>22</sub>+Na]<sup>+</sup>), sondern auch die des Aglycons ( $m/z$  415.3204, berechnet für [C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>) ermittelt werden konnte. Folglich wurde für diese Mischung diverser Verbindungen je eine Saponinstruktur mit dem Aglycon Diosgenin oder Yamogenin angenommen.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente des freigesetzten Aglycons wie auch der Verbindungsmischung durchgeführt. Nicht nur die NMR-Datensätze, sondern auch Spuren von Xylose, die während der Zuckeranalyse von Fraktion III-C5 detektiert wurden, zeigten deutlich, dass es sich um ein Saponingemisch handelte. Chromatographisch gelang es weder an weiteren (modifizierten) Umkehrphasen noch an Normalphasen oder HILIC-Material, die Mischung aufzutrennen. Dennoch konnten aus den spektroskopischen Daten der Fraktion III-C5 die Hauptkomponenten **5a** und **5b** identifiziert werden.

Einen ersten Einblick in die Teilstruktur der Saponinmischung erbrachte die NMR-spektroskopische Analyse des freigesetzten Aglycons aus der Komponentenmischung. Da es nicht gelang, die entstehenden Aglyca chromatographisch aufzutrennen, wurde das Gesamthydrolysat nach Abtrennung der Zucker über RP-18-Material NMR-spektroskopisch untersucht. Werden die beiden Stereozentren der Ausgangsverbindungen **5a/b** an Position C(22) und C(25) betrachtet, könnten vier Sapogenine während der sauren Hydrolyse gebildet werden (Abbildung 24). Neben Diosgenin (**6**, 22*R*,25*R*-Typ, Abbildung 24, B, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>) und Yamogenin (**7**, 22*R*,25*S*-Typ, Abbildung 24, B, R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H) wären bei einem Vorderseitenangriff auch die beiden 22*S*-Analoge (22*S*,25*S*)-(20*α*)-Spirost-5-en-3*β*-ol (**8**, Abbildung 24, C, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>) und (22*S*,25*R*)-(20*α*)-Spirost-5-en-3*β*-ol (**9**, Abbildung 24, C, R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H) zu erwarten. Unter Zuhilfenahme der chemischen Verschiebungen aus der Literatur (Agrawal et al., 1985; Agrawal, 2003) gelang es, die Aglyca Diosgenin (**6**, 25*R*) und Yamogenin (**7**, 25*S*-Typ) in der Hydrolysatlösung zu postulieren. Dabei wurden, gemessen in Deuteriochloroform, nahezu identische chemische Verschiebungen für die Positionen H-C(27) und C(27) der beiden Aglyca gefunden (Yamogenin:  $\delta_{\text{H}}$  1.08 ppm [H-C(27)],  $\delta_{\text{C}}$  16.6 ppm [C(27)]; Diosgenin:  $\delta_{\text{H}}$  0.81 ppm [H-C(27)],  $\delta_{\text{C}}$  16.9 ppm [C(27)]). Da die chemischen Verschiebungen der Verbindung **8** und **9** bis dato noch nicht publiziert wurden, gelang es nicht, ihre Anwesenheit mittels der evaluierten NMR-Datensätzen herauszuarbeiten. Obwohl die Verbindungen **8** und **9** in Spargel bisher nicht beschrieben wurden, ist nicht auszuschließen, dass diese auch als Nebenkomponten gebildet werden. In der Vergangenheit wurde nach der Hydrolyse von Spargelsaponinen wie dem AS-2-I ebenfalls eine Mischung aus Diosgenin (**6**) und Yamogenin (**7**) gefunden, die jedoch darauf zurückgeführt wurde, dass während der sauren Hydrolyse Yamogenin (**7**) zu Diosgenin (**6**) isomerisieren könne (Kawano et al., 1977; Shimoyamada et al., 1996). NMR-Studien an gereinigtem Diosgenin, das unter den Hydrolysebedingungen der Saponine in wässriger Trifluoressigsäurelösung sechs Stunden bei 100 °C behandelt wurde, erbrachten jedoch keine Umlagerung von Diosgenin zu den theoretisch denkbaren Strukturisomeren **7**, **8** bzw. **9**. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die 22*S*-Konfiguration im Zielmolekül begünstigt vorliegt.

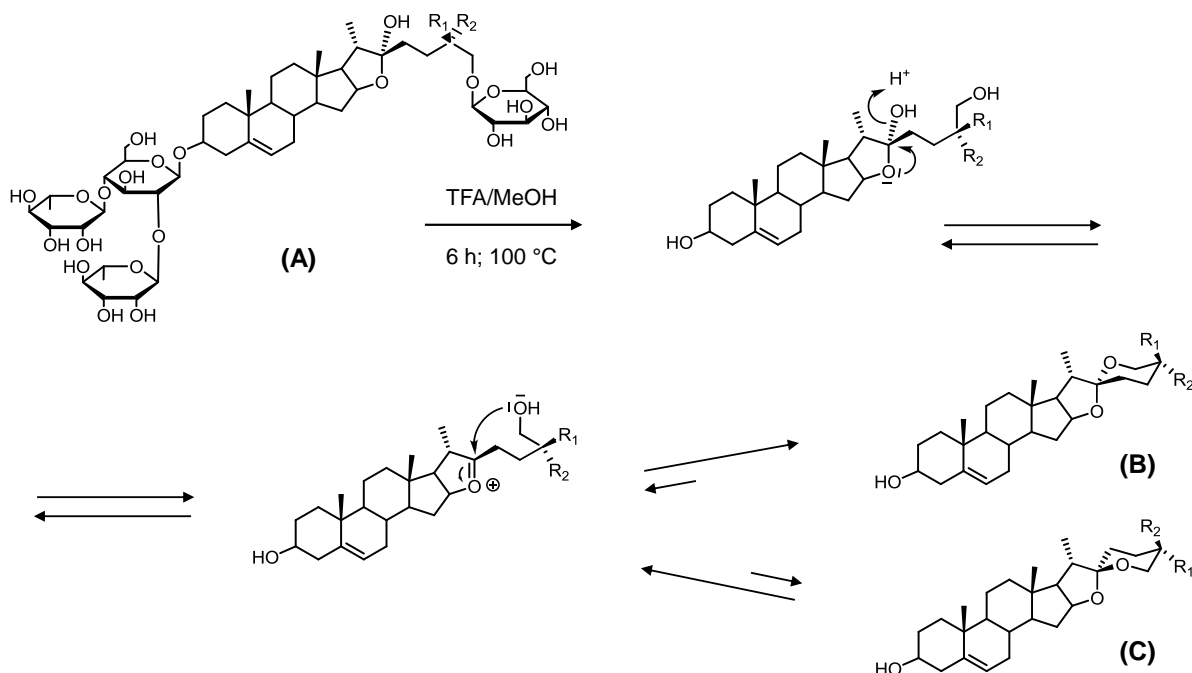


Abbildung 24: Hydrolyse der Verbindungen **5a/b** zu **B**: Diosgenin (**6**,  $22R,25R$ -Typ,  $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ) und Yamogenin (**7**,  $22R,25S$ -Typ,  $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$ ) bzw. zu **C**: ( $22S,25S$ )-(20 $\alpha$ )-Spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (**8**,  $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ) und ( $22S,25R$ )-(20 $\alpha$ )-Spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (**9**,  $R_1=CH_3$ ,  $R_2=H$ ).

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **5a/5b** in Pyridin- $d_5$  war aufgrund der zahlreichen überlappenden Multipletts in der Region zwischen  $\delta_{\text{H}}$  0.8 bis 2 ppm (Steroid-Bereich) sowie zwischen  $\delta_{\text{H}}$  3.5 und 5 ppm (Zucker-Bereich) wenig aussagekräftig (Abbildung 25). Durch den Zusatz geringer Mengen MeOD konnte zumindest das Resonanzsignal der Hydroxygruppen des Zuckers und deren Kopplungen durch den H/D-Austausch eliminiert werden.

Zur Identifizierung der Spinsysteme und der Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Resonanzsignale des Aglycons wurden homo- und heteronucleare COSY- und TOCSY- ebenso wie HMBC-Spektren herangezogen. Das breitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte starke Übereinstimmungen der jeweils insgesamt 51 Signale zwischen  $\delta_{\text{C}}$  17.3 und 140.7 ppm beider Verbindungen **5a** und **5b** (vgl. Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24). Insbesondere die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen beider Genine waren in den Ringen A bis D identisch.

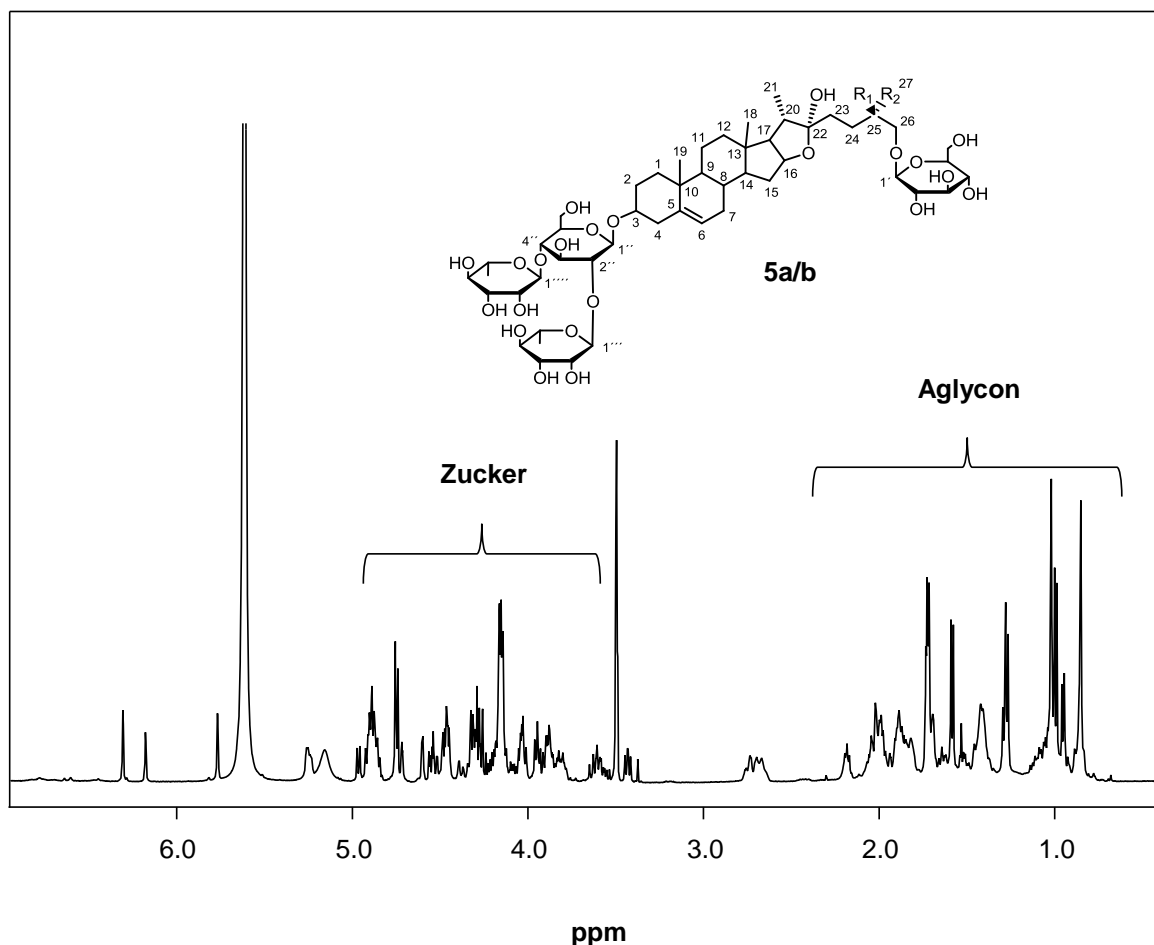


Abbildung 25:  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum von Protodioscin (5a;  $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ ,  $\text{R}_2 = \text{H}$ ) und Protonedioscin (5b;  $\text{R}_1 = \text{H}$ ,  $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ ) (B).

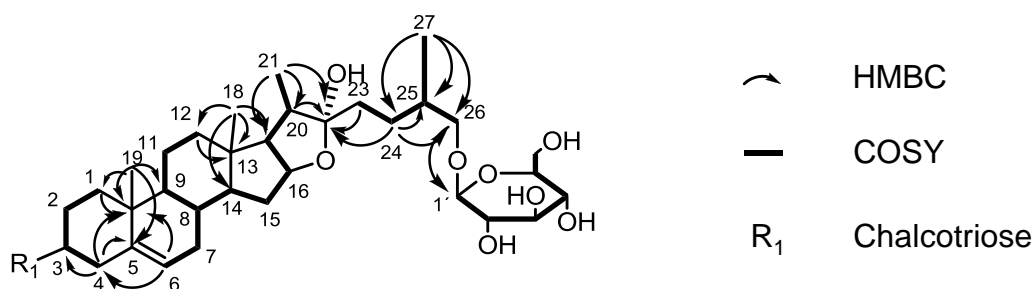
Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Resonanzsignale des A- und B-Rings der Aglyca gelang dabei in Anlehnung an Puri und Wong (1993), ausgehend von den freistehenden Protonenresonanzen bei  $\delta_{\text{H}}$  5.09–5.31 ppm [m, 1H, H-C(6)] und  $\delta_{\text{H}}$  1.01 ppm [s, 3H, H-C(19)]. Besonders die heteronuclearen  $^{2,3}\text{J}_{\text{C,H}}$ -HMBC-Korrelationen der Methylgruppe H-C(19) zu den quartären Kohlenstoffatomen C(10) und C(5) sowie zu den Kohlenstoffatomen C(1) und C(9) ermöglichten erste Einblicke in Teilregionen des A/B-Ringsystems. Die HMBC-Korrelation H-C(19)/C(9) ermöglichte weiterhin die Absicherung der Verknüpfung der Spinsysteme des B- und C-Ringes des pentacyclischen Gerüsts.

Vor allem die Position der trisubstituierten Doppelbindung zwischen C(5) und C(6) konnte ausgehend von dem gut herauszulesenden Protonensignal der Methin-Gruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  5.09–



5.31 ppm [m, 1H, H-C(6)] charakterisiert werden. Die intensiven HMBC-Korrelationen des Protons H-C(6) zu C(10), C(5), C(4) und C(7) entsprachen dabei vollständig den Literaturdaten (Puri et al., 1993).

Durch die Identifizierung von H-C(4) konnte weiterhin aufgrund des homonuclearen Kopplungsmusters des  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -Spinnsystems H-C(4)/H-C(3)-H-C(3)/H-C(2)-H-C(2)/H-C(1) im COSY-Experiment der A-Ring der Verbindung zugeordnet werden (Abbildung 26). Analog zum A-Ring gelang es ebenfalls ausgehend von H-C(6) und H-C(9) den B-Ring über COSY-Kopplungsmuster zu identifizieren.

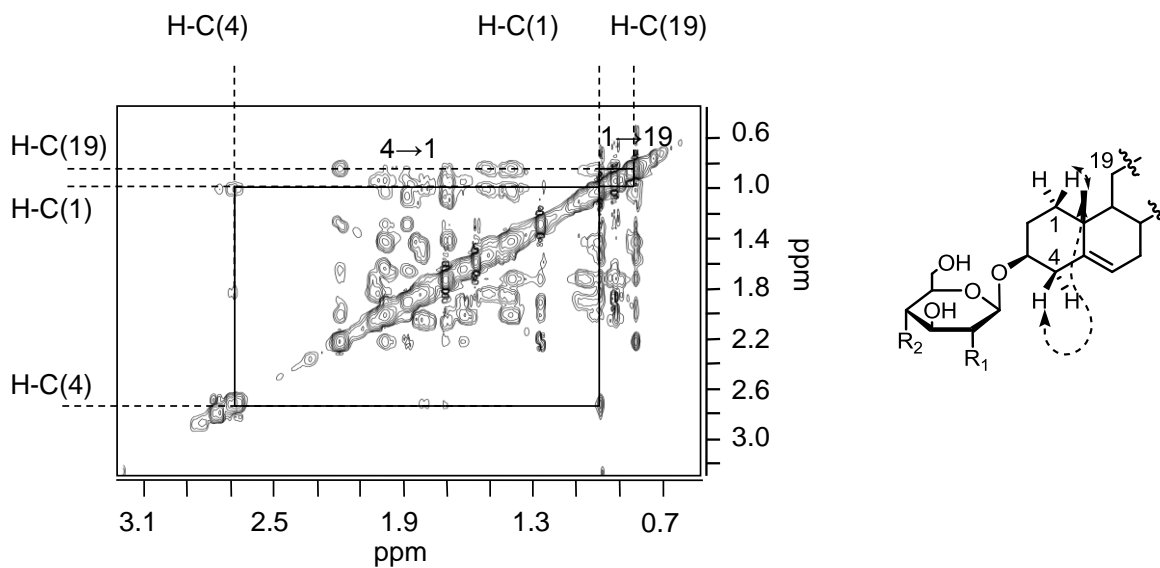


**Abbildung 26: Wichtige COSY- und HMBC-Korrelationen zur Identifizierung des Aglycons von Verbindung 5a/b.**

Aufgrund der HMBC-Korrelationssignale H-C(18)/C(12) und H-C(18)/C(13) sowie H-C(21)/C(20), H-C(21)/C(22) und H-C(21)/C(17) im Konturdiagramm erfolgte die Identifizierung der restlichen Spinsysteme analog zu den A/B-Ringen des spiroidalen Grundkörpers. Hilfreich bei der Zuordnung der Ringe D und E waren vor allem auch die intensiven HMBC-Kreuzsignale zwischen H-C(15)/C(13) und H-C(15)/C(17) (vgl. Abbildung 26).

Darüber hinaus gelang es mit Hilfe eines ROESY-Experimentes, die Konfigurationen der Ringe A bis E von **5a** und **5b** größtenteils aufzuklären. In Abbildung 27 sind beispielhaft die wichtigsten ROESY-Korrelationen des A/B-Ringes aufgeführt, die bei **5a** und **5b** identisch sind. Besonders gut zu erkennen sind die Korrelationen der Protonen der axial ständigen Methylgruppe an Position H-C(19) zu den  $\beta$ -ständigen Protonen  $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$  und  $\text{H}_\beta\text{-C}(4)$  (Abbildung 27, A) sowie die Korrelationen der  $\alpha$ -ständigen Protonen an Position  $\text{H}_\alpha\text{-(C1)}/\text{H}_\alpha\text{-(C3)}$ ,  $\text{H}_\alpha\text{-(C1')}/\text{H}_\alpha\text{-(C3)}$  sowie  $\text{H}_\alpha\text{-(C3)}/\text{H}_\alpha\text{-(C4)}$  (Abbildung 27, B). Die ROESY-Korrelationen der Ringe A bis E von **5a** und **5b** stimmten dabei mit den für Diosgenin beziehungsweise Yamogenin erwarteten NOE-Kopplungen überein (Yoshikawa et al., 2007).

(A)



(B)

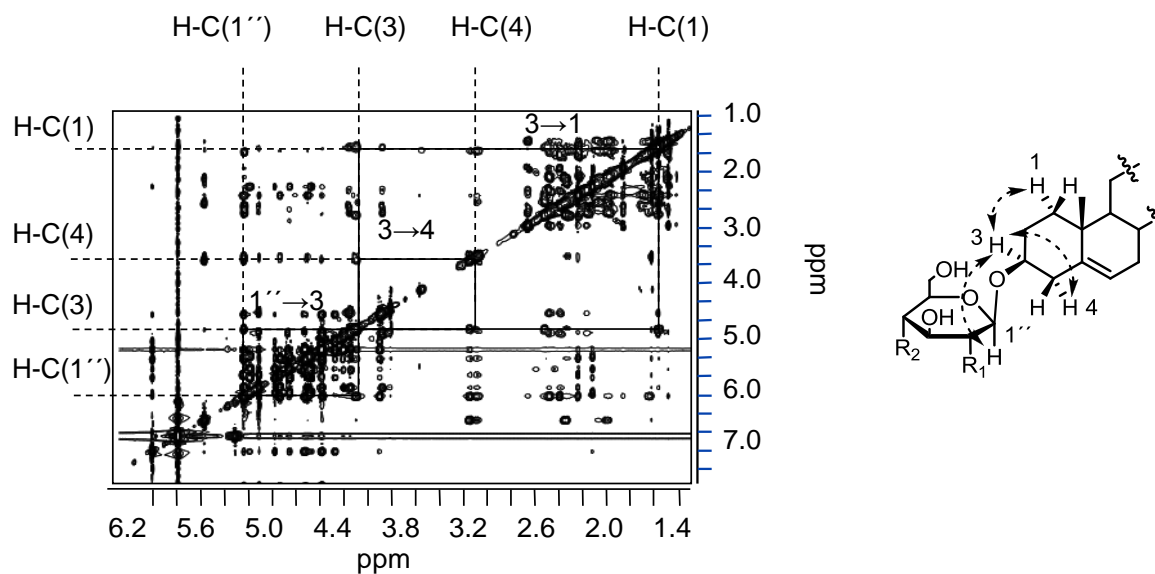


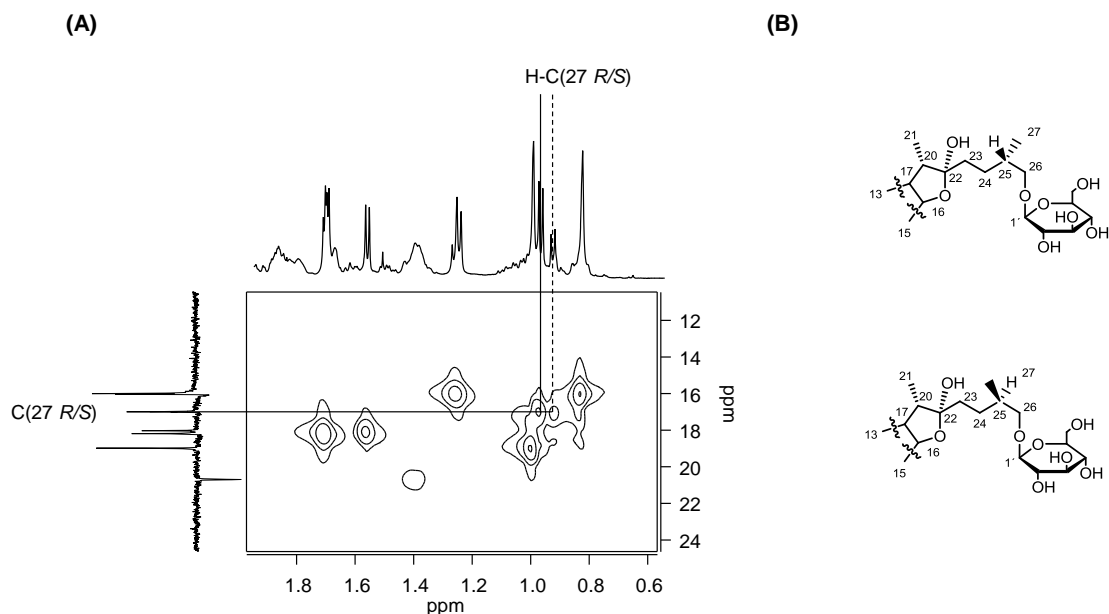
Abbildung 27: Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum der Verbindungen 5a/5b.

Im Unterschied zu dem NMR-Spektrensatz des Aglycons (Tabelle 21) nach saurer Hydrolyse, lag die Mischung aus **5a** und **5b** nicht als Spiroketal mit einem geschlossenen F-Ring sondern mit einer Furostanol-Teilstruktur vor.

Besonders für die Kohlenstoffatome C(26) von **5a** und **5b** konnte im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum eine stärker ins Tieffeld abweichende Verschiebung (Diosgenin:  $\delta_{\text{C}}$  66.8 ppm; **5a** und **5b**:  $\delta_{\text{C}}$  74.9 ppm/75.0 ppm) ausfindig gemacht werden. Während aus dem HMBC-Vergleichsspektrum des reinen Aglycons Diosgenin wie bei Puri et al. (1993) eine auffallende vier-Bindungs-Korrelation [ $^4J(\text{C},\text{H})$ ] zwischen den axialen Protonen bei H-C(26) des F-Rings und C-20 des E-Rings über das Heterosauerstoffatom zu erkennen war, konnte diese long-range Kopplung dagegen bei dem bidesmosidischen Saponin nicht wiedergefunden werden. Der quartäre Charakter der Kohlenstoffatome C(22) von **5a** und **5b** implizierte zudem jeweils die Anwesenheit einer weiteren Hydroxygruppe. Ausgehend von der Methylgruppe H-C(27) konnte über typische homonucleare COSY- wie auch über heteronucleare HMBC-Korrelationen die Seitenkette vollständig identifiziert werden.

Die Konfiguration des E-Ringes sowie der Seitenketten der Substanzen **5a** und **5b** wurde abschließend mittels eines ROESY-Experimentes und Literaturdatenvergleich der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen (Agrawal et al., 1995; Wang et al., 1997; Yoshikawa et al., 1997; Murakami et al., 2000; Zheng et al., 2004; Agrawal, 2005; Yoshikawa et al., 2007) bestimmt. Dabei wurden die strukturellen Unterschiede zwischen den Verbindungen **5a** und **5b** deutlich. Während bei Verbindung **5a** die Methylgruppe an Position 25 *R*-konfiguriert war, lag sie bei **5b** *S*-konfiguriert vor. Analog zu den Beobachtungen aus der Literatur (Wang et al., 1997; Agrawal, 2005) konnte die (25*R/S*)-Orientierung der Methylgruppe C(27) ausgehend von den zwei Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}$  0.95 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  0.99 ppm [m, H-C(27) *R/S*] abgeleitet werden (Abbildung 28). Eine eindeutige Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den *R/S*-Epimeren war jedoch nicht möglich. Auch die Orientierung der Hydroxylgruppe an Position C(22) ist nicht eindeutig zu ermitteln.

Durch Vergleiche mit den chemischen Verschiebungen des käuflich zu erwerbenden Protodioscins (**5a**) ist zusätzlich die Identifizierung der Konfiguration an Position C(22) erfolgt (Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24). Eine Methylierung des Protodioscins zu seinem 22-Methoxy-Analogum, wie unter 3.2.4.2 beschrieben, erbrachte lediglich ein Saponin einer nach hinten stehenden Methoxygruppe an Position C(22).



**Abbildung 28:** Ausschnitt aus dem HMQC-Spektrum von **5a/5b** mit den Korrelationen (A) von H-C(27 R/S) zu C(27 R/S) von **5a/b** (B).

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Saponinmischung zeigte außerdem ein für Zucker charakteristisches Protonenmuster zwischen  $\delta_{\text{H}}$  3.5 und 5 ppm. Daneben waren drei weitere anomere Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  4.90 ppm [br. s, 1H,  $J=7.8$  Hz, H-C(1'')],  $\delta_{\text{H}}$  5.78 ppm [br. s, 1H,  $J=2.6$  Hz, H-C(1''')] und  $\delta_{\text{H}}$  6.33 ppm [br. s, 1H,  $J=2.6$  Hz, H-C(1''')] sowie zwei Zucker-Methylgruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  1.58 ppm [d, 1H,  $J=7.5$  Hz, H-C(6''')] und  $\delta_{\text{H}}$  1.70–1.75 ppm [m, 1H, H-C(6'')] aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennbar. Während die anomeren Zuckerprotonen H-C(1''), H-C(1''') und H-C(1''') der Epimere **5a/5b** zusammenfielen, konnten zwei weitere anomere Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  4.98 ppm [d, 1H,  $J=7.8$  Hz, H-C(1')] und  $\delta_{\text{H}}$  4.76 ppm [d, 1H,  $J=7.6$  Hz, H-C(1')] identifiziert werden. Somit wies Position C(1') der Epimerenmischung **5a/5b** zwei chemische Verschiebungen auf. Alle anderen Protonen- und Kohlenstoffresonanzen der vier Zuckerreste fielen bei beiden Epimeren zusammen.

Die vicinalen Kopplungskonstanten der anomeren Protonen wurden aus dem  $J$ -resolved Konturdiagramm entnommen und ließen auf zwei  $\beta$ -glycosidische und zwei  $\alpha$ -glycosidische Zucker schließen. Ausgehend von den anomeren Protonen erfolgte die Zuordnung der Zuckerprotonen insbesondere mit Hilfe des COSY-Experimentes. Die Verknüpfung der Zucker einerseits zum Aglycon, andererseits untereinander, konnte aus dem HMBC-Spektrum durch long-range Kopplungen herausgelesen werden und war für **5a** und **5b** identisch. So konnten

die direkten Bindungen der beiden Glucosen zum einen zum C(26), zum anderen zum C(3) des Aglycons aufgezeigt werden. Während der Glucosebaustein, der am C(26) des Aglycons verknüpft ist, als terminal charakterisiert werden konnte, implizierten die  $^3J_{C,H}$ -Korrelation von H-C(1''') zu C(2'') und von H-C(1''''') zu C(4'') eine  $\beta$ -Chacotrioseeinheit.

Auf der Basis von LC-MS, 1D- und 2D-NMR-Daten gelang es folglich, aus Fraktion III-C5 das Epimerengemisch aus 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25*R*)-22-hydroxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol (Protodioscin oder ACS-1, **5a**) und 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25*S*)-22-hydroxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol (Protoneodioscin, AS-P2-I oder ASP-I, **5b**) zu identifizieren (Abbildung 29).

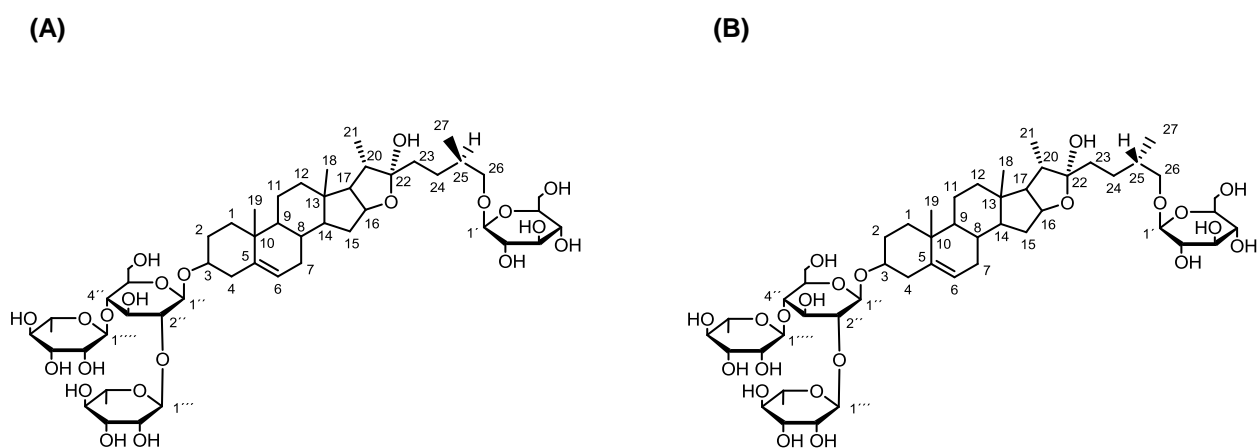
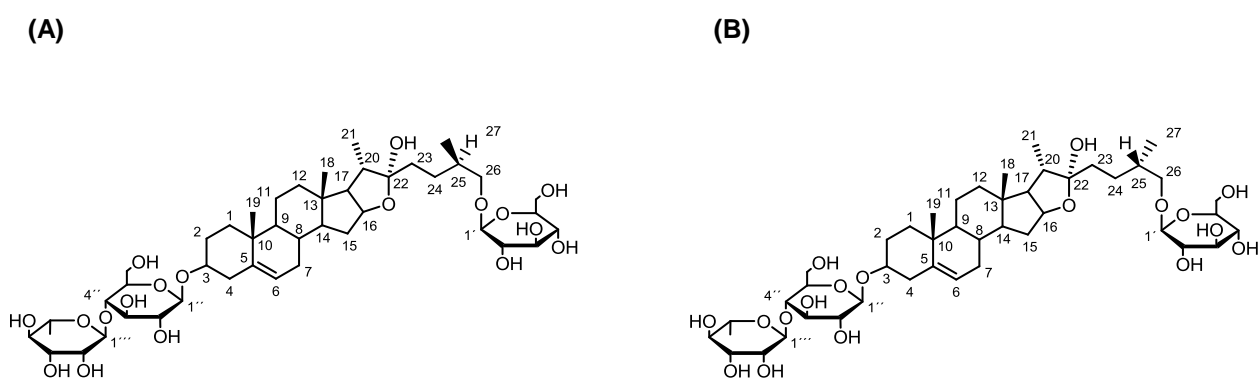


Abbildung 29: Strukturen von Protodioscin (**5a**, A) und Protoneodioscin (**5b**, B).

Während Shao et al. (1997) **5a** erstmals aus den Samen von *Asparagus officinalis* L. isolierten und mittels NMR-spektroskopischer Daten strukturell charakterisierten, wurde die Anwesenheit von **5b** in den Trieben von *Asparagus officinalis* L. durch Kawano et al. (1977) postuliert, jedoch nicht mit spektroskopischen Daten verifiziert. Erst Shimoyamda et al. (2003) isolierten **5b** aus den unteren Teilstücken des weißen Spargels und führten dessen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten auf. Auch aus anderen Pflanzen ist bekannt, dass die 25(*R,S*)-Epimere von Furostanolsaponinen nebeneinander vorkommen. Beispielsweise isolierten Zheng et al. (2004) aus den frischen Sprossachsen des *Dracaena cochinchinensis* bidesmosidische 25(*R,S*)-Saponinepimere, wie Protodioscin und Protoneodioscin oder 25(*R,S*)-Dracaenosid.

**Identifizierung der bitteren Geschmacksstoffe in Fraktion III-C6**

Analog zu den Identifizierungsexperimenten der Isomerenmischung **5a/b** wurde die bittere Fraktion III-C6 nach präparativer Isolierung mittels Massenspektrometrischer und NMR-spektroskopischer Experimente analysiert. Der Fraktion III-C6 konnten neben Spuren von **5a/b** mehrere bidesmosidische Saponin-Isomere (**10a/b**) einer Verbindung zugeordnet werden, die nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz auf der DC einen grünen Spot erbrachten. Bei der LC-TOF-MS-Analyse im negativen ESI-Modus zeigten alle Verbindung ein intensives Pseudomolekülion bei  $m/z$  901.4805 des Typs  $[M-H]^-$ . Die Ähnlichkeit der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren mit dem Saponingemisch **5a/b** sowie die Massendifferenz von 146 Da ließ den Schluss zu, dass es sich bei **10a/b** um eine strukturverwandte Isomerenmischung mit einer Rhamnoseinheit weniger handeln könnte, wie dem Epimer (25*R/S*)-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid in Abbildung 30.

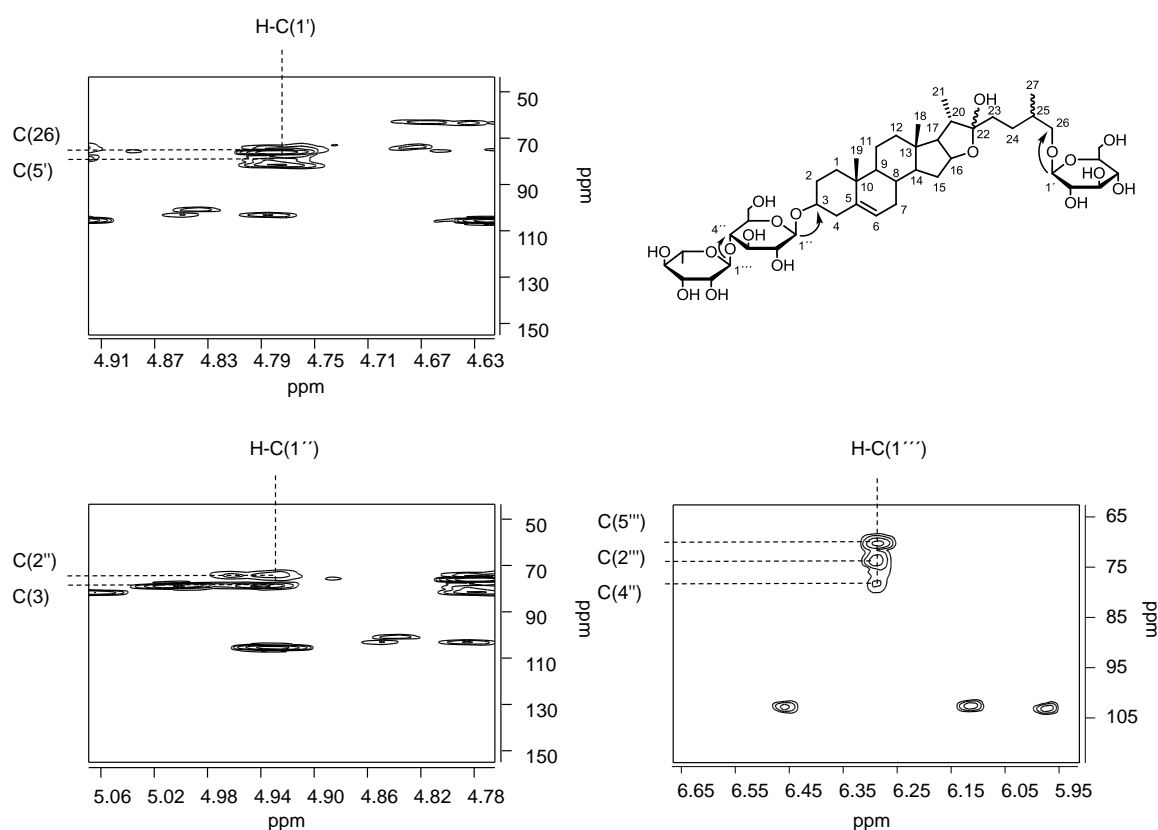


**Abbildung 30: Struktur von 10a (A) und 10b (B).**

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum von **10a/b** zeigte neben drei  $\beta$ -konfigurierten anomeren Hexose-Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  4.77, 5.06 und 4.94 ppm auch ein  $\alpha$ -konfiguriertes anomeres Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  6.29 ppm. Neben dem Bereich der überlagerten Kohlenhydratring-Protonen war weiterhin ein Methyldublett bei  $\delta_{\text{H}}$  1.68 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu erkennen, das auf eine Methylpentose hindeutete. Nach saurer Hydrolyse gelang es, den beiden Hexosen Glucose und der Pentose Rhamnose im Verhältnis 2:1 zuzuordnen. Das Aglycon, das nach der sauren Hydrolyse gewonnen wurde, erbrachte mittels LC-MS-Analyse analog zu den Verbindungen **5a/b** ein dominierendes Pseudomolekülion bei  $m/z$  415 (100,  $[M+H]^+$ ). Zur weiteren Strukturaufklärung wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente der Verbindungen aus Fraktion III-

C6 durchgeführt. Da es nicht gelang diese Mehrfachmischung chromatographisch zu trennen, wird im Folgenden auf die Identifizierung des dominierenden Epimerenpaares (*25R/S*)-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (**10a/b**) eingegangen.

Während die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Sapogeninteils der Spinsysteme A–E, der Seitenkette und der Glucose, die an Position C(26) furostanolglycosidisch an das Aglycon gebunden ist, nahezu identisch zugeordnet wurden, zeigten sich Unterschiede in der Zuckerseitenkette, die über Position C(3)  $\beta$ -O-glycosidisch verknüpft vorlag. Ausgehend von den anomeren Protonen erfolgte die Zuordnung der Zuckerprotonen insbesondere mit Hilfe des COSY-Experimentes. Die Verknüpfung der Zucker einerseits zum Aglycon, andererseits untereinander, konnte aus dem HMBC-Spektrum durch long-range Kopplungen herausgelesen werden (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Ausschnitte des HMBC-Spektrums, aus dem die Zuckerverknüpfungen herausgelesen wurden, beispielhaft für ein Epimer der Verbindungen **10a/b**.

So wurden die direkten Bindungen der beiden Glucose-Einheiten einerseits zum C(26), andererseits zum C(3) des Aglycons aufgezeigt. Anders als bei **5a/b** wies das Epimer **10a/b** jedoch im HMBC-Spektrum neben der  $^3J_{C,H}$ -Korrelation der Rhamnose (H-C(1''') zu C(4'')) keine weitere Korrelation anomerer Protonen zur Glucose, die an das Aglycon über C(3) gebunden vorlagen, auf. Darüber hinaus stimmten die chemischen Verschiebungen der terminalen Zuckerreste, die über C(3) an das Aglycon gebunden vorliegen, gut mit denen von Yoshikawa et al. (2007) überein, die das analoge Saponin Brassosid D aus *Brassica flabellifera* L. isolierten.

Die Konfiguration des Aglycons wurde abschließend mittels Literaturdatenvergleichen (Agrawal, 2005; Feng et al., 2007) bestimmt, so dass die Molekülstrukturen aus Abbildung 30 verifiziert werden konnten. Insbesondere die charakteristische doppelte chemische Verschiebung im  $^1H$ -NMR-Spektrum der Protonen an Position H-C(27) bei  $\delta_H$  0.95 ppm [d,  $J=6.7$  Hz] und bei  $\delta_H$  1.00 ppm [d,  $J=6.7$  Hz] entsprachen nach den Studien von Agrawal (2005) einem (25*R,S*)-Epimerenpaar. Dem gleichen Übersichtsartikel ist zu entnehmen, dass in den meisten Fällen die chemischen Verschiebungen der 25*R*-Analoge weiter hochfeldverschoben vorliegen.

Zudem wurde die Zuordnung der  $^{13}C$ -Verschiebungen mit Hilfe der Arbeit von Feng et al. (2007) getroffen. Die Forschergruppe um Feng war erstmals in der Lage, (25*R*)-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-gluco-pyranosid]-26-O- $\beta$ -D-gluco-pyranosid (**10a**) enzymatisch aus Protodioscin zu generieren und nach anschließender Isolierung spektroskopisch zu identifizieren. Sie hatten erfolgreich eine Glucoamylase aus *Curvularia lunata* isoliert und terminale  $\alpha$ -1,2-verknüpfte Rhamnosreste von Zuckerseitenketten, die über das C(3) von Spirostanosiden gebunden vorliegen, gespalten. Auch wenn **10a** soweit ersichtlich bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht aus *Asparagus* isoliert und identifiziert wurde, postulierten sowohl Kawano et al. (1977) als auch Wang et al. (2003) die Anwesenheit des (25*S*)-Epimeres ASP-II (**10b**). Folglich ist es erstmals gelungen die Epimerenmischung **10a/b** in den weißen Spargelstangen mittels spektrometrischer Eckdaten näher zu charakterisieren.

### **Identifizierung des bitteren Geschmacksstoffes in Fraktion III-C7**

Der Fraktion III-C7 konnten, analog zu Fraktion III-C6, mehrere bidesmosidische Saponin-Isomere einer Verbindung mit gleichen Molekulargewichten zugeordnet werden. Die LC/MS-Analyse der Fraktion III-C7 im ESI $^+$ -Modus ergab für diese Verbindungen ein dominierendes Quasimolekülion  $[M-18+H]^+$  bei  $m/z$  887.5. In Fragmentierungsexperimenten dieses Ions



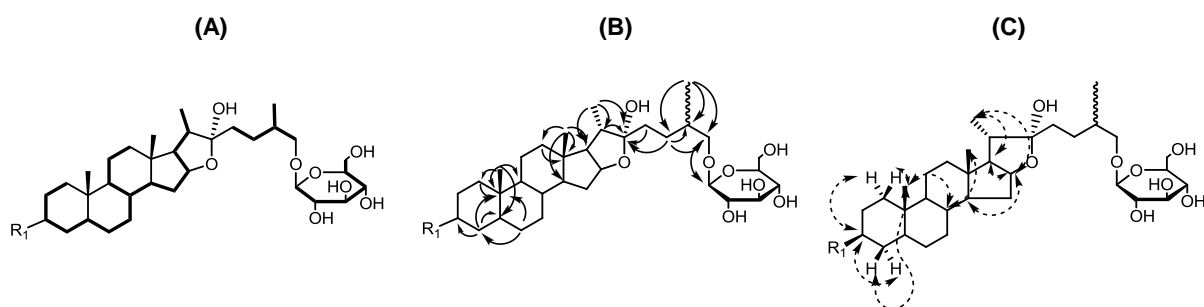
wurden Tochterionen bei  $m/z$  417  $[M-18-2Glc-Rha+H]^+$ ,  $m/z$  579  $[M-18-Glc-Rha+H]^+$  und  $m/z$  725  $[M-18-Glc+H]^+$  nachgewiesen, deren Abspaltungen von 146 Da und  $2 \times 162$  Da auf zwei Hexose- und eine Methylpentoseeinheit hindeuteten. Das Ion bei  $m/z$  417 zeigte, dass das Aglycon dieser Verbindung, im Gegensatz zum Genin der Verbindungen **5a/b**, zwei weitere Protonen aufwies und ließ ein Sarsapogenin- (**11**) oder Smilagenin- (**12**) Grundgerüst mit drei Zuckerbausteinen vermuten. Smilagenin ist zwar in der Literatur bekannt, wurde jedoch bis dato noch nie aus Spargel isoliert und beschrieben. Nach saurer Hydrolyse wurden die Zucker mittels Ionenchromatographie als Glucose und Rhamnose im Verhältnis 2:1 identifiziert.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente der Fraktion III-C7 durchgeführt. Sowohl die eindimensionalen als auch die zweidimensionalen NMR-Datensätze zeigten deutlich, dass es sich bei Fraktion III-C7 um ein Saponingemisch handelte. Insbesondere eine zusätzliche chemische Verschiebung eines anomeren Protons bei  $\delta_H$  5.12 ppm [d,  $J=7.8$  Hz] deutete auf ein weiteres Saponin mit einer anderen Zuckerverknüpfung, doch gleicher Retentionszeit (RP-18) hin. Chromatographisch gelang es weder an weiteren (modifizierten) Umkehrphasen, noch an Normalphasen oder HILIC-Material, die Mischung aufzutrennen. Dennoch wurden aus dieser Subfraktion die zwei mengenmäßig dominierenden bidesmosidischen Saponine **13a** und **13b** mittels der spektroskopischen Daten erfolgreich herausgelesen, auf deren Identifizierung im Folgenden eingegangen wird.

Bei Betrachtung der  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Spektren, ebenso wie bei der Auswertung der 2D-Konturdiagramme, fiel auf, dass analog zu den Saponinmischungen **5a/b** und **10a/b** die chemischen Verschiebungen von **13a/b** größtenteils zusammenfielen. Lediglich die Seitenkette des bidesmosidischen Furostanolgemisches **13a/b** wies leichte Signalunterschiede auf. Insbesondere die chemischen Verschiebungen der Zuckerreste überlagerten sich bei dem Epimerengemisch.

Der Vergleich der spektroskopischen Daten von **13a/b** mit **10a/b** erbrachte deutliche Parallelen. Die Übereinstimmung der Zucker-Methylresonanzen ( $\delta_H$  1,69 ppm) wie auch des Musters der anomeren Signale im  $^1H$ -NMR-Spektrum deuteten darauf hin, dass **13a** und **13b** die gleichen Saccharidreste besaßen, wie die bereits aufgeklärten bidesmosidischen Saponine **10a/b**. Deckungsgleiche Zuckerringresonanzen bestätigten diese Zuordnung. Die Verknüpfungen von einer  $\beta$ -D-Glucose an Position C(26) ebenso wie von 4-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid an Position C(3) mit dem Aglycon konnten über das HMBC abgesichert werden und stimmten mit dem Bindungsmuster des Isomerengemisches **10a/b** überein. Während die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Daten des Zucker-Restes sowie des Sapogenin-Teils der Spinsysteme C-F nahezu identisch zugeordnet werden konnten, zeigten sich Unterschiede

bei den chemischen Verschiebungen in den Ringen A und B des Sapogenins. Zur Identifizierung dieser Spinsysteme und um eine genaue Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR-Resonanzsignale des Aglycons treffen zu können, wurden COSY- und HSQC- ebenso wie HMBC-Spektren herangezogen, deren wichtigsten Korrelationen in Abbildung 32 gezeigt sind.

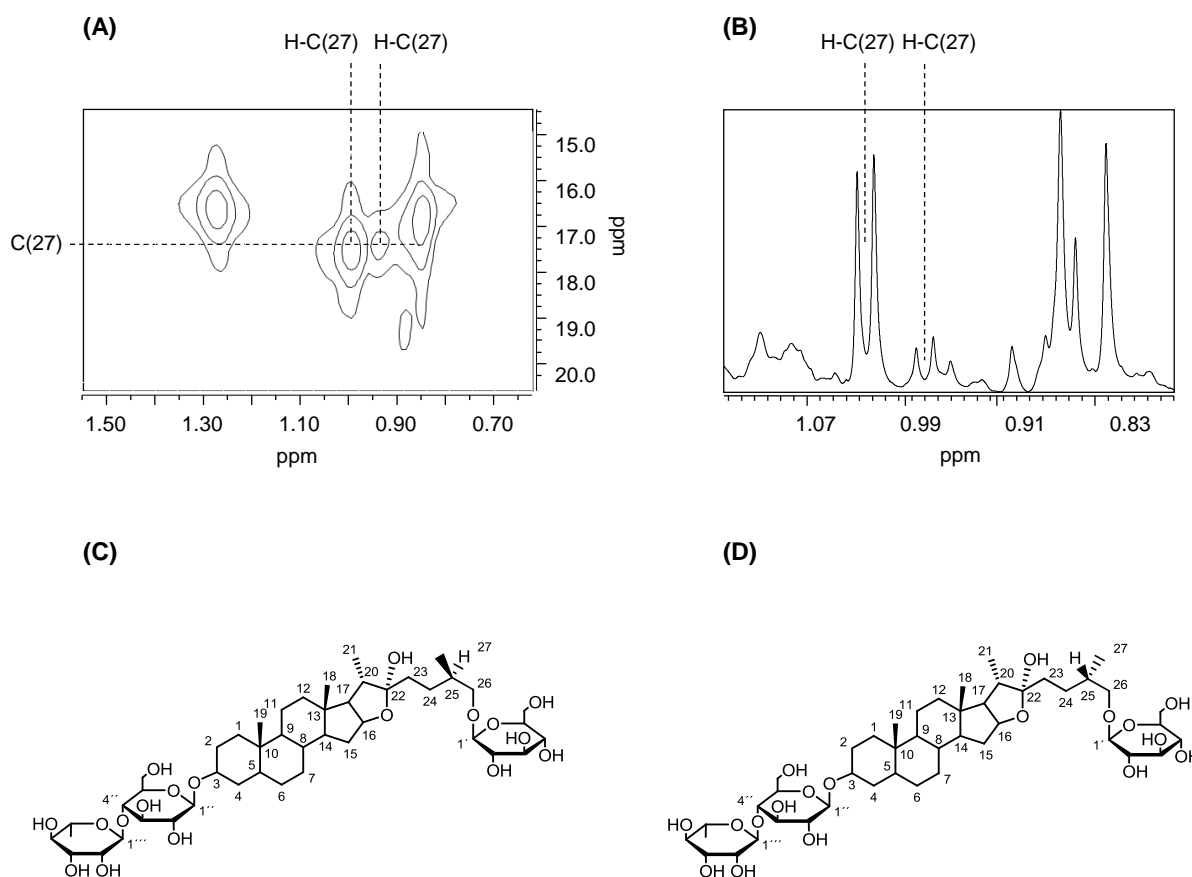


**Abbildung 32: Ausgewählte COSY- (A), HMBC- (B) und ROESY-Kopplungen (C) der Verbindung 13a/b.**

Abweichend zu **10a/b** konnte keine trisubstituierte Doppelbindung im B-Ring beobachtet werden. Die intensiven HMQC-Korrelationen zweier Protonen H-C(6) bei  $\delta_{\text{H}}$  1.01–1.12 ppm beziehungsweise  $\delta_{\text{H}}$  1.59–1.78 ppm zu C(6) bei  $\delta_{\text{C}}$  26.5 ppm bestätigen die Methylengruppe an Position C(6). Aufgrund der heteronuclearen Kopplungsmuster der Protonen von H-C(6) zu C(4), C(5), C(7), C(8) und C(10) im HMBC-Experiment sowie des Vergleichs mit den NMR-Daten von Sarsapogenin (Tabelle 21) konnte der B-Ring der Verbindung zugeordnet und die Sarsapogeninteilstruktur bestätigt werden. Weiterhin stimmten die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungen gut mit denen von Yoshikawa et al. (1997) für Trigoneosid IIa und Trigoneosid IIb gefundenen Verschiebungen überein.

Die Konfiguration des Aglycons wurde abschließend mittels eines ROESY-Experimentes, dessen Korrelationen in Abbildung 32 dargestellt sind, und Literaturdatenvergleich (Wang et al., 1997; Yoshikawa et al., 1997; Murakami et al., 2000; Agrawal, 2005; Yoshikawa et al., 2007) ermittelt. Analog zu den von Wang et al. (1997) identifizierten Epimeren 26-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl (25*R,S*)-5 $\alpha$ -furostane-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,26-triol-3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl(1-2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1-4)- $\beta$ -D-galactopyranosid konnte **13a/13b** auch an Position C(26) eine zweite chemische Verschiebung [ $\delta_{\text{C}}$  75.2 ppm und  $\delta_{\text{C}}$  75.3 ppm] zugeordnet werden. Entscheidend für die Anwesenheit eines (25*R,S*)-Epimerenpaares ist jedoch, wie bereits von Agrawal

(2005) ausführlich diskutiert, die typische Protonenverschiebung im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Signale von H-C(27) bei  $\delta_{\text{H}}$  0.95 ppm [d,  $J=6.6$  Hz] und bei  $\delta_{\text{H}}$  1.00 ppm [d,  $J=6.6$  Hz] (Abbildung 33, B). Ähnlich wie bei den Furostanol-Epimeren von Wang et al. (1997), korrelieren beide Dubletts [H-C(27)] im HMQC zu einem zusammenfallenden  $^{13}\text{C}$ -Signal bei  $\delta_{\text{C}}$  17.4 ppm (Abbildung 33, A).



**Abbildung 33: Ausschnitte aus dem HMQC- (A) und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (B) der Verbindungen (25R)-Dihydro-ASP-II (C) und (25S)-Dihydro-ASP-II (D).**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus der Fraktion III-C7 erstmals zwei bidesmosidische Furostanolsaponin-Isomere identifiziert wurden. Auch wenn diverse bidesmosidische Sarsapogeninglucoside wie z. B. aus den Früchten von *Tribulus Terrestris* (Wang et al., 1997) bekannt sind, war die Isomerenmischung aus (25R)-Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid ((25R)-Dihydro-ASP-II, **13a**) und (25S)-Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -

D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid ((25S)-Dihydro-ASP-II, **13b**) in der Literatur bis dato noch nicht zu finden (Abbildung 33).

### 3.2.2.6 HPLC/Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC/GVA) der Fraktion III–D

Zur molekularen Charakterisierung der Bitterstoffe in Fraktion III-D wurde eine RP-HPLC/GVA durchgeführt, bei der 13 verschiedene Fraktionen evaluiert wurden. Wie aus der Abbildung 34, in der die GV-Faktoren (rechte Seite) gegen das HPLC-Chromatogramm (linke Seite) aufgetragen sind, zu entnehmen ist, wurden dabei zwei bittere Fraktionen mit GV-Faktoren von 1024 (III-D4) und 128 (III-D5) detektiert, deren Inhaltsstoffe - wie im Folgenden beschrieben - identifiziert wurden.

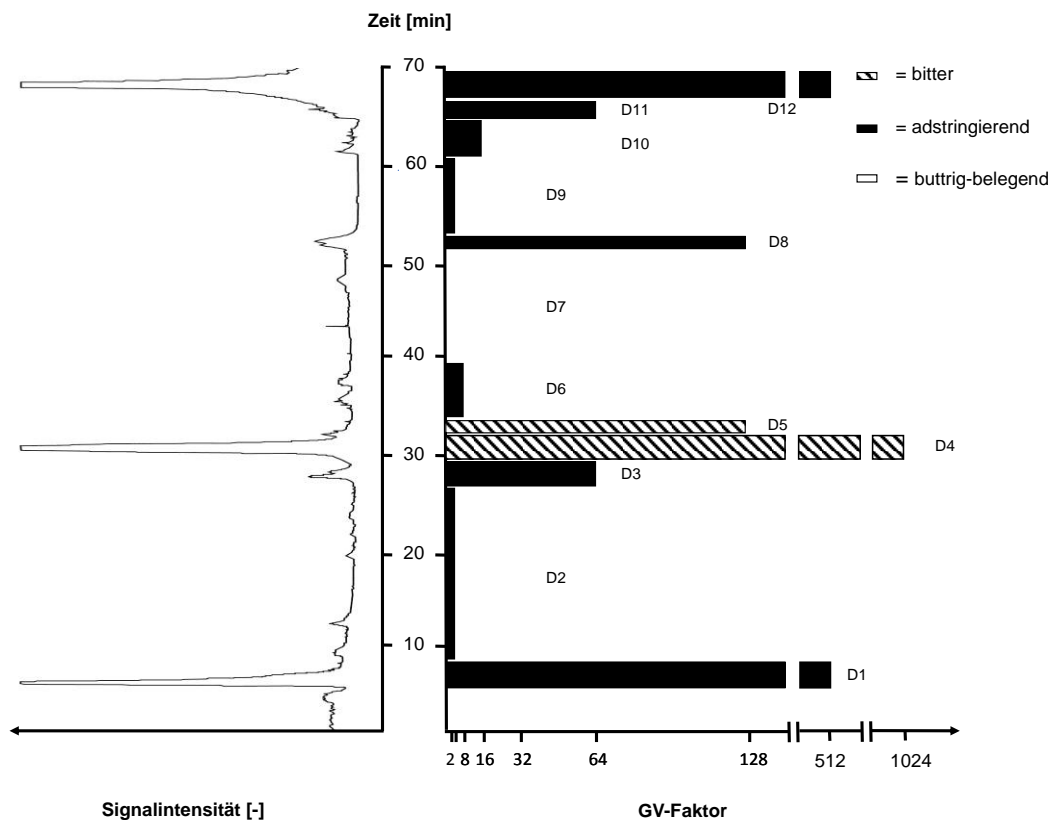


Abbildung 34: RP-HPLC Chromatogramm (linke Seite) und Geschmacksverdünnungsanalyse mit GV-Faktoren (rechte Seite) der Fraktion III-D.

## 3.2.2.7 Identifizierung der Verbindungen in der GV-Fraktion III-D4

Aus der Fraktion III-D4, die mit einem GV-Faktor von 1024 bewertet wurde, konnten die monodesmosidischen Saponine 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnosyryranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnosyryranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25*S*)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (AS-2-I, **14a**) und 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnosyryranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnosyryranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25*R*)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (Dioscin, **14b**) als Mischung isoliert und identifiziert werden. Bei der massenspektrometrischen Analyse (ESI<sup>+</sup>-Modus) der Fraktion III-D4 zeigte sich neben dem Pseudomolekülion [M+H]<sup>+</sup> bei *m/z* 869 auch das Kalium- [M+K]<sup>+</sup> bei *m/z* 907 und das Natriumadduktion [M+Na]<sup>+</sup> bei *m/z* 891. Von dem Quasimolekülion [M+H]<sup>+</sup> bei *m/z* 869 konnte außerdem das in Abbildung 35 dargestellte LC-MS/MS-Chromatogramm aufgenommen werden.

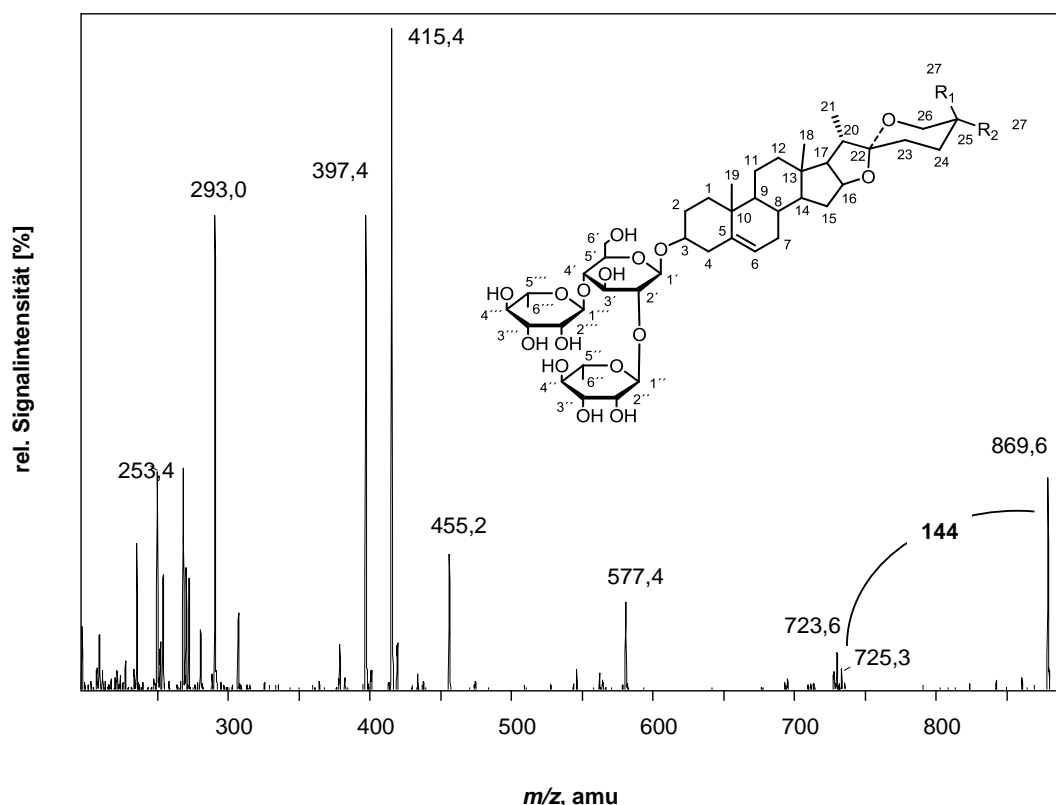
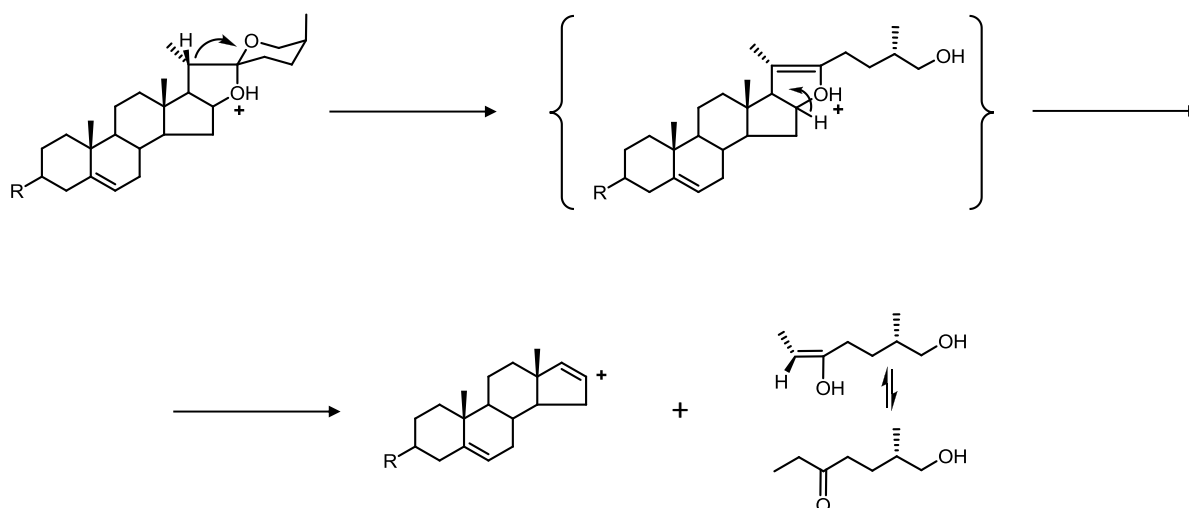


Abbildung 35: LC-MS/MS-Spektrum und Strukturen von **14a** ( $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$ ) und **14b** ( $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$ ).

Analog zu den Beobachtungen von Liang et al. (2002) wurde im positiven MS/MS-Spektrum ein Massenverlust von 144 Da beobachtet. Diese für monodesmosidische Saponine typische Massendifferenz ist auf die in Abbildung 36 dargestellte Eliminierungsreaktion zurückzuführen.



**Abbildung 36: Eliminierungsreaktion von AS-2-I mit dem Verlust von 144 Da (E-Ring Spaltung) nach Liang et al. (2002).**

Der zudem in MS/MS-Experimenten beobachtete Neutralverlust von 162 und  $2 \times 146$  Da ließ sowohl auf den Verlust von einer Hexose, als auch auf den zweier Desoxyhexosen schließen. Zur eindeutigen Identifizierung der Zucker wurde die Mischung **14a/b** sauer hydrolysiert und ionenchromatographisch untersucht. Der Vergleich mit Referenzsubstanzen zeigte, dass es sich bei den beiden Pentosen um Rhamnose und bei der Hexose um Glucose handelte.

Zur Absicherung der vorgeschlagenen Saponinstruktur aus Abbildung 35 und um molekulare Unterschiede zu den Verbindungen **5a/b** oder **10a/b** besser herausarbeiten zu können, wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente des intakten Saponins durchgeführt. Bereits der Zuckeringerprint im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum deutete darauf hin, dass die vorliegenden Verbindungen eine über das C(3) O-glycosidisch gebundene Chalcotriose besaßen. Die Signale der drei Zuckerreste fielen für beide Epimere sowohl im  $^1\text{H}$ - als auch im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zusammen. Das anomere Proton bei  $\delta_{\text{H}}$  4.86 ppm [H-C(1')] konnte der Glucose zugeschrieben werden und wies bedingt durch seine große Kopplungskonstante von  $J=7.6$  Hz eine  $\beta$ -Konfiguration auf. Weitere anomere Protonensignale bei  $\delta_{\text{H}}$  6.12 ppm [br. s,  $J=1.3$  Hz, H-C(1'')] und  $\delta_{\text{H}}$  5.71 ppm [br. s,  $J=1.2$  Hz, H-C(1''')] konnten den  $\alpha$ -konfigurierten Rhamno-

seeinheiten zugeordnet werden. Die identischen  $^3J$ -Kopplungen der anomeren Protonen im HMBC-Spektrum analog zu Verbindung **5a/b** bestätigte nicht nur die Verknüpfungen der Zucker untereinander, sondern auch die O-glycosidische Verknüpfung des Chalcotrioseresestes über Position C(3) zum Sapogenin.

Im Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrensätze mit Protodioscin (**5b**) wurde für die aus III-D4 isolierten Verbindungen ebenfalls eine Diosgenin/Yamogenin-Grundstruktur angenommen. Bei der Betrachtung des  $^1\text{H}$ -Spektrums fielen auch hier die freistehenden Protonenresonanzen der Methylgruppen H-C(18) [ $\delta_{\text{H}}$  0.76 ppm, s] und H-C(19) [ $\delta_{\text{H}}$  0.99 ppm, s] sowie das Multiplett des olefinischen Protons an Position H-C(6) bei  $\delta_{\text{H}}$  5.23–5.29 ppm auf. Besonders die trisubstituierte Doppelbindung mit dem tertiären ( $\delta_{\text{C}}$  121.9 ppm) und dem quartären ( $\delta_{\text{C}}$  140.9 ppm) Signal konnten analog zu der Diosgeninleitstruktur der Saponine **5a/b** ausfindig gemacht werden.

Während die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Sapogeninteils der Spinnssysteme A–D nahezu identisch zugeordnet wurden, zeigten sich Unterschiede in den Spinnssystemen E und F. Im Unterschied zu dem NMR-Spektrensatz der bidesmosidischen Saponine **5a/b** ging aus dem der monodesmosidischen Saponine **14a/b** hervor, dass hier keine Furostanol-, sondern eine Spiroketal-Form mit einem geschlossenen F-Ring vorlag. Besonders aus dem HMBC-Konturdiagramm konnte analog zu dem Diosgenin-Vergleichsspektrum und zur Literatur (Puri et al., 1993) die zusätzliche charakteristische vier-Bindungs-Korrelation [ $^4J(\text{C},\text{H})$ ] zwischen den axialen Protonen bei H-C(26) des F-Rings und dem Kohlenstoffatom C(20) des E-Rings über das Heterosauerstoffatom des Monodesmosides herausgelesen werden (Abbildung 37).

Die Konfiguration der Methylgruppe C(27) an Position C(25) wurde abschließend mit Hilfe von Literaturdatenvergleichen der chemischen Verschiebungen im E- und F-Ring erbracht (Agrawal et al., 1985; Agrawal et al., 1995; Shimoyamada et al., 1996; Yoon und Kim, 2008). Mit Hilfe der Ausführungen von Yoshikawa et al. (2007) gelang es zudem, die Konfiguration an Position C(22) gemäß eines 22- $\alpha$ -O-Spirostanols zu identifizieren.

Unter Einbezug aller spektroskopisch gewonnenen Erkenntnisse und Vergleich mit Literaturdaten (Shimoyamada et al., 1996 und 2003; Yoshikawa et al., 2007) wurde die geschmacksaktive Substanzmischung in Subfraktion III-D4 eindeutig als 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25S)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (**AS-2-I**, **14a**) und 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (Dioscin, **14b**) (Abbildung 35) identifiziert.

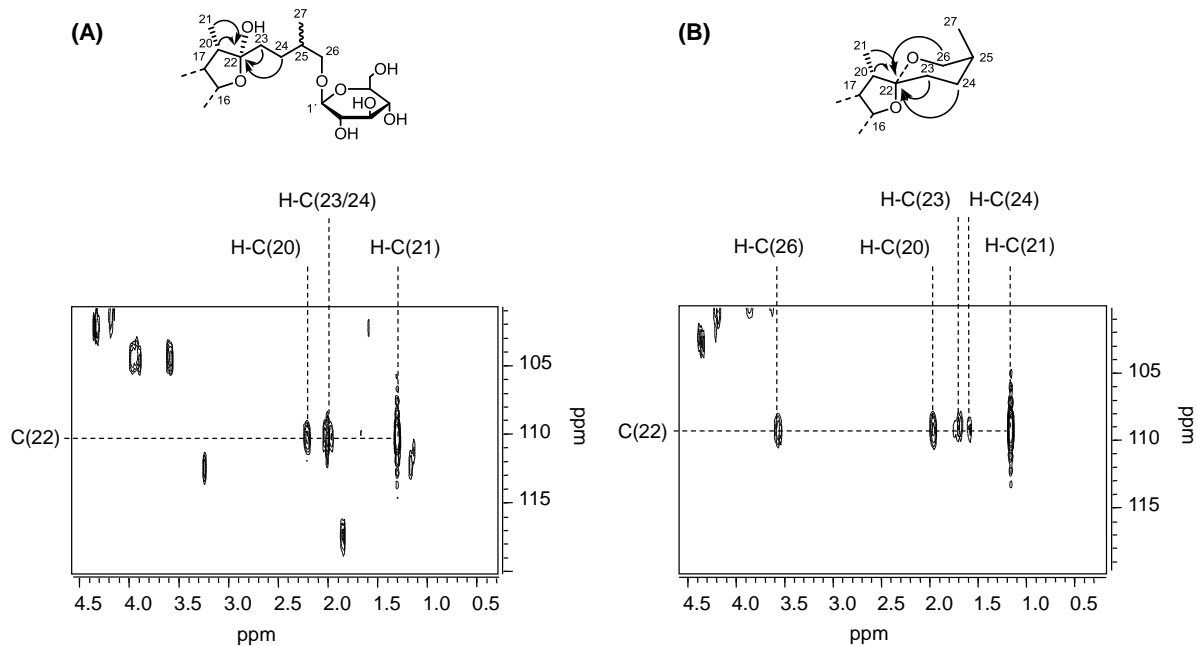


Abbildung 37: Ausschnitte der HMBC-Spektren von 5a/b (A) und AS-2-I (14a) (B).

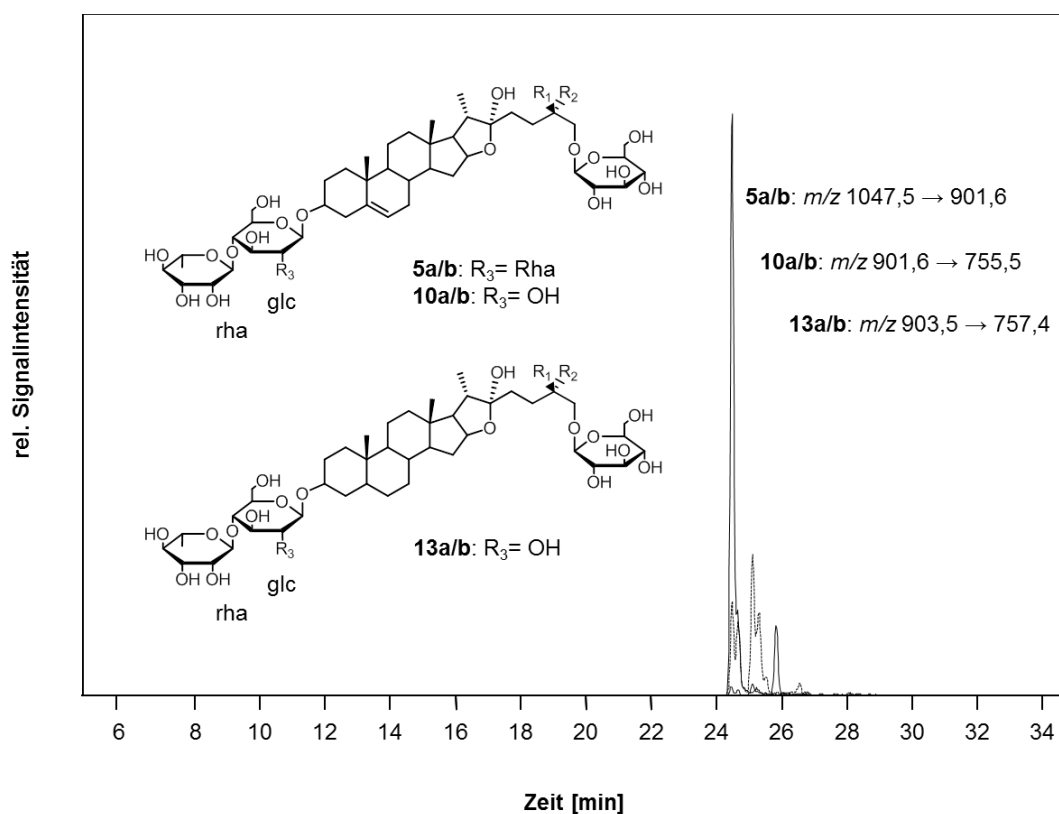
Obwohl Shimoyamada et al. (1996) AS-2-I (**14a**) erstmals aus den unteren Spargelteilstücken, den so genannten „bottom cuts“, gewinnen konnten, ist das Epimer Dioscin (**14b**) bisher hauptsächlich in anderen Pflanzen wie z. B. in der Familie der *Dioscorea* beschrieben worden (Yoon und Kim, 2008). Über die Bitterkeit dieser Substanzmischung ist bis dato in der Literatur noch nichts geschrieben.

### 3.2.3 Lokalisierung und Identifizierung geschmacksaktiver Substanzen in Fraktion IV

Die Geschmacksprofilanalyse des Wasserextraktes (Fraktion IV) des rohen Spargels zeigte einen hohen bitteren Geschmackseindruck (vgl. 3.2.1). Um einen ersten Eindruck in die chemische Zusammensetzung dieser Fraktion zu erhalten, wurden die bisher identifizierten Bitterstoffe **5a/b**, **10a/b**, **13a/b** und **14a/b** mittels HPLC-MS/MS im negativen MRM-Modus in dieser Fraktion analysiert. Um eine hohe Selektivität und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis während des MRM-Experimentes auszunutzen, wurden dazu die Fragmentierungsparameter aller Analyten nach direkter Infusion computergesteuert optimiert. Sowohl



die analytisch-spezifischen Massenübergänge als auch alle weiteren Methodenparameter sind unter 3.4 und 5.5.1.1.2 zu finden und stimmen mit den Parametern der quantitativen Analyse-methode überein. Wie aus dem Chromatogramm in Abbildung 38 zu sehen ist, wurden die Isomerenmischungen von **5a/b**, **10a/b** und **13a/b** der Ethylacetatfraktion (Fraktion III) auch in der wässrigen Phase (Fraktion IV) des rohen Spargels detektiert.



**Abbildung 38:** LC-MS/MS-Analyse der Fraktion IV und Signalspuren der Massenübergänge 1047,5 $\rightarrow$ 901,6 (**5a/b**), 901,6 $\rightarrow$ 755,5 (**10a/b**) und 903,5 $\rightarrow$ 757,4 (**13a/b**).

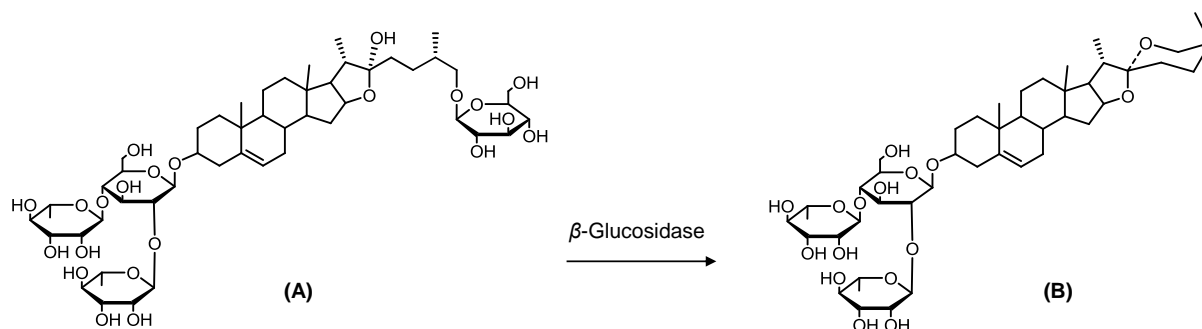
Neben den charakteristischen Massenübergängen und einem Retentionszeitenvergleich dienten bei dieser Screeningmethode auch Spikingexperimente mit Reinsubstanzen zur Identifizierung der Geschmacksstoffe. Folglich verteilten sich die bidesmosidischen Saponine **5a/b**, **10a/b** und **13a/b** während des Ausschüttelns (vgl. 3.2) sowohl in der wässrigen als auch in der Ethylacetat-Phase. Das Fehlen der monodesmosidischen Saponine **14a/b** in der wässrigen Phase lässt sich zum einen auf die Polarität und zum anderen auf die unterschiedlichen Grenzflächenaktivitäten von mono- beziehungsweise bidesmosidischen

Saponinen zurückführen. In ihrem Übersichtsbuch stellen Hostettmann und Marston (1995) heraus, dass besonders bidesmosidische Saponine mit längeren Zuckerseitenketten tendenziell grenzflächenaktiver als kurzkettige oder monodesmosidische Saponine sind. Außerdem ist das Epimer aus **14a** und **b** wesentlich unpolarer als die bidesmosidischen Saponine, so dass deren Abwesenheit in der polaren Wasserfraktion eine logische Schlussfolgerung darstellte.

### **3.2.4 Lokalisierung, Identifizierung und Synthese von Bitterstoffen und Saponinen aus weiteren Pflanzenteilen von *Asparagus officinalis* L.**

Die Lokalisierungen und Identifizierungen von Bitterstoffen in weißen Spargelstangen, die in den vorangegangenen Kapiteln der Arbeit aufgeführt sind, ergänzen Aussagen aus der Fachliteratur, insbesondere dass Saponine zur Bittere des Stangengemüses beitragen (Kawano et al., 1975, 1977; Brueckner et al., 2010). Weiterhin lag die Vermutung nahe, dass sich die sporadisch auftretende Fehlbittheit von Spargelstangen ebenfalls auf Saponine zurückführen lässt (Schwarzbach, 2004). In der Literatur wird unter anderem diskutiert, dass bidesmosidische Pflanzensaponine als Zucker-Transportmodifikation in der Pflanze vorliegen, die durch saure oder enzymatische Hydrolyse in die fungizide monodesmosidische Form überführbar sind (Hostettmann und Marston, 1995; Suhr, 2001; Shimoyamada et al., 2003). Shimoyamada et al. (1996 und 2003) testeten beispielsweise Saponinfraktionen aus Spargel unter anderem wirksam gegen *Candida albicans* und einige Spezies an *Microsporum*, *Epidermophyton* und *Trichophyton*. Neben dem Monodesmosid AS-1 (**15**) zeigte dabei, insbesondere das bittere Saponin AS-2-I (**14a/b**) breite fungizide Eigenschaften. Weiterhin hebt die Autorengruppe um Shimoyamada die Bedeutung der Bildung von Monodesmosiden wie AS-2-1 aus AS-P2-I (Abbildung 39) und deren zentrale Rolle bei der Verteidigung der Pflanze gegen Stressbedingungen durch Pilzbefall hervor.

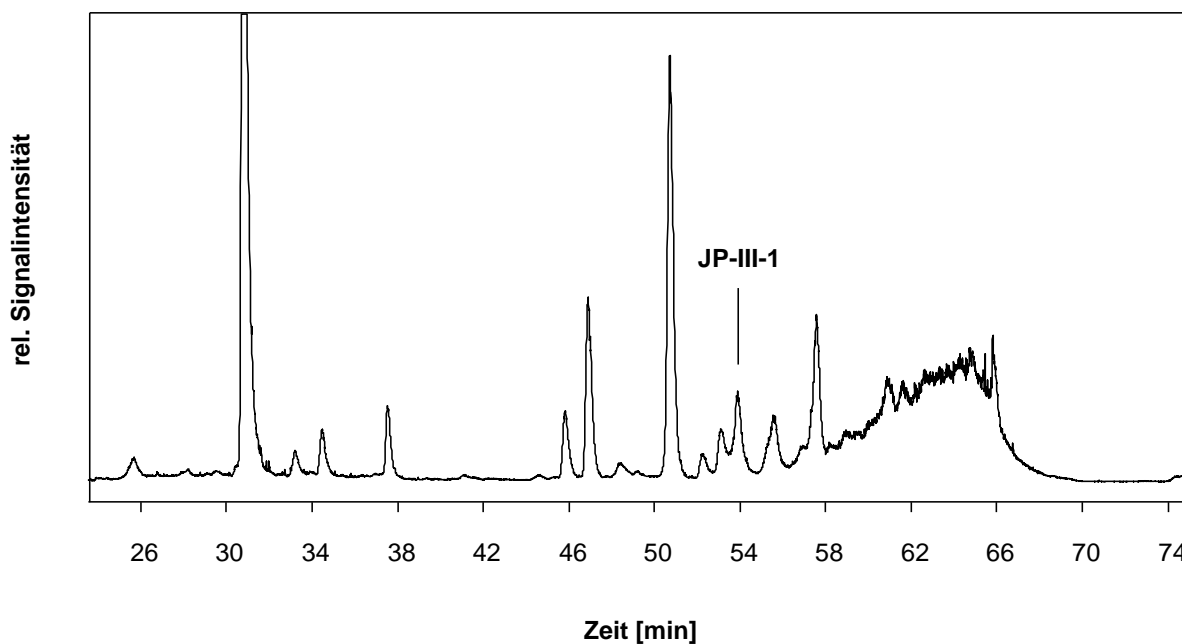
Im Folgenden sollten vor allem monodesmosidische, strukturell bekannte Spargelsaponine aus weiteren Pflanzenteilstücken isoliert und synthetisch generiert werden, um diese abschließend sensorisch zu beurteilen.



**Abbildung 39: Enzymatischer Abbau des bidesmosidischen Saponins AS-P2-I (A) zu dem monodesmosidischen Saponin AS-2-I (B) nach Shimoyamada et al. (2003).**

#### 3.2.4.1 Isolierung und Identifizierung von Bitterstoffen in Spargeljungpflanzen

Da in der Vergangenheit monodesmosidische Saponine insbesondere aus Spargeljungpflanzen (*Asparagus officinalis* L.) isoliert und identifiziert wurden (Huang und Kong, 2006; Huang et al., 2008), fiel die Wahl zur Charakterisierung weiterer Zielsubstanzen ebenfalls auf dieses Material. Um ausreichende Mengen zu isolieren, wurden im Folgenden Methanol/Wasser-Extrakte aus 50 kg gewaschenen Jungpflanzen gewonnen und, analog zu der Aufarbeitung der Extrakte der Spargelstangen aus 3.2, mittels Lösungsmitteln steigender Polarität vorge trennt. Dazu wurden die Methanol/Wasser-Extrakte einrotiert, mit Milliporewasser (Fraktion JP-IV) aufgenommen und nacheinander mit jeweils Pentan (Fraktion JP-I), Dichlormethan (Fraktion JP-II) und Ethylacetat (Fraktion JP-III) im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die einzelnen abgetrennten Phasen wurden jeweils einrotiert, eingefroren und gefriergetrocknet. Die Ausbeuten der einzelnen Extraktionsrückstände wurden gravimetrisch wie folgt bestimmt: Fraktion JP-I (Ausbeute: 8,7%), Fraktion JP-II (Ausbeute: 0,7%), Fraktion JP-III (Ausbeute: 1,9%) und Fraktion JP-IV (Ausbeute: 88,7%). Da die Arbeiten von Huang et al. (2006 und 2008) grenzflächenaktive Saponine in der Ethylacetatfraktion vermuten ließen, wurde Fraktion JP-III präparativ mittels HPLC-ELSD subfraktioniert. Die erhaltene Reinsubstanz aus Fraktion JP-III-1 (Abbildung 40) wurde mittels saurer Hydrolyse, LC-MS/MS, LC-TOF/MS und NMR-Analysen wie im Folgenden beschrieben identifiziert und anschließend für sensorische Tests sowie für LC-MS/MS-Screening-Versuche verwendet.



**Abbildung 40: Analytisches RP-HPLC-Chromatogramm des Jungpflanzen-Ethylacetatextraktes JP-III-1.**

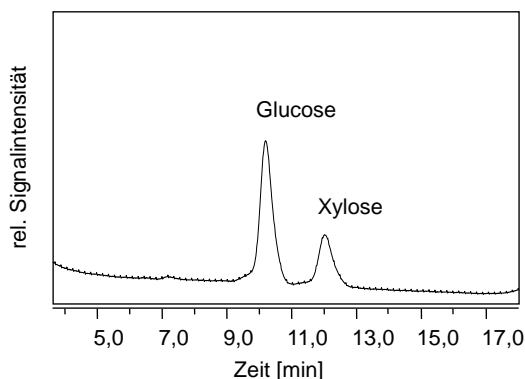
#### **Identifizierung des Saponins in Fraktion JP-III-1**

Obwohl mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und 2D-NMR Spektroskopie zu erkennen war, dass die Subfraktion JP-III-1 aus mindestens zwei monodesmosidischen Saponinen bestand, gelang es, das mengenmäßig dominierende Derivat als 3-O-[[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)] $\beta$ -D-glucopyranosyl] (25S),5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -ol (AS-1, **15**) zu identifizieren. Da zum einen die LC-TOF-MS-Analyse der Substanz **15** ein Pseudomolekülion  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , bei  $m/z$  871.4733 erbrachte und zum anderen aus den 1D- und 2D-NMR-Spektrensätzen 72 Protonen und 44 Kohlenstoffatome herausgelesen werden konnten, wurde auf eine empirische Formel von  $[\text{C}_{44}\text{H}_{72}\text{O}_{17}]$  geschlossen.

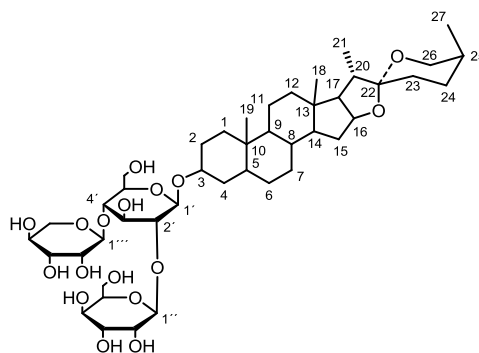
Das  $^1\text{H}$ -NMR-Übersichtsspektrum zeigte neben dem für Steroide charakteristischen Protonenfingerprint im Hochfeld zwischen  $\delta_{\text{H}}$  0.83 und 2.17 ppm auch einen zuckertypischen Bereich im tieferen Feld zwischen  $\delta_{\text{H}}$  3.56–4.49 ppm. Die drei anomeren  $\beta$ -konfigurierten Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  4.78 ppm [d,  $J=7.6$  Hz, H-C(1')], 4.96 ppm [d,  $J=7.6$  Hz, H-C(1'')] und 5.35 ppm [d,  $J=7.6$  Hz, H-C(1''')] der drei Zuckerreste konnten ebenfalls in dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum detektiert werden. Zur Identifizierung der Zuckerbausteine wurde Verbindung **15** zusätzlich sauer hydrolysiert und anschließend via HPIC und amperometrischer Detektion analysiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden Glucose und Xylose im Verhältnis 2:1 detektiert

(Abbildung 41). Damit die intramolekularen glykosidischen Verknüpfungen weiter aufgeklärt werden konnten, wurden die long-range Kopplungen aus dem HMBC-Spektrum ermittelt. Die  $^3J_{C,H}$ -Korrelation des anomeren Protons bei  $\delta_H$  4.78 ppm [d, 1H,  $J=7.6$  Hz, H-C(1'')] zum C(3) des Aglycons ließ auf die 3-O-glycosidische Zuckerverknüpfung zum Aglycon schließen.

(A)



(B)



**Abbildung 41: HPIC-Chromatogramm (A) von AS-1 (15, B) nach saurer Hydrolyse.**

Die heteronuklearen Kopplungen von H-C(1'') bei  $\delta_H$  5.35 ppm zum C(2') bei  $\delta_C$  81.0 ppm sowie von H-C(1''') bei  $\delta_H$  4.96 ppm zum C(4') bei  $\delta_C$  80.3 ppm bestätigten die identische Zuckerverknüpfung wie bei dem monodesmosidischen Saponin AS-1. Die  $^{13}C$ -NMR-Resonanzen des Steroidkerns stimmten ebenfalls gut mit mit der Struktur von AS-1 (15) überein, das erstmals von Shimoyamada et al. (1990) aus den unteren Spargelteilstücken, den so genannten „bottom cuts“ gewonnen worden war, sodass die Sarsapogeninteilstruktur bestätigt wurde. Die in den Publikationen von Shimoyamada et al. (1990, 2003) fehlenden  $^1H$ -NMR-Daten wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit erstmals vervollständigt. Zur Identifizierung der Spinsysteme und der Zuordnung der  $^1H$ -NMR-Resonanzsignale des Aglycons wurden insbesondere die COSY- und HMBC-Spektren herangezogen. Analog zu den Verbindungen **13a/b** konnte im B-Ring ebenfalls keine trisubstituierte Doppelbindung an Position  $\Delta^6$  auffindig gemacht werden. Aufgrund des NMR-Datenvergleiches mit anderen Spirostansaponinen wurden die Spinsysteme A–F eindeutig als Sarsapogenin (**11**) Aglycon identifiziert (Agrawal et al., 1995; Shimoyamada et al., 1990; Agrawal, 2003; Zhang et al., 2004; Sautour et al., 2007).

Anhand der aufgeführten spektroskopischen Daten konnte das aus dem Ethylacetatextrakt von Spargeljungpflanzen isolierte monodesmosidische Saponin als 3-O-[[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)][ $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]  $\beta$ -D-glucopyranosyl] (25S),5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -ol (AS-1, **15**) identifiziert werden. Neben den Arbeiten von Shimoyamada et al. (1990, 2003) beschreiben auch Sautour et al. (2007), dass sie AS-1 aus einem Vertreter der Asparagaceae (*Asparagus acutifolius* L.) isolieren konnten.

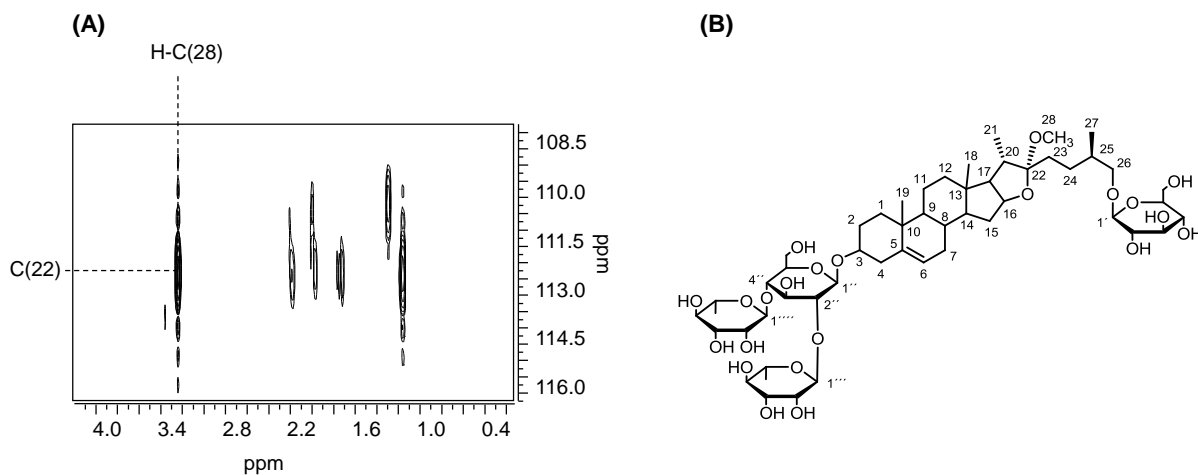
### 3.2.4.2 Generierung von Methylprotodioscin

In der Literatur sind widersprüchliche Aussagen über die Anwesenheit von Methylprotodioscin in Spargel zu finden. Einerseits berichten Shao et al. (1997), dass sie neben Protodioscin auch Methylprotodioscin in Spargelsamen fanden, andererseits vermerkten Wang et al. (2003), dass das Methylprotodioscin nur bei einer Aufarbeitung mit Methanol bei Erhitzung unter Rückfluss auftritt. Um die Literatursagen zu überprüfen beziehungsweise um die bei dieser Arbeit gewählte kalte Methanolaufarbeitung bewerten zu können, wurde käuflich erworbenes Protodioscin unter Rückfluss mit Methanol zu Methylprotodioscin in Anlehnung an Hu et al. (1997) umgesetzt.

Die LC/MS-Analyse des Syntheseproduktes im ESI<sup>+</sup>-Modus ergab ein dominierendes Quasimolekülion [M-MeOH+Na]<sup>+</sup> bei *m/z* 1053. Das MS/MS-Spektrum wies weiterhin Signale bei *m/z* 907 [M-MeOH-146+Na]<sup>+</sup> und bei *m/z* 761 [M-MeOH-2 $\times$ 146+Na]<sup>+</sup> auf. Im negativen Modus wurden dagegen das Quasimolekülion [M-H]<sup>-</sup> bei *m/z* 1061 und die Tochterfragmente bei [M-Glc-H]<sup>-</sup> *m/z* 899, [M-Rha-H]<sup>-</sup> *m/z* 915, [M-Glc-Rha-H]<sup>-</sup> *m/z* 753, [M-Rha-Rha-H]<sup>-</sup> *m/z* 769, [M-Glc-Rha-Rha-H]<sup>-</sup> *m/z* 915 und [M-Glc-Rha-Rha-Glc-H]<sup>-</sup> *m/z* 445 detektiert. Die Abspaltungen von zweimal 162 Da und zweimal 146 Da ausgehend vom Pseudomolekülion [M-H]<sup>-</sup> untermauerten sowohl die zwei Hexose- als auch die zwei Methylpentoseeinheiten. Die ungewöhnlich hohe Masse des Aglycons ließ darauf schließen, dass Protodioscin (**5a**) zu seinem Methoxyderivat Methylprotodioscin (**16**) umgesetzt wurde. Zur Verifizierung dieser Annahme wurden weitere NMR-Untersuchungen herangezogen.

Mit Hilfe der Informationen aus den <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und DEPT-NMR-Messungen konnten insgesamt 52 Kohlenstoffatome, die sich sieben Methyl-, zwölf Methylen- und 29 Methingruppen zuordnen ließen, identifiziert werden. Bei den verbleibenden vier Signalen im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum handelte es sich um quartäre Kohlenstoffatome. Während die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten der Chalcotriose-Einheit sowie des Sapogenin-Teils der Spinsysteme A–D nahezu identisch zu Protodioscin zugeordnet werden konnten, zeigten sich Unterschiede bei den chemischen Verschiebungen im E-Ring des Genins. Abweichend zu Protodioscin (**5a**) konn-

te ein zusätzliches Kohlenstoffatom bei  $\delta_C$  47.1 ppm [C(28)] ausfindig gemacht werden, dessen homonucleare Korrelation im HMQC dem Singulett bei  $\delta_H$  3.22 ppm [s, 3H, H-C(28)] zugeordnet werden konnte. Nicht nur die  $^3J(\text{COCH})$ -Fernkopplung von H-C(28) zu C(22) im HMBC-Konturdiagramm, sondern auch das stärker ins Tieffeld verschobene quartäre Kohlenstoffatom C(22) bei  $\delta_C$  112.5 ppm (Protodioscin: bei  $\delta_C$  110.5 ppm) bestätigte die zusätzliche Methoxygruppe der Verbindung (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Ausschnitt des HMBC-Spektrums (A) und Struktur (B) von Methylprotodioscin (16).**

Auf der Basis von LC-MS, 1D- und 2D-NMR-Daten gelang es, das Methoxyderivat von Protodioscin (**5a**) Methylprotodioscin (**16**) (Abbildung 42), das bereits 1997 von Shao et al. aus Spargelsamen isoliert und identifiziert wurde, spektroskopisch zu charakterisieren. Darüber hinaus stimmen die ermittelten  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungen gut mit den Literaturdaten von der Arbeitsgruppe um Shao überein. Im Folgenden sollte mit Hilfe des hergestellten Methylprotodioscins geprüft werden, ob Verbindung Nummer **16** auch in den essbaren Spargelstangen vorkommt und einen geschmacklichen Beitrag leistet. Humansensorische Studien sollten zudem die Bedeutung der Methoxygruppe im Bezug auf die Bitterkeit bidesmosidischer Asparagussaponine näher charakterisieren.

### 3.2.5 Analytischer Nachweis von Bitterstoffen und Saponinen in weißen Spargelstangen

Um das Vorkommen der isolierten beziehungsweise synthetisierten Saponine **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15** und **16** in unterschiedlichen Teilstücken des *Asparagus officinalis* L., insbesondere in den verzehrbaren weißen Stangen, zu verifizieren, wurden versucht, diese mit Hilfe eines LC-MS/MS-Systems im negativen MRM-Modus nachzuweisen. Weiterhin sollte das käuflich erworbene monodesmosidische Saponin  $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucosid (**17**), das von Huang und Kong (2006) aus Spargelwurzeln isoliert wurde, in den verschiedenen Spargelmatrices mit analysiert werden.

Dazu wurden die Proben homogenisiert, mit Acetonitril extrahiert, filtriert, aufkonzentriert und mittels HPLC-MS/MS analysiert. Ausgenutzt wurden dabei die hohe Selektivität und das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis des MRM-Experimentes, für das mittels direkter Infusion der Analyten die Fragmentierungsparameter computergesteuert optimiert wurden. Für das Screening wurden die Parameter der unter 3.4 und 5.5.1.1.2 beschriebenen, quantitativen Analysenmethode verwendet. Lediglich als Extraktionsmittel wurde Methanol durch Acetonitril ersetzt, da in der Literatur immer wieder die Umsetzung von Protodioscin in einem methanolischen Medium zu Methylprotodioscin beschrieben wird (z. B.: Wang et al., 2003). Neben den spezifischen Massenübergängen diente zudem die Cochromatographie als wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung der Bitterstoffe und Saponine in verschiedenen Spargelproben. Dennoch konnte mit diesem Verfahren keine eindeutige Aussage der Verteilung der Isomere und Epimere in den einzelnen Segmenten des Spargels getroffen werden. Zum einen wird in der Literatur postuliert, dass das Verhältnis von Saponinisomeren von den morphologischen Teilstücken sowie vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängt (Kawano et al., 1977; Hostettmann und Marston, 1995) und zum anderen gelang es nicht, die Isomerenmischungen chromatographisch aufzulösen. Folglich sind alle folgenden Angaben zum Vorkommen der isolierten Bitterstoffe beziehungsweise Saponine ohne deren Konfiguration zu betrachten.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen, wurden weiße Spargelstangen (22 cm), Jungpflanzen und Spargelsamen gleichermaßen analysiert.



**Tabelle 1: Analytischer Nachweis von Bitterstoffen und Saponinen in Spargelstangen, Jungpflanzen und Spargelsamen. Dabei stellt ein (X) den Positiv- und ein (–) den Negativnachweis dar.**

Analyt	Spargelsegment		
	Spargelstangen <sup>a</sup>	Jungpflanzen <sup>a</sup>	Spargelsamen <sup>b</sup>
<b>5a/b</b>	X	X	X
<b>10a/b</b>	X	X	X
<b>13a/b</b>	X	X	X
<b>14a/b</b>	X	X	X
<b>15</b>	X	X	X
<b>16</b>	–	–	X
<b>17</b>	–	X	X

<sup>a</sup> Aufgearbeitet wurden 10 g/100 ml von denen 5µl in das LC-MS/MS-System injiziert wurden.

<sup>b</sup> Aufgearbeitet wurden 1 g/20 ml von denen 5µl in das LC-MS/MS-System injiziert wurden.

Mit Hilfe dieses Screeningexperimentes zeigte sich, dass in den weißen verzehrbaren Spargelstangen (A) insgesamt sechs der getesteten acht Verbindungen wiedergefunden werden konnten. Während der Nachweis der bereits aus den Stangen isolierten Saponine **5a/b**, **10a/b**, **13a/b** und **14a/b** nicht verwunderlich war, konnten darüber hinaus das monodesmosidische Sarsapogenin-Saponin AS-1 (**15**) erstmals in den Stangen des weißen Gemüses nachgewiesen werden.

Obwohl die Verbindungen **5a** und **b** bisher aus den Samen und den Trieben von *Asparagus officinalis* L. durch Shao et al. (1996) und Kawano et al. (1977) isoliert wurden, zeigten bereits die massenspektrometrischen Untersuchungen von Schwarzbach (2004), Schwarzbach et al. (2006) und Wang et al. (2003), dass diese Substanzen auch in den Spargelstangen anzutreffen sein müssten. Aus den drei Literaturstellen ging zudem bereits hervor, dass die Anwesenheit von **10a/b** und **14a/b** in den Spargelstangen sehr wahrscheinlich war. Dennoch konnten erstmals mit Hilfe des selektiven MRM-Experimentes und der Cochromatographie die postulierten Saponinstrukturen untermauert werden. Zudem gelang es, neben den Verbindungen **13a/b** auch das aus den unteren Teilstücken bekannte Monodesmosid AS-1 (**15**) in den essbaren Regionen des Spargels zu finden.

Die Vermutung von Schwarzbach (2004), Methylprotodioscin (**16**) sei lediglich ein Aufarbeitungsartefakt während der Methanolextraktion der Saponine, wurde bestätigt. Jedenfalls konnte in den Konzentrationsbereichen, in denen die Acetonitrilextrakte der weißen Spargelstangen mittels LC-MS/MS analysiert wurden, dessen charakteristischer Massenübergang in den Stangen nicht beobachtet werden.

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, konnte in den Jungpflanzen, neben den fünf Verbindungen, die bereits in den Stangen ausfindig gemacht wurden, zusätzlich  $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucosid (**17**) identifiziert werden. Damit ist es erstmals gelungen zu zeigen, dass die Verbindungen **10a/b** und **14a/b** auch in den Jungpflanzen vorliegen. Die Anwesenheit von **5b**, **13b**, **15**, **17** in den Jungpflanzen war dagegen bereits bekannt (Kawano et al., 1975; Shimoyamada et al., 1990; Huang und Kong, 2006).

Der qualitative Nachweis von **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15**, **16**, und **17** in den Samen von *Asparagus officinalis* L. konnte ebenfalls zum ersten Mal erbracht werden (Tabelle 1). Lediglich Protodioscin (**5a**) und Methylprotodioscin (**16**) waren bis dato als Inhaltsstoffe der Spargelsamen bekannt (Shao et al., 1997).

### 3.3 Humansensorische Untersuchungen der Spargelinhaltsstoffe

Im Folgenden wurden zur Bewertung der sensorischen Qualitäten der isolierten und identifizierten Verbindungen psychophysikalische Experimente durchgeführt. Dabei wurden neben der geschmacklichen Qualität auch die Schwellenwerte der einzelnen Verbindungen evaluiert.

Die Degustation von 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\alpha$ -glucopyranoseester (**2**) und 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\beta$ -glucopyranoseester (**3**) erbrachte eine neue sensorische Empfindung, die im Konsens vom Panel als „buttrig-belegend“ definiert wurde. Diese als für Spargel typisch empfundene Mundfülle breitete sich langsam im Mundraum aus, belegte die Zunge und war vergleichbar mit dem psychophysikalischen Eindruck, den man beim auf der Zunge zergehen eines Butterstückes bekommt. Ferner gelang es, die Schwellenwerte der Mischung aus **2/3** mit Hilfe ihres Detektionsschwellenwertes zu charakterisieren. Der Schwellenwert wurde im „Half-Mouth“-Verfahren in mineralstoffarmem Wasser bei pH 5,9 evaluiert und betrug 276,8  $\mu\text{mol/l}$ .

Um die Rolle der Asparagussäure (**4**) im Hinblick auf die buttrig-belegende Qualität von **2/3** näher auszuarbeiten, wurde deren sensorische Qualität und deren Schwellenwert ebenfalls bei pH 5,9 in evaluiert. Es zeigte sich, dass das reine Aglycon nicht durch eine außergewöhnliche Mundfülle, sondern durch eine adstringierende Wirkung geprägt war. Ihr Schwellenwert lag bei 132,9  $\mu\text{mol/l}$ .

In weiteren psychophysikalischen Experimenten wurden die humansensorischen Schwellenwerte der identifizierten Bitterstoffe im Triangeltest in 2%-igen Ethanolösungen aufgenommen. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Bitterschwellenwerte der Verbindungen 5a/b, 10a/b, 13a/b, 14a/b, 15 und 16.**

Substanz (Nr.)	5a/b	10a/b	13a/b	14a/b	15	16
Bitterschwellenwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	65,9	10,9	25,5	70,6	199,7	82,3

Nicht nur für die mono-, sondern auch für die bidesmosidischen Saponine wurde ein bitterer Geschmack mit Schwellenwerten zwischen 10,9 und 199,7  $\mu\text{mol/l}$  detektiert. Die niedrigste Schwellenwertkonzentration wies dabei die Mischung aus ASP-II und seinem (25S)-Epimer (**10a/b**), zwei bidesmosidische Diosgenylsaponine mit drei Monosaccharidresten, auf. Obwohl Kewano et al. (1977) ASP-II als nicht bitter beschrieben, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Mischung aus **10a/b** nicht nur bitter schmeckt, sondern auch einen niedrigen Detektionsschwellenwert aufweist. Auch das Sarsapogenin-Analogum (**13a/b**) zu **10a/b**, das die gleichen Zuckerbausteine aufweist, erbrachte einen vergleichbar niedrigen Schwellenwert bei 25,5  $\mu\text{mol/l}$ . Da die Schwellenwerte von **5a/b** ebenso wie von **14a/b** sehr eng beieinander lagen, kann daraus geschlossen werden, dass die Glukose an Position C-26 eher eine untergeordnete Rolle für die Bitterwahrnehmung dieser Saponine und somit auch auf die Bindung an Bitterrezeptoren darstellte. Da **5a/b** ebenso wie sein Methoxy-Derivat (**16**) ähnliche Schwellenwertkonzentrationen aufwiesen, spielte die quartäre Hydroxygruppe an Position C-22 offensichtlich eher eine untergeordnete Rolle bei der Bitterdetektion von Spargelsaponinen.

Generell konnte mit Hilfe der Degustationsexperimente gezeigt werden, dass die Spargelsaponine bei denen an das C-3 eine Chalcotriose- oder 4-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid-Einheit vorliegt vergleichbar niedrige Schwellenwerte aufwiesen. Besonders

da das Monodesmosid **15**, bei dem eine Xylose im Molekül gebunden vorliegt, einen vergleichbar höheren Schwellenwert bei 199,7 µmol/l besaß.

### **3.4 Quantifizierung von Bitterstoffen in Spargel**

Nachdem sensorische Experimente wie die Geschmacksverdünnungsanalyse und Strukturidentifizierungen zeigten, dass Saponine zu der Bitterkeit des Spargels beitragen (vgl. Kapitel 3.2.2 bis 3.3), sollte anschließend deren Einfluss auf den Gesamtgeschmack ermittelt werden. Der Beitrag einer Einzelverbindung zum gesamten Geschmack des frischen beziehungsweise gekochten Spargels kann durch Bestimmung der „Dose-over-Threshold“ (DoT)-Faktoren (Scharbert und Hofmann, 2005) eingeschätzt werden. Definitionsgemäß hat danach jeder Geschmacksstoff in der Matrix eines Lebensmittels einen konzentrationsabhängigen Aktivitätswert, mit dem es gelingt, die Bedeutung der Geschmacksstoffe vergleichend zueinander zu gewichten. Der „Dose-over-Threshold“ (DoT)-Faktor ergibt sich als Quotient der Konzentration einer geschmacksaktiven Verbindung und der Konzentration dessen Geschmacksschwellenwertes. Folglich sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Quantifizierungsmethode zur Erfassung der Bitterstoffgehalte des Spargels entwickelt werden.

In der Literatur ist für die Analytik von Protodioscin eine Quantifizierungsmethode über externe Standardkalibrierung beschrieben, mit der sich das mengenmäßig dominierenden Saponin in Spargel mittels LC/MS quantifizieren lässt (Wang et al., 2003). Wang et al. (2003) fanden dabei Protodioscingehalte von 0,24 mg/100 g in den Spargelspitzen und 25 mg/100 g in den Endstücken des frischen Spargels.

Die quantitative Bestimmung weiterer aus dem Spargel bekannter Saponine ist mittels LC/MS-Verfahren noch nicht beschrieben worden.

#### **3.4.1 Entwicklung und Validierung einer Quantifizierungsmethode zur Bestimmung von Spargelsaponinen**

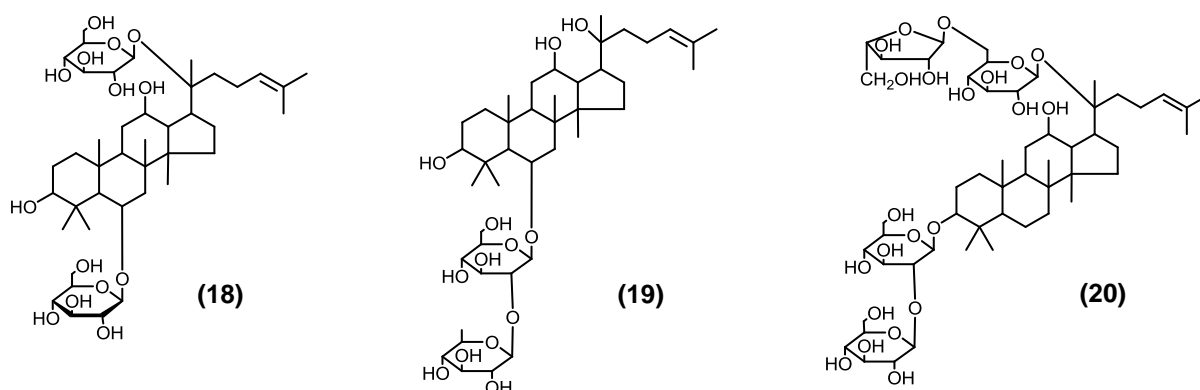
Zur quantitativen Erfassung der vorab beschriebenen Saponine (**5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15**, **17**) in verschiedenen Spargelproben wurde zunächst eine Quantifizierungsmethode auf Basis der Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie entwickelt. Um eine optimale Empfindlichkeit bei den LC-MS/MS-Messungen zu erreichen, wurden in einem ersten Schritt die Ionisierungsparameter der Sa-

poninfractionen **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15** und **17** im negativen Elektrospraymodus (ESI<sup>-</sup>) optimiert. Eine Übersicht über alle optimierten Parameter ist der Tabelle 14 zu entnehmen.

### **Optimierung der HPLC- und MS-Parameter zur Kalibrierung der Analyten**

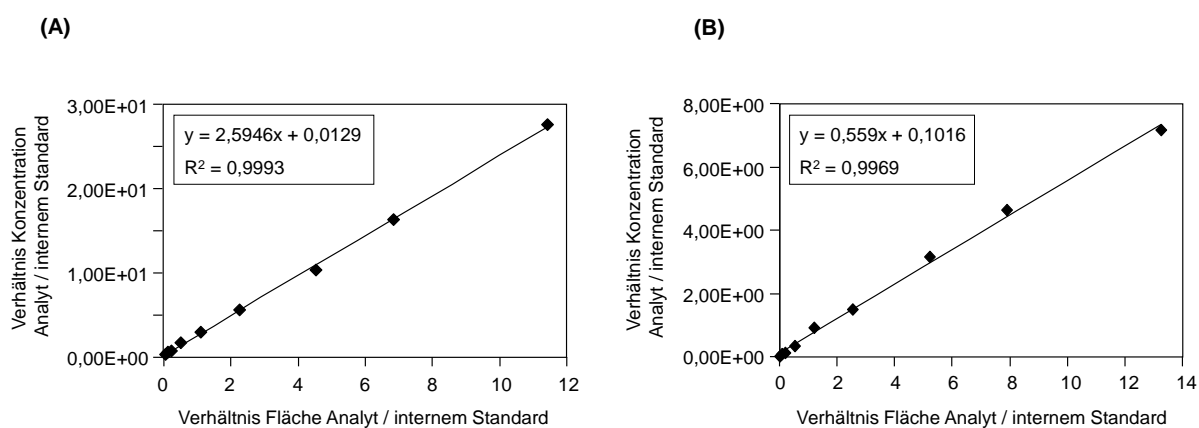
Für die Analyse der Saponine konnte die Methode, die für die HPLC-Trennung der Fraktion III-C verwendet wurde, in weiten Teilen übernommen werden. Erste Detektionen der Reinstoffen verdeutlichten, dass insbesondere die chromatographische Separierung der Mischungen **5a/b**, **10a/b** und **13a/b** von Bedeutung sind. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten sowie der geringen Massendifferenzen, wie sie bei diesen drei Verbindungen vorliegen, könnte es ansonsten zu einem „spectral overlap“ und damit zu einer Vortäuschung von Analyten kommen. Die erfolgreiche Trennung der Analyten ist auf einer RP-18-Säule mit einem Acetonitril/0,1%-Ameisensäure-Gradient gelungen. Studien mit unterschiedlichen Säuregehalten in der mobilen Phase haben zudem verdeutlicht, dass die Analyten bei Pufferzusammensetzungen mit mehr als 0,1% Ameisensäure bereits auf der Säule hydrolysieren.

Da Vorversuche mit isolierten Saponinen zeigten, dass während der Spargelextraktion Steroidglycoside unlöslich sedimentieren, jedoch keine isotope-markierten Standards zur Verfügung standen, wurden die Ginsengsaponine Ginsenosid Rg1 (**18**), Ginsenosid Rg2 (**19**) und Ginsenosid Rg (**20**) als interne Standards für eine Quantifizierung bitterer Spargelsaponine mittels HPLC-MS/MS-Analytik eingesetzt (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Strukturen der internen Standards: Ginsenosid Rg1 (18), Ginsenosid Rg2 (19) und Ginsenosid Rg (20).**

In Vorbereitung zur Bestimmung der quantitativen Daten wurden anschließend die Kalibrationskurven mit den internen Standards **18** für **5a/b**, **10a/b**, **13a/b** und **16**, **19** für **14a/b** sowie **20** für **15** und **17** aufgenommen und die linearen Regressionen berechnet. Dafür wurden Lösungen von Analyten und internen Standards im Verhältnis von 0,2:1 bis 10:1 gemischt und mittels LC-MS/MS analysiert. Beispielhaft sind in Abbildung 44 die Kalibrationsfunktionen von **5a/b** über **18** ebenso wie von **15** über **20** aufgeführt. Für alle analysierten Saponine waren die Responsegeraden in den gewählten Konzentrationsbereichen linear.



**Abbildung 44:** Kalibrationsfunktionen für die Mischung aus ACS-1/ASP-1 (5a/b, A) und AS-1 (15, B).

### **Optimierung der Probenaufarbeitung**

Nach Erstellen der LC-MS/MS Methode und bevor die Reproduzierbarkeit und Präzision der Methode untersucht werden konnte, musste eine geeignete Probenaufarbeitung entwickelt werden. Voraussetzung für eine ideale Quantifizierungsmethode ist immer eine vollständige und erschöpfende Extraktion der Analyten. Erste Versuche zeigten, dass bei dreimaliger Extraktion mit Methanol oder einem Gemisch aus Methanol/Wasser (70/30, v/v) alle Saponine erschöpfend extrahiert wurden. Dennoch erbrachten diese Isolierungsexperimente auch die Erkenntnis, dass insbesondere die Wahl des Lösungsmittels einen enormen Einfluss auf die Extrahierbarkeit und Stabilität der Saponine hatte. Besonders gut zeigte sich der negative Einfluss von Wasser im Extraktionsgemisch bei dem folgenden Versuch: Analog zueinander wurden Spargelproben eines Homogenisates einmal mit reinem Methanol und einmal mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser (70/30, v/v) aufgearbeitet. Nach 400 Minuten wurden alle 50 Minuten Aliquote der Proben an der LC-MS/MS injiziert und vermessen. Obwohl sich zu Beginn der Analyse in beiden Proben gleiche Saponingehalte finden ließen und die Bi-

desmosidkonzentration wie z. B. **5a/b** über die Zeit konstant blieb, nahm insbesondere die Menge des unpolaren, monodesmosidischen Saponins **14a/b** bei einer Aufarbeitung mit dem Methanol/Wasser-Gemisch über die Zeit ab (Abbildung 45). Folglich war davon auszugehen, dass die Monodesmoside dazu neigten, in einem Methanol/Wasser-Gemisch schneller auszufallen.

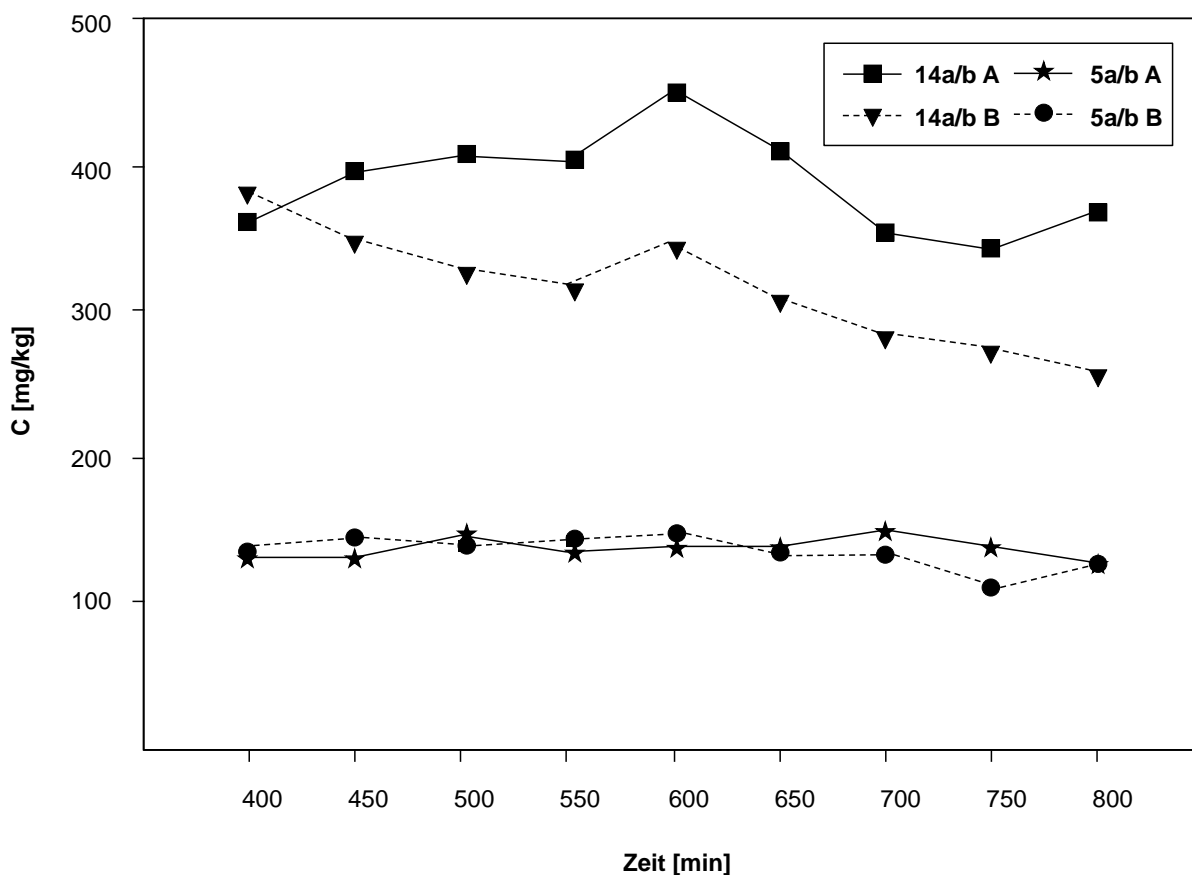
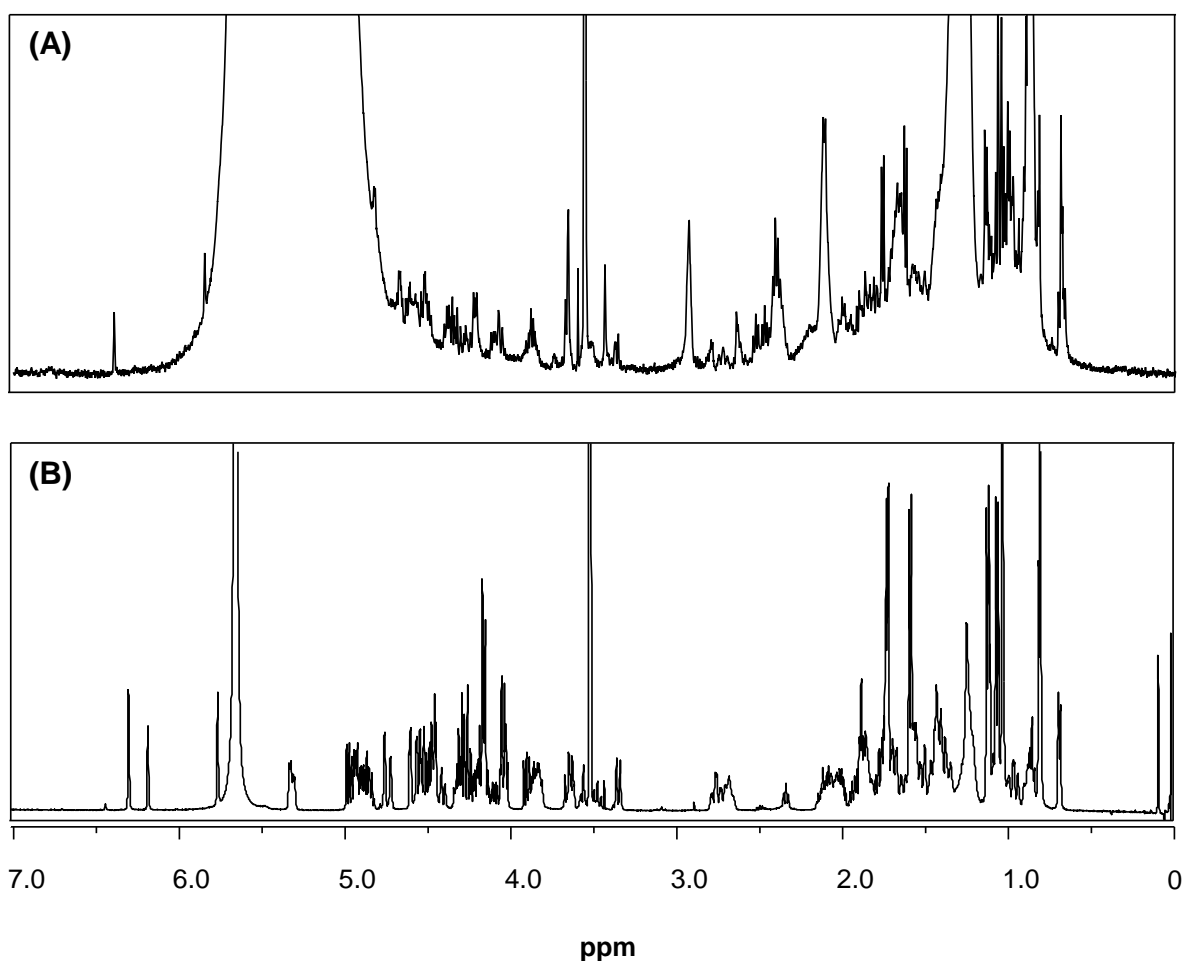


Abbildung 45: Konzentration von **5a/b** und **14a/b** in Methanol- (A) und Methanol/Wasser-Extrakten (B) bei 22 °C gelagert. Die Proben wurden nach 400 Minuten das erste Mal injiziert und dann alle weiteren 50 Minuten analysiert.

Nach insgesamt 24 Stunden Wartezeit wiesen alle Proben einen weißen Niederschlag auf. Da die Ausbeuten bei den Proben, die mit einem Methanol/Wasser-Gemisch aufgearbeitet wurden, um zirka das Hundertfache höher waren, wurde deren Sediment abfiltriert, gefrier-trocknet, in Pyridin- $d_5$  aufgenommen und anschließend mittels  $^1\text{H-NMR}$  analysiert. In Abbil-dung 29 ist unter A das Spektrum des Niederschlages und unter B das des monodesmosidi-

schen Saponinepipimers **14a/b** abgebildet. Es ist eindeutig zu erkennen, dass bei der zeitabhängigen Fällungsreaktion des Spargelextraktes unter anderem zu analysierende Saponine sedimentierten. Nicht nur der Protonenfingerprint des Zuckerrestes zwischen  $\delta_{\text{H}}$  3.5 und 5 ppm, sondern auch der charakteristische Steroid-Bereich zwischen  $\delta_{\text{H}}$  0.8 bis 2 ppm wurde im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Niederschlages wiedergefunden.

Folglich wurden, um Lösungsmittel- ebenso wie zeitlich bedingte Fällungsreaktionen, bei denen Saponine beteiligt sind zu vermeiden, alle zu quantifizierenden Spargelproben zum einen in Methanol aufgearbeitet und zum anderen direkt nach der Aufarbeitung in die Masse injiziert.

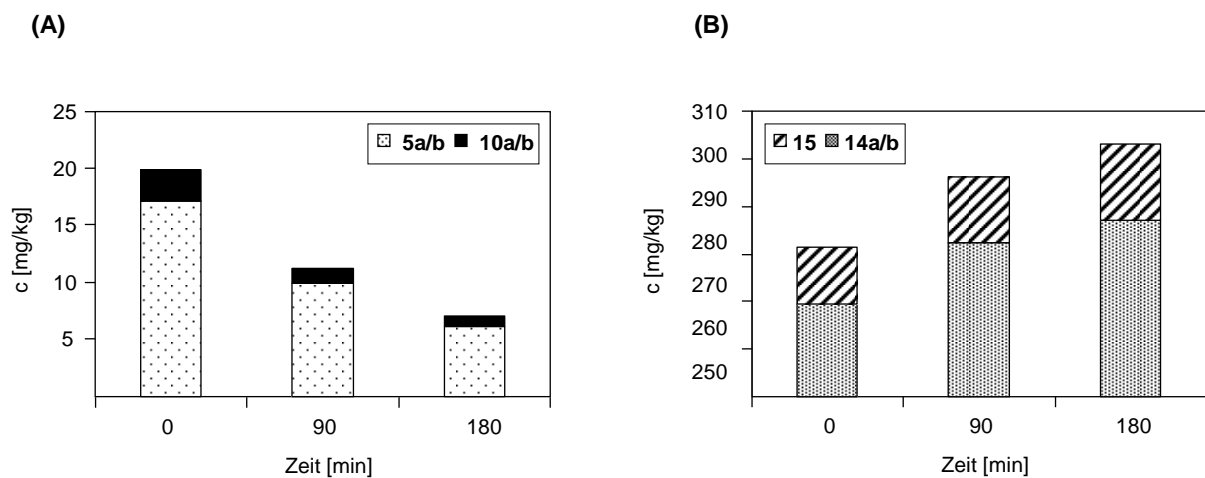


**Abbildung 46:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Niederschlages (A) und des monodesmosidischen Saponinepipimers Nr. 14a/b (B) in Pyridin- $\text{d}_5$ .

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Extraktion der Spargelproben direkt nach der Homogenisierung erfolgen sollte. Dazu wurde ein Spargelhomogenisat ange-



fertigt, aus dem nach 0, 90 und 180 Minuten je eine Probe in Doppelbestimmung aufgearbeitet wurde. Dabei zeigte sich, dass die identifizierten bidesmosidischen Saponine tendenziell abgebaut wurden, während die Konzentration der monodesmosidischen Saponine zunahm. Diese Trends waren insbesondere an den Saponinen **5a/b**, **10a/b** sowie **14a/b** und **15** zu erkennen (Abbildung 47). Da nach Vermischung der eingewogenen Probe mit Methanol, Stehenlassen sowie späterer Zudotierung des Standards und Aufarbeitung keine Zu- beziehungsweise Abnahmen der Saponine zu erkennen waren, ließ sich auf einen enzymatischen Abbau von bidesmosidischen Saponinen zu monodesmosidischen Saponinen schließen.



**Abbildung 47: Konzentrationen der bidesmosidischen Saponine 5a/b und 10a/b (A) sowie der monodesmosidischen Saponine 14a/b und 15 (B) in einer homogenisierten Spargelmasse nach 0, 90 und 180 Minuten Wartezeit bis zur Aufarbeitung.**

Um die Enzymaktivität des Spargels zu unterbinden war es folglich notwendig, die Spargelproben nach Zerkleinerung, Homogenisierung und Einwaage unverzüglich mit Methanol zu versetzen.

### **Optimierung der Probenentnahme**

Aus Untersuchungen von Schwarzbach et al. (2006) war bekannt, dass bei der Lagerung von weißen Spargelstangen bei  $-18\text{ °C}$  über 28 Wochen ein Verlust der Saponin-Gesamtkonzentration von 40% zu erwarten ist. Deshalb sollte der Einfluss der Gefrierschranklagerung auf den Saponingehalt des Bleichspargels beurteilt werden. Da der frische

mit dem gefrorenen Spargel sensorisch nicht vergleichend zueinander verkostet werden konnte, können geschmackliche Veränderungen während der Lagerung im Eisfach nicht objektiv beurteilt werden. Zum einen wirken texturale Veränderungen auf das sensorische Profil ein und zum anderen stehen nicht gleichzeitig gefrorene und frische Spargelstangen aus einer Charge für Unterschiedstests zur Verfügung. Jedoch wiesen gefrorene Spargelchargen generell einen weniger Spargel-typischen und bitteren Geschmack auf. Folglich wurden für alle weiteren Saponin-Quantifizierungsexperimente frische Spargelproben direkt analysiert.

### **Methodenvalidierung: Wiederholpräzision und Wiederfindung**

Nach Erstellen der LC-MS/MS-Methode und der Optimierung diverser Parameter sollte die Empfindlichkeit und Wiederfindung der Quantifizierungsmethode bestimmt werden. Die Wiederholpräzision der Methode wurde durch sechsfaches Aufarbeiten eines homogenisierten Spargelbatches und unter Berechnung des Variationskoeffizienten bestimmt. Wichtig war dabei, dass der rohe Spargel direkt nach der Homogenisierung eingewogen und mit Methanol überschichtet wurde, um einen Abbau der bidesmosidischen Saponine beziehungsweise einen mengenmäßigen Anstieg der monodesmosidischen Saponine zu unterbinden. Die Proben wurden anschließend, wie bereits beschrieben, zeitversetzt voneinander aufgearbeitet. Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, lagen die Variationskoeffizienten der einzelnen Saponine zwischen 2,9 und 16,4%.

**Tabelle 3: Bestimmung der Präzision von der Quantifizierung von Saponinen im Spargel.**

	Substanz (Nr.)					
	5a/b	10a/b	13a/b	14a/b	15	17
Präzision (%)	6,8	16,4	11,7	6,7	2,9	10,6

Zur weiteren Charakterisierung der Methodenparameter wurden beispielhaft die Wiederfindungsraten von einem monodesmosidischen (**15**) und einem bidesmosidischen Saponin (**5a/b**) in roher Spargelmatrix bestimmt. Da für Spargel keine analytfreie Matrix existierte, wurden zur Bestimmung der Wiederfindung rohem Spargel, mit einer bekannten Saponinmenge, die entsprechenden Saponine in definierten Konzentrationen zugesetzt. Nach Zudo-  
tierung der internen Standards wurden die Spargelmatrices, wie bereits beschrieben, aufge-

arbeitet, mittels HPLC-MS/MS analysiert und deren Wiederfindungsrate unter Berücksichtigung der ursprünglichen Konzentration berechnet. In Tabelle 4 sind die so erhaltenen Analysenwerte angegeben.

**Tabelle 4: Wiederfindungen der Saponine 5a/b und 15 bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus.**

<b>Analyt Nr.</b>	<b>Probenkonzentration [mg/kg] (Wiederfindung [%])</b>			
<b>5a/b</b>	20,18 (130)	39,67 (90)	67,53 (79)	118,95 (78)
<b>15</b>	19,22 (69)	28,82 (80)	34,74 (69)	57,12 (75)

Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 69 und 130%. Es ist nicht verwunderlich, dass die Wiederfindungsraten der Saponine **5a/b** und **15** bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus schlecht ausfielen. Eingehend beschriebene Sedimentierungsneigungen der Saponine können ebenso eine Rolle spielen, wie Interaktionen mit einer Vielzahl von reaktiven Verbindungen im Spargel. Neben einer physikalischen Adsorption können aber möglicherweise auch die grenzflächenaktiven Eigenschaften der Saponine einen Einfluss auf deren Extrahierbarkeit haben.

#### **Anwendung der entwickelten Methode**

Zur quantitativen Analyse der Spargelproben wurde deshalb folgende Aufarbeitung herangezogen: Homogenisierte frische Proben wurden unverzüglich mit Methanol überschichtet, mit den internen Standards 30 Minuten unter Rühren äquilibriert und anschließend dreimal mit Methanol extrahiert. Die so gewonnenen, vereinten Extrakte wurden eingeeengt und auf ein definiertes Volumen aufgefüllt, sodass Aliquote direkt in das LC-MS/MS-System injiziert wurden. In der Abbildung 48 sind die nach der Methodenentwicklung erhaltenen normierten Massenspuren der Standards sowie der Analyten, die aus der Spargel- beziehungsweise Jungpflanzenmatrix gewonnen wurden dargestellt.

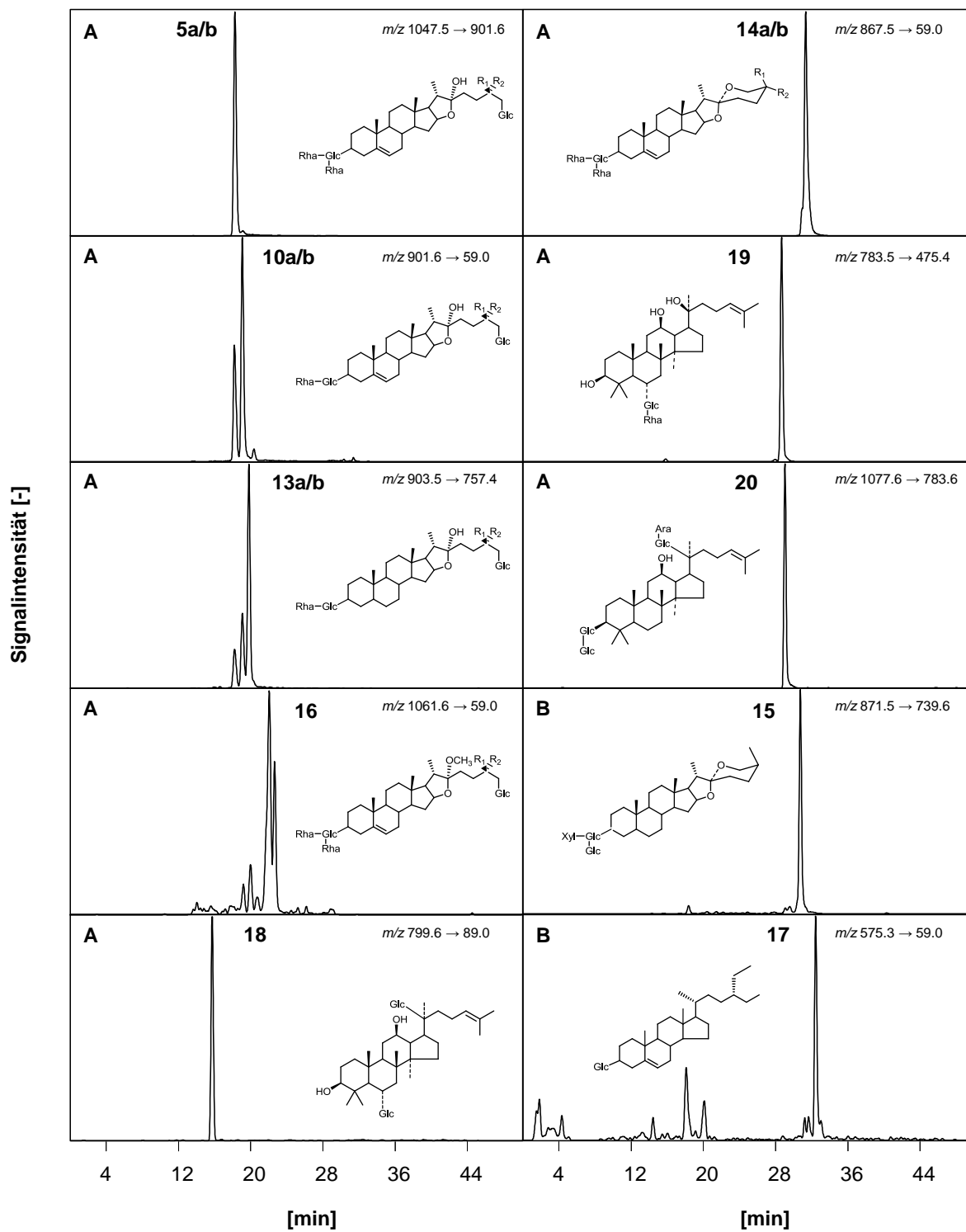


Abbildung 48: Extrahierte Massenspuren der Saponine aus den LC-MS/MS-Chromatogrammen von Spargelstangen (A) und Spargelsamen (B). Die Signalintensitäten der Massenübergänge sind normalisiert.

Alle identifizierten und unter Kapitel 3.2 beschriebenen Saponine (**5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15**, **17**) wurden auf diese Weise in verschiedenen Spargelproben mit der neu entwickelten LC-MS/MS-Methode und interner Standardkalibrierung in zahlreichen Handelsproben quantifiziert, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden. Dabei wurden die natürlichen Gehalte der (*R*, *S*)-Mischungen der identifizierten Saponine in der Summe durch Vergleich der Peakflächen des Analyten und des internen Standards bestimmt.

### 3.4.2 Quantifizierung und Bestimmung des Geschmacksbeitrags der Bitterstoffe in rohen und gekochten Spargelstangen sowie in Spargel-Kochwasser

Mit dem Ziel, den Beitrag, den einzelne Schlüsselgeschmacksstoffe im Hinblick auf die sensorische Qualität des rohen und des gekochten Spargels leisten, herauszustellen und geschmackliche Veränderung während des Kochprozesses mit Konzentrationsveränderungen einzelner geschmacksaktiver Inhaltsstoffe zu korrelieren, wurde mit der unter 3.4 vorgestellten Quantifizierungsmethode für die Bestimmung ausgewählter mono- beziehungsweise bidesmosidischer Spargelsaponine frischer, weißer Spargel im Einzelhandel käuflich erworben und roh sowie gekocht analysiert. Damit gekochter und roher Spargel vergleichend zueinander bestimmt werden konnte, wurden dafür die rohen Spargelstangen längs halbiert und getrennt voneinander aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben und zeigen deutlich, dass in rohen Spargelstangen die monodesmosidischen Saponine **14a/b** und **15** mengenmäßig mit Gehalten von 253,61 und 58,56  $\mu\text{mol/kg}$  dominierten, gefolgt von den Bidesmosiden **5a/b**, **10a/b** und **13a/b** mit Werten bis zu 8,43  $\mu\text{mol/kg}$ . Da eingangs durchgeführte sensorische Experimente gezeigt haben, dass auch polare Fraktionen wie die Wasserphase einen Bittergeschmack aufweisen (s. 3.2.1), sollte zusätzlich die Konzentration bitterer Mineralstoffe analysiert werden (van der Klaauw und Smith, 1995). Folglich wurden neben der Quantifizierung bitterer Saponine die Kaliumgehalte in den verschiedenen Spargelproben mittels Ionenchromatographie und einem Leitfähigkeitsdetektor bestimmt. Auffallend war der hohe Kaliumgehalt des rohen Spargels, der bei 36945,52  $\mu\text{mol/kg}$  lag.

**Tabelle 5: Gehalte [mg/kg] und DoT-Werte der Saponine 5a/b, 10a/b, 13a/b, 14a/b, 15 und von Kalium in rohen (A) und gekochten weißen Spargelstangen (B) sowie in deren Kochwasser (C).**

Analyt	Konzentration [ $\mu\text{mol/kg}$ ] und (DoT) in Spargelproben							
	A <sup>a</sup>		B <sup>a</sup>		B <sup>b</sup>		C <sup>a</sup>	
<b>5a/b</b>	8,43	(0,1)	77,10	(1,2)	92,76	(1,4)	28,24	(0,4)
<b>10a/b</b>	2,46	(0,2)	30,23	(2,8)	36,37	(3,3)	10,79	(0,9)
<b>13a/b</b>	1,04	(<0,1)	5,28	(0,2)	6,35	(0,2)	4,60	(0,2)
<b>14a/b</b>	253,61	(3,6)	18,14	(0,3)	21,83	(0,3)	1,64	(<0,1)
<b>15</b>	58,56	(0,3)	2,45	(<0,1)	2,94	(<0,1)	n.d.	(n.b.)
<b>Kalium<sup>c</sup></b>	36945,52	(0,8)	29499,49	(0,7)	24518,16	(0,6)	21182,04	(0,5)

<sup>a</sup>Konzentration [ $\mu\text{mol/kg}$ ] bezogen auf frischen Spargel; <sup>b</sup>Konzentration [ $\mu\text{mol/kg}$ ] bezogen auf gekochten Spargel; <sup>c</sup> Schwellenwert und DoT-Faktor bestimmt mit Kaliumsulfat; n. d. = nicht detektiert; n. b. = nicht bestimmt.

Ähnliche Protodioscingehalte (**5a**) wurden sowohl von Schwarzbach et al. (2006) bei 0,021 g/kg bis 0,166 g/kg (20,0  $\mu\text{mol/kg}$ –158,1  $\mu\text{mol/kg}$ ) sowie von Wang et al. (2003) in frischen weißen Spargelstangen ermittelt. Zudem ist es gelungen die mengenmäßig hohen Gehalte der Monodesmoside **14a/b** und **15** in den weißen rohen Spargelstangen herauszustellen.

Um eine Veränderung der Saponin-/Bitterstoffzusammensetzung während des Kochprozesses einschätzen zu können, wurden die jeweiligen Gehalte in  $\mu\text{mol/kg}$  des gekochten Spargels ebenso wie des Kochwassers auf den rohen Bleichspargel zurückgerechnet.

Es zeigte sich, dass der Gesamtsaponingehalt während des Kochens um 60% abnahm. Insbesondere die großen Mengen der monodesmosidischen Saponine **14a/b** und **15** konnten nach dem Kochen nicht wiedergefunden werden. Dagegen nahmen die Gehalte der Bidesmoside **5a/b**, **10a/b** und **13a/b** bis zu einer 12-fachen Menge zu.

Bereits in der Arbeit von Schwarzbach (2004) wurde eine Studie zur Thermostabilität von Saponinen vorgestellt. In der Dissertation konnte gezeigt werden, dass der Gesamtgehalt der Mono- und Bidesmoside insbesondere des AS-2-I (**14a/b**) eines Saponinextraktes während einer Erhitzungsperiode von 15 Minuten bei 100 °C sank. Dennoch beobachtete auch Schwarzbach (2004), analog zu den vorliegenden Ergebnissen, einen Anstieg von **5a/b** während des Kochprozesses.

Im Vergleich zu dem rohen und dem gekochten Spargel wurden im Kochwasser wesentlich geringere Saponingehalte wiedergefunden. Die monodesmosidischen Saponine **14a/b** und **15** erreichten lediglich Maximalgehalte von 1,64  $\mu\text{mol/kg}$ . Die während des Kochens gebildeten oder auch freigesetzten Bidesmoside wiesen vergleichbar höhere Werte mit bis zu 28,24  $\mu\text{mol/kg}$  auf, dürften jedoch nicht zum Geschmack des Kochwassers beitragen oder einen Fehlgeschmack hervorrufen.

Um weitere Einblicke in das molekulare Verständnis des Bittereindrucks der weißen Spargelstangen zu erhalten und um die quantifizierten Inhaltsstoffe im Hinblick auf ihren Geschmacksbeitrag zu gewichten, wurden ihre jeweiligen DoT-Faktoren, als Quotient aus der Konzentration eines Stimulus und seinem Schwellenwert, ermittelt. Deutlich zeigte sich, dass das monodesmosidische Saponin **14a/b**, das einen niedrigen Schwellenwert und eine Chalcotriose-Seitenkette aufweist, mit einem DoT-Faktor von 3,6 definitionsgemäß zum Geschmack des rohen Spargels ( $A^a$ ) beiträgt. Alle weiteren Faktoren der analysierten Saponine lagen unter eins und trugen somit maximal in ihrer Summe zum sensorischen Profil der untersuchten Bleichspargelstangen bei.

Betrachtet man objektiv die DoT-Werte des gekochten Spargels im Vergleich zu denen des rohen, wie ein Endverbraucher ihn sensorisch beurteilen würde ( $B^b$ ), so zeigt sich ein anderes Bild. Die Mischung aus **5a/b** besaß gleichsam wie die aus **10a/b** einen verhältnismäßig hohen Wert (1,4 und 3,3) und leistete somit einen entscheidenden Beitrag zur Spargelbitterkeit. Dagegen spielen die monodesmosidischen Saponine **14a/b** und **15** mit DoT-Faktoren  $<0,3$  keine primäre Rolle für den Spargelgeschmack.

Folglich konnte gezeigt werden, dass die generelle Bitterkeit von rohem Spargel von dem monodesmosidischen Saponin **14a/b** mit verursacht wird. Dagegen trugen in erster Linie die bidesmosidischen Saponine **5a/b** und **10a/b** zum bitteren Eindruck der gekochten Bleichspargelstangen bei. Das kaum bitter wirkende Spargelkochwasser wies auch keinen Bitterstoff mit einem DoT-Faktor über 1 auf.

### 3.4.3 Quantifizierung von Saponinen in Spargelhandelsproben

Unter Anwendung des entwickelten Bestimmungsverfahrens wurde außerdem die Bitterstoffverteilung in verschiedenen handelsüblichen Spargelproben untersucht. Hierzu wurden nicht nur weiße Spargelstangen aus Deutschland, Peru und Griechenland, sondern auch grüne Chargen im Hinblick auf ihre Saponingehalte näher betrachtet. Zudem wurden die quantitativen Saponinverteilungen in Spargelsamen und Jungpflanzen analysiert. Die Gehalte der Saponine **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15** und **17** sind in Tabelle 6 zusammengefasst. In allen Bleichspargelproben (A–E) dominierte mengenmäßig das monodesmosidische Saponin **14a/b** mit Gehalten von 61,77 bis 339,15 mg/kg, gefolgt von den bidesmosidischen Saponinen **5a/b** und **10a/b** mit Werten bis zu 136,40 mg/kg frischem Spargel. Für das aus Jungpflanzen isolierte Monodesmosid **15** wurden in den Bleichspargelchargen Konzentrationen von 7,77 bis zu 27,81 mg/kg bestimmt. Dagegen lagen die Analyten **13a/b** und **17** in den untersuchten Matrices nur in Spuren bis maximal 1,41 mg/kg vor. Dabei konnte Verbindung **17** lediglich in einer deutschen Bleichspargelprobe detektiert werden. Bei der Analyse der Bleichspargelsorten unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlicher Erntezeitpunkte zeigte sich deutlich, dass die Konzentrationen einzelner Saponine starke natürliche Schwankungen aufwiesen. Während z. B. in weißem Biospargel (B) aus dem Einzelhandel ein Gehalt von 61,77 mg/kg für **14a/b** ermittelt wurde, wies der griechische Spargel (E) sogar einen Wert von 339,15 mg/kg auf.

Auch in Untersuchungen von Wang et al. (2003), Schwarzbach (2004), Schwarzbach et al. (2006) ebenso wie in denen von Brueckner et al. (2010) konnten große natürliche Schwankungen für Spargelsaponine aufgezeigt werden. Dennoch fehlen in den erwähnten Publikationen Korrelationen zwischen den analysierten Analyten und eine exakte Strukturzuweisung. Bisher wurde in der Literatur ein Großteil der Saponinstrukturen lediglich postuliert, jedoch nicht spektroskopisch untermauert, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals quantitative Daten mit definierten Strukturen korreliert werden konnten.

Ein Trend bezüglich der Verteilung des Saponinhaushaltes in einzelnen Spargelchargen war nicht zu erkennen. Während deutscher Bleichspargel (A) beispielsweise 17,11 mg/kg der Epimere **5a/b** sowie 269,34 mg/kg von **14a/b** beinhaltete (Verhältnis ca. 1:16), besaß das griechische Sprossgemüse (E) 136,40 mg/kg an **5a/b** und 339,15 mg/kg an **14a/b** (Verhältnis ca. 1:2,5).



**Tabelle 6: Gehalte [mg/kg] der identifizierten Saponine 5a/b, 10a/b, 13a/b, 14a/b, 15 und 17 in rohen weißen deutschen (A), rohen deutschen Bio (B), weißen peruanischen (C), weißen deutschen/andere Charge/anderer Erzeuger (D) und weißen griechischen (E) und grünen (H) Spargelstangen sowie in Spargelsamen (F) und in Spargeljungpflanzen (G).**

Saponingehalte [mg/kg] in Spargelproben								
Analyt Nr.	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>5a/b</b>	17,11	6,57	14,94	27,33	136,40	1.519,43	0,10	3,01
<b>10a/b</b>	2,83	4,25	3,15	4,19	37,48	29,48	n.d.	3,25
<b>13a/b</b>	0,17	0,68	0,55	0,27	4,04	7,54	3,81	0,97
<b>14a/b</b>	269,34	61,77	210,07	351,76	339,15	87,80	2,10	64,93
<b>15</b>	12,03	7,77	27,81	20,30	15,44	n.d.	5.982,37	20,52
<b>17</b>	0,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31,17	n.d.	n.d.

n. d. = nicht detektiert.

Der Bleichspargel wird üblicherweise vom Durchschnittsverbraucher als wesentlich bitterer empfunden als die milden grünen Stangen. Exemplarisch wurde deshalb eine Grünspargelcharge auf ihre Saponingehalte untersucht. Die Summe aller analysierten Saponine im grünen Spargel war wesentlich geringer als die der weißen Spargelsorten. Eine Korrelation des weniger bitteren Geschmackseindrucks mit dem Fehlen hoher Saponinkonzentrationen lässt sich damit vermuten.

Neben der Analyse der Spargelstangen, die vom Endverbraucher konsumiert werden, galt zudem das Interesse der Quantifizierung von **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15** und **17** in Spargelsamen (F) und Jungpflanzen (G), um einen Einblick in die Saponinverteilung in verschiedenen Pflanzenkompartimenten zu bekommen.

In beiden Proben (F und G) unterschieden sich die Saponinverteilungen gravierend. Besonders in den Jungpflanzen dominierten neben dem Bidesmosid **13a/b** die monodesmosidischen Saponine **14a/b** und **15** mit Gehalten bis zu 5.982,37 mg/kg. Auffällig waren dabei die hohen Konzentrationen der sarsapogeninanalogen (**13a/b** und **15**) im Vergleich zu den diosgeninanalogen Saponinen. Eine Aussage, welche Epimere der identifizierten Saponine überhaupt in den Jungpflanzen anzutreffen sind, lässt sich leider nicht treffen, da die Isomere

chromatographisch nicht zu trennen waren. Dennoch ist es literaturbekannt, dass das Verhältnis der Saponinisomere zum einen von den verschiedenen morphologischen Teilstücken und zum anderen vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängt (Kawano et al., 1975; Hostettmann und Marston, 1995).

### **3.4.4 Quantitative und psychophysikalische Studien zur Bitterstoffverteilung in Spargelteilstücken**

#### **3.4.4.1 Studien zur vertikalen Saponinverteilung und Bitterkeit des rohen weißen Spargels**

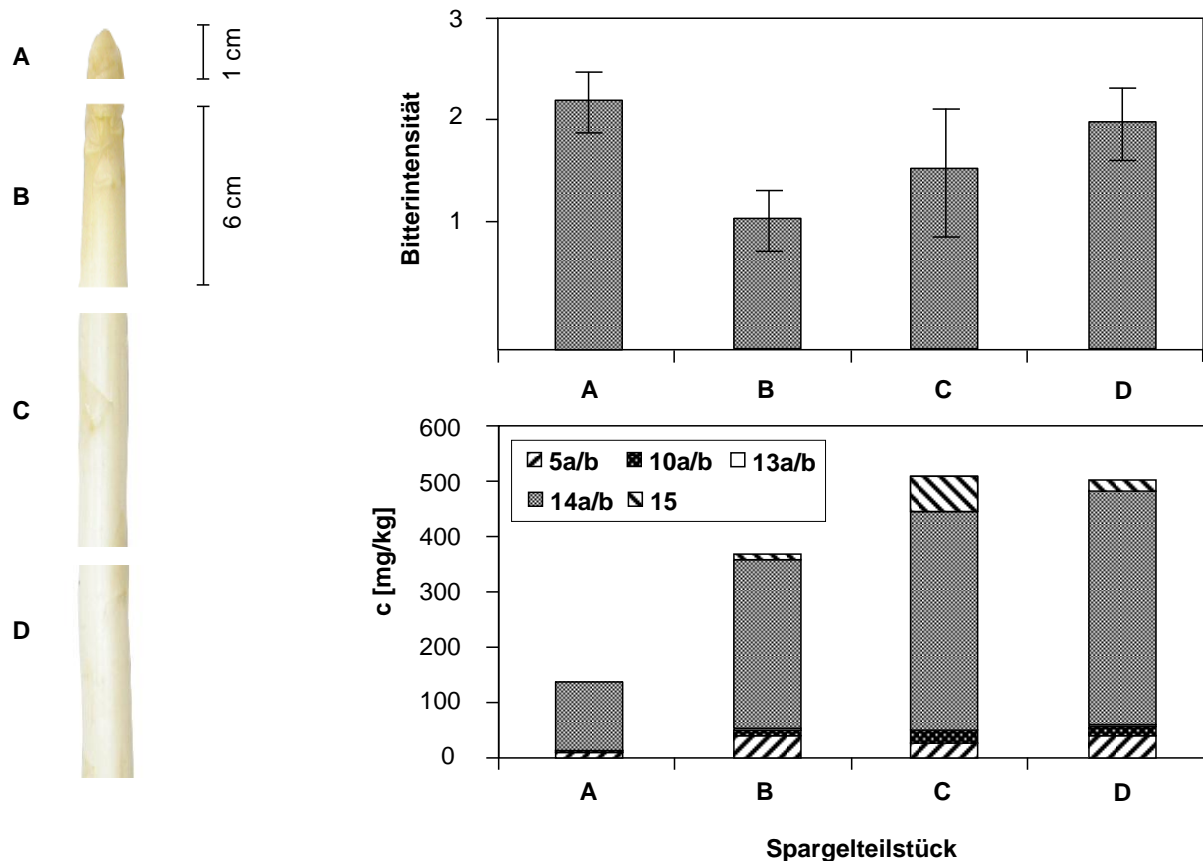
Um zu untersuchen, ob die identifizierten Saponine bezogen auf die vertikale Achse des Spargels unterschiedlich verteilt sind und mit deren Bitterkeit korrelieren, wurden weiße Spargelstangen in vier Teilstücke (A bis D) zerkleinert und sowohl sensorisch als auch massenspektrometrisch analysiert. Teilstück A stellt die Spargelspitze (1 cm) dar, während die Teilstücke B bis D (je 6 cm) alphabetisch bis zum Spargelende gekennzeichnet wurden (vgl. Abbildung 49).

Zur sensorischen Charakterisierung der vier Spargelstücke wurden diese in einem ersten Experiment von einem sensorisch geschulten Panel vergleichend zueinander verkostet und beurteilt. Die Intensität der Bitterkeit wurde dabei auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) eingestuft.

Die Ergebnisse in Abbildung 49 (oben) zeigen, dass die höchste Bitterintensität mit 2,2 für die Spargelspitzen des rohen Spargels ermittelt wurde. In den folgenden Spargelteilabschnitten nahm die Bitterkeit von Teilstück A (2,2) bis B (1,0) zunächst ab und stieg in den Teilstücken C bis D wieder an (C=1,6; D= 1,9).

In einem zweiten Experiment wurde die Bitterstoffverteilung der identifizierten Saponine (**5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b** und **15**) quantitativ ermittelt. Es zeigte sich, dass in der Summe aller quantifizierten Saponine besonders die Teilstücke C und D hohe Gehalte zwischen 502 und 507 mg/kg aufweisen. Dagegen konnten in den Teilstücken A und B lediglich Gesamtgehalte von 136 und 367 mg/kg ausfindig gemacht werden. Während die Summe aller Saponinkonzentrationen der Teilstücke B bis D sehr gut mit deren Bitterkeit korrelierten, konnte der hohe Bittereindruck beim Verzehr der rohen Spargelspitzen nicht mit den Gehalten von **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b** und **15** erklärt werden. Folglich lag die Vermutung nahe, dass in den Spitzen des weißen rohen Spargels weitere nicht identifizierte Bitterstoffe enthalten wa-

ren. Da Degustationsexperimente jedoch gezeigt hatten, dass gekochte Spargelspitzen kaum noch eine Bitterkeit aufweisen, konnte davon ausgegangen werden, dass diese unbekannt Bitterstoffe während des Kochprozesses ausgeschwemmt oder abgebaut werden.



**Abbildung 49: Sensorische Bewertung der Spargelteilstücke A bis D des frischen weißen Spargels im Vergleich (oben). Der Fehlerbalken zeigt das Konfidenzintervall ( $P = 95\%$ ) des Mittelwertes an. Dem unteren Diagramm sind die Konzentrationsverteilungen von 5a/b, 10a/b, 13a/b, 14a/b und 15 in den jeweiligen Teilstücken zu entnehmen.**

Wie in Abbildung 49 deutlich zu erkennen ist, dominierten in den Teilbereichen A bis C vor allem die Saponine **5a/b** und **14a/b**, deren Gehalte von den Spitzen (A) bis zum Spargelboden (D) jeweils mit Gehalten von 9 bis 39 mg/kg beziehungsweise von 125 bis 422 mg/kg anstiegen. Während dieser Trend für **14a/b** erstmals mit Hilfe von LC-MS/MS-Messungen beobachtet werden konnte, beschrieben Wang et al. bereits 2003 das Phänomen, dass der Gehalt des Saponins Protodioscin **5a** von der Spargelspitze (Teilstück A: 0,24 mg/100 g

Frischmasse) bis zu den Enden (Teilstück D: 250 mg/100 g) anstieg. Da Wang et al. (2003) käuflich erworbenes Protodioscin zur externen Kalibration verwendeten, jedoch keine Auftrennung der Saponinepimere **5a/b** beobachtet konnten, ist davon auszugehen, dass die Protodioscingehalte der Mischung **5a/b** entsprechen. Die unter 3.4.3 aufgeführten quantitativen Daten verdeutlichen, wie sehr die Protodioscingehalte in unterschiedlichen Spargelproben schwanken. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Wang et al. (2003) wesentlich höhere Protodioscingehalte in den einzelnen Spargelteilstücken finden konnten, als im Rahmen dieser Arbeit.

Auch die Gehalte des monodesmosidischen Saponins **15** waren in den unteren Teilstücken höher als in den oberen. Bei 3-O-[[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)] $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl] (25S),5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -ol (**15**) ist diese Konzentrationsverteilung nicht verwunderlich, wo es doch in den unterirdischen Spargelteilen, den Jungpflanzen des *Asparagus officinalis* L., in hohen Mengen vorliegt (vgl. 3.4.3) und zudem aus diesem Pflanzenteil isolativ gewonnen werden konnte.

#### 3.4.4.2 Studien zur horizontalen Saponinverteilung und Bitterkeit des rohen weißen Spargels

Um eine genauere Lokalisierung einzelner Geschmacksstoffe im Spargel vornehmen zu können, wurden die Spargelstangen nicht nur vertikal von den Spitzen bis zu den Böden, sondern auch horizontal von außen nach innen sensorisch und quantitativ bewertet. Dazu wurden weiße Spargelstangen mit Hilfe eines Spargelschälers, wie in Abbildung 50 zu erkennen, in drei Segmente unterteilt und getrennt voneinander beurteilt beziehungsweise aufgearbeitet.

Bereits die psychophysikalische Charakterisierung der Bitterkeit, bei der die Geschmacksintensitäten der drei Teilstücke auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) eingestuft wurden, zeigte, dass die Bittere von außen nach innen stark abnahm. Während die Schalen (A) mit 3,0 bewertet wurden, ordnete das Panel die innen liegenden Spargelteile B und C mit Werten bei 2,3 und 0,9 ein (Abbildung 50, oben).

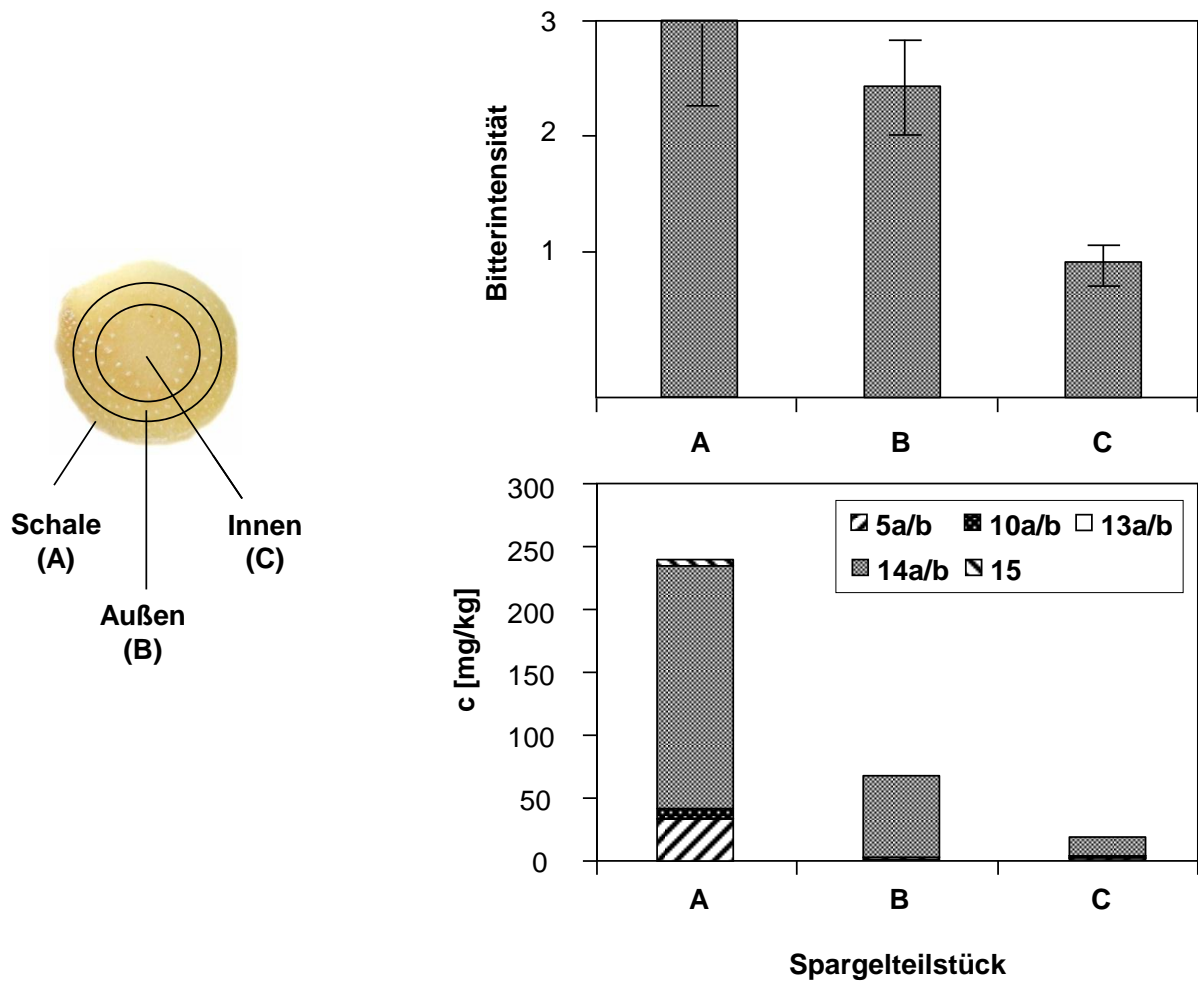


Abbildung 50: Sensorische Bewertung des weißen rohen Spargels von außen nach innen (oben) sowie die Konzentrationsverteilung der Saponine 5a/b, 10a/b, 13a/b, 14a/b und 15 (unten). Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall ( $P = 95\%$ ) des Mittelwertes.

Nicht nur, dass der Bittergeschmack in den äußeren Bereichen der Spargelstangen intensiver als in den inneren Teilstücken wahrgenommen wurde, sondern auch die quantitative Analyse der Spargelsaponine (5a/b, 11a/b, 13a/b, 14a/b, 15) zeigte, dass die Summe der detektierten Saponine von A bis C stark zunahm (Abbildung 50). So konnten Saponingehamtskonzentrationen von 12,7 mg/kg (C) bis 241,1 mg/kg (A) gemessen werden, die sehr gut mit dem Trend der verstärkten Bitterwahrnehmung der äußeren Spargelstangen korrelieren.

In allen Teilstücken war der für AS-2-I (14a) und Dioscin (14b) charakteristische Massenübergang 867,5 → 59,0 am intensivsten. Demnach übernehmen die monodesmosidischen

Saponine **14a** und **b**, nicht nur bei der vertikalen, sondern auch bei der horizontalen Saponin- beziehungsweise Bitterverteilung der Spargelstangen eine quantitative Schlüsselrolle.

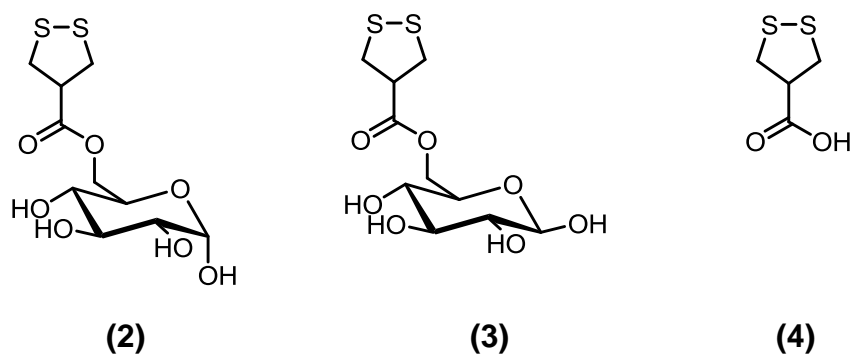
Abschließend lässt sich festhalten, dass es gelungen ist die Verteilung der Saponinkonzentration und der Bitterwahrnehmung bezogen auf die horizontale Achse einer Spargelstange in Einklang zu bringen. Die steigende Bitterkeit von den inneren Spargelsegmenten B und C bis hin zu den Schalen (A) korrelierte sehr gut mit der anwachsenden Gesamtmenge der bitteren Saponine.

### 3.5 Diskussion

Eingangs durchgeführte Geschmacksprofilanalysen stellten neben der Süße die Bitterkeit und eine neue Facette der Mundfülle als bedeutsam für den sensorischen Gesamteindruck sowohl des rohen als auch des gekochten Spargels heraus. Diese erstmals evaluierte Mundfülle, die sich langsam im Mundraum ausbreitet und die Zunge belegt, wurde als „buttrig-belegend“ definiert und ist vergleichbar mit dem psychophysikalischen Eindruck den man beim Zergehen lassen eines Butterstückes auf der Zunge erhält.

Mit dem Ziel, die am Geschmack des rohen sowie gekochten weißen Spargels maßgeblich beteiligten Verbindungen systematisch aufzuspüren, wurden diese durch Extraktion mit Lösungsmitteln steigender Polarität angereichert und anschließend mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) aktivitätsorientiert fraktioniert. Als potenteste Geschmacksstoffe gelang es mittels LC/MS- und NMR-Studien sowie synthetischen Experimenten insgesamt fünf bitter schmeckende Verbindungsmischungen und zwei neue Mundfülle-vermittelnde Glycoside (**2** und **3**, Abbildung 51) in unterschiedlichen Spargelstückchen nachzuweisen.

In sensorischen Studien wurden die isolierten Verbindungen **2** und **3** nicht nur im Hinblick auf ihre Geschmacksqualität, sondern auch bezüglich ihres Geschmacksschwellenwertes beurteilt. Während die zwei erstmals beschriebenen Glycoside mit einem Schwellenwert von 276,8 µmol/l erfasst wurden, konnte zudem gezeigt werden, dass das Aglycon (**4**, Abbildung 51) allein eine ganz andere psychophysikalische Empfindung, die Adstringenz, verursacht.



**Abbildung 51: Strukturen der aus Spargel isolierten Verbindungen 2 bis 4.**

Obwohl in der Literatur bereits seit langem bekannt ist, dass Saponine zu der Bitterkeit des weißen Stangengemüses beitragen und die Saponine Officinalisin-I und Officinalisin-II in diversen Spargelsaponinstudien als bitter charakterisiert wurden (Kawano et al., 1975; Kawano et al., 1977; Schwarzbach, 2004; Brueckner, 2010), konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals sieben (Abbildung 52) weitere bittere Asparagussaponine identifiziert werden.

Eine strukturelle Charakterisierung mittels NMR- und massenspektroskopischer Methoden zeigte, dass die aus den rohen, weißen Spargelstangen isolierten Verbindungen **5a/b**, **10a/b**, **13a/b** und **14a/b** als Epimerenmischungen vorlagen, die chromatographisch nicht trennbar waren. Obwohl in der Vergangenheit beide Isomere der Verbindungen **5a** und **b** in unterschiedlichen Spargelteilstücken, wie den Samen und den Spargeltrieben, postuliert wurden, wurden sie zudem in den verzehrbaren Spargelstangen detektiert (Shao et al., 1997; Kawano et al., 1977). Darüber hinaus gelang es erstmals mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und mit Literaturdatenvergleichen die Konstitutionsunterschiede der Spargelsaponinepimere **10a/b**, **13a/b** und **14a/b** herauszuarbeiten. Während die Strukturen der grenzflächenaktiven Inhaltsstoffe **5a/b**, **10b** sowie **14a** bereits in der Literatur in *Asparagus officinalis* L. beschrieben wurden (Shao et al., 1997; Kawano et al., 1977; Shimoyamada et al., 1996), konnten ihre Epimere **10a** und **14b** ebenso wie **13a/b** zum ersten Mal in Spargelstangen identifiziert werden.

Die Isolierung von **15** sowie die Referenzverbindung **17** ermöglichten den abschließenden analytischen Nachweis aller identifizierten Inhaltsstoffe in den unterschiedlichen morphologischen Spargelsegmenten. Auch wenn mit dem dabei genutzten LC-MS/MS-Verfahren keine Unterscheidung der Konstitutionen einzelner Saponine getroffen werden konnte, gelang es

dennoch zu zeigen, dass die spezifischen Massenübergänge der Saponine **5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15** und **16** in den verzehrbaren Spargelteilen vorkommen und somit auch einen Einfluss auf deren sensorisches Profil haben können.

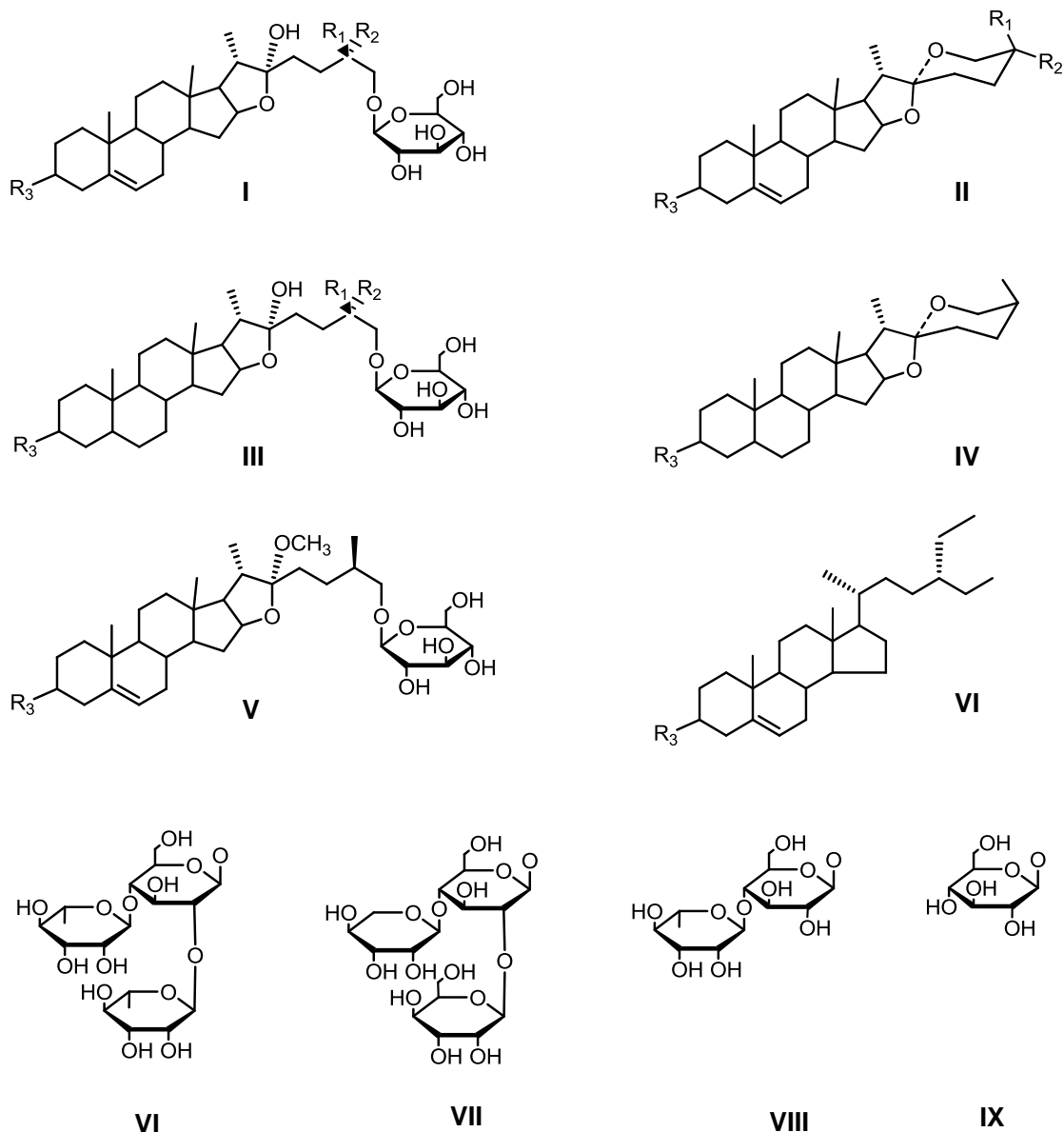
In den Jungpflanzen lag neben den sechs Verbindungsmischungen (**5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b** und **15**), die bereits in den Stangen ausfindig gemacht wurden, zusätzlich  $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucosid (**17**) vor.

In weiteren psychophysikalischen Experimenten mit den mono- beziehungsweise bidesmosidischen Saponinen des *Asparagus officinalis* L., bei denen die Bitterschwellenwerte bestimmt wurden, konnte die Schlüsselrolle der Saponine, bei denen über das C(3) eine Chalcotriose- beziehungsweise 4-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucoopyranosid-Einheit gebunden vorliegt, aufgezeigt werden. Da es chromatographisch nicht gelang die Epimerenmischungen der Saponine zu trennen, wurden die Schwellenwerte der Epimerenmischungen jeweils in den natürlich vorkommenden Konzentrationsverhältnissen aufgenommen. Die mono- beziehungsweise bidesmosidischen Spargelsaponine wiesen Bitterschwellenwertkonzentrationen zwischen 10,9 und 199,7  $\mu\text{mol/l}$  auf.

Obwohl Literaturstudien zeigen, dass Saponine für die Bitterkeit des Bleichspargels (*Asparagus officinalis* L.) verantwortlich gemacht werden, fehlen bis dato neben Untersuchungen zur vollständigen Identifizierung der wertmindernden Schlüsselbitterstoffe auch solche zum Einfluss auf das sensorische Gesamtprofil des Sprossgemüses (Kawano et al., 1975; Kawano et al., 1977; Schwarzbach, 2004; Brueckner, 2010). Um nicht nur das Hauptbitterprinzip des rohen und des gekochten Spargels in unterschiedlichen Handelsproben aufzudecken, sondern auch um die Bitterstoffverteilung in den verschiedenen Spargelsegmenten zu untersuchen, gelang es im Rahmen dieser Arbeit, die wichtigsten Spargelsaponine (**5a/b**, **10a/b**, **13a/b**, **14a/b**, **15** und **17**) mit einer neu entwickelten LC-MS/MS-Methode zu quantifizieren.

Besonders wichtig war die ausführliche Methodenentwicklung zur quantitativen Detektion der Saponine, bei der sich zeigte, dass nur frisch geerntete Proben, die nach Homogenisierung zur Enzymdeaktivierung direkt mit Methanol überschichtet werden mussten, verwendet werden durften. Auch die Bedeutung des direkten und raschen Aufarbeitens mit Methanol und Injizieren in das LC-MS/MS-System aufgrund des Sedimentierungsverhaltens monodesmosidischer Saponine konnte aufgezeigt werden.





	Verbindung (Nr.)						
	5a/b	10a/b	13a/b	14a/b	15	16	17
Aglycon	I	I	III	II	IV	V	VI
Rest (R <sub>3</sub> )	VI	VIII	VIII	VI	VII	VI	IX

Abbildung 52: Strukturen der isolierten beziehungsweise synthetisierten Saponine 5a (R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H), 5b (R<sub>1</sub>=H ; R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>), 10a (R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H), 10b (R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>), 13a (R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H), 13b (R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>), 14a (R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H), 14b (R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>), 15, 16 und 17.

Überraschend zeigten sich Unterschiede in der Verteilung der Schlüsselbitterstoffe zwischen dem rohen und dem gekochten Bleichspargel. Die generelle Bitterkeit von rohem Spargel wird durch das monodesmosidischen Saponin **14a/b** und die des gekochten Gemüses durch die Bidesmoside **5a/b** und **10a/b** geprägt.

Darüber hinaus konnte eine große Schwankungsbreite der Saponinkonzentrationen in verschiedenen Spargelchargen beobachtet werden. Biologische Einflüsse von Sorte, Witterung, Anbaugebieten, Bodenverhältnissen oder Stressbedingungen scheinen einen Einfluss auf den Saponinhaushalt des Bleichspargels auszuüben. In weiteren Studien wäre es wünschenswert, Spargelproben, die unter definierten Bedingungen gezogen wurden, vergleichend zueinander zu analysieren.

Auch die horizontale ebenso wie die vertikale Bitterstoffverteilung in den Spargelstangen konnte verifiziert werden. Analog zu Wang et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass die Saponingesamtkonzentration von den Spargelspitzen hin zu den Spargelböden zunimmt. Erstmals gelang es, die höheren Saponinkonzentrationen, die vertikal gesehen eher in den äußeren Bereichen wie den Spargelschalen anzutreffen sind, herauszuarbeiten.

Da in der Literatur vermutet wird, dass die biologisch inaktiven bidesmosidischen Saponine als Kohlenhydrattransportform in der Pflanze vorliegen, die bei Parasitierung der Pflanze durch enzymatische Partialhydrolysen in ihre aktiven monodesmosidischen Formen überführt werden, wäre es künftig interessant, den Zusammenhang zwischen den bitteren Substanzen in den äußeren und unteren Spargelbereichen und deren fungizide und bakterielle Eigenschaften zu testen.

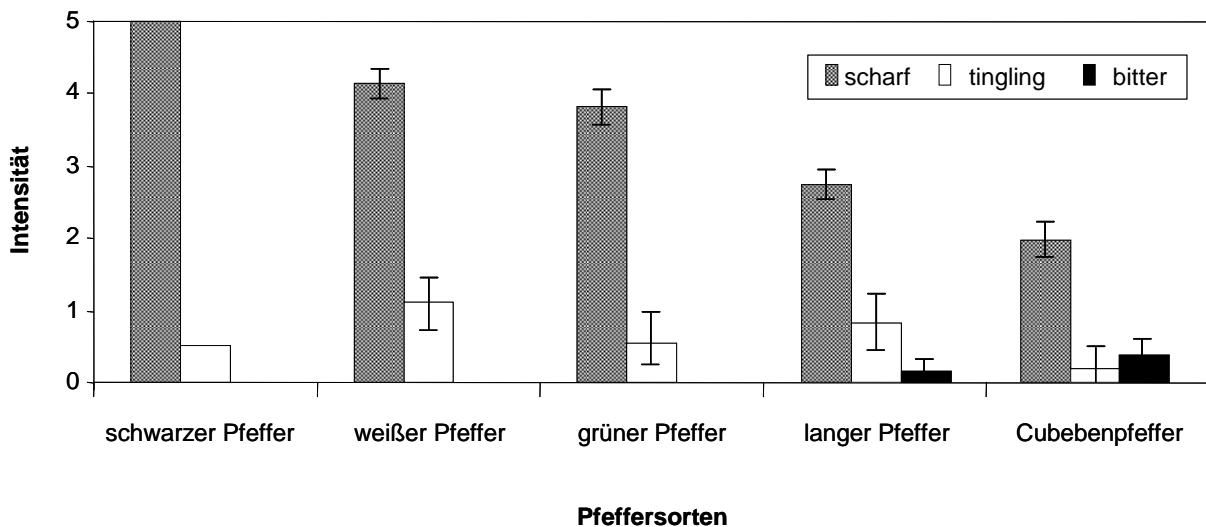
## 4 Pfeffer (*Piper nigrum* L.) – Ergebnisse und Diskussion

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die zu Grunde liegenden molekularsensorischen Ursachen des scharfen und tingelnden Eindrucks des Pfeffers näher analysiert werden.

### 4.1 Sensorische Untersuchungen verschiedener Pfeffersorten

Um eine Pfeffersorte aus der Familie der Piperaceae mit einem besonders scharfen Eindruck als Untersuchungsmaterial auszuwählen, wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit die sensorischen Profile von Cubebenpfeffer (*Piper cubeba* L.), weißem Pfeffer (*Piper nigrum* L.), grünem Pfeffer (*Piper nigrum* L.) und langem Pfeffer (*Piper longum* L.) bei gleicher Konzentration vergleichend zu dem des schwarzen Pfeffers (*Piper nigrum* L.) auf Filterpapierstreifen aufgenommen. Dazu wurden Ethanolextrakte der gemahlene Pfeffersorten angefertigt, deren Filtrate auf Filterpapier (1 × 2 cm) aufgezogen und der Ethanol im Trockenschrank bei 38 °C verdampft, sodass die Sensorikproben von einem sensorisch geschulten Panel bewertet werden konnten. Die in Vorversuchen ermittelten Sinnes- und Geschmackseindrücke scharf, tingling und bitter wurden dabei anhand einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) in ihrer Intensität vergleichend gegen schwarzen Pfeffer evaluiert.

Im Vergleich zur sensorischen Scharfqualität des schwarzen Pfeffers, der mit 5 bewertet wurde, besaßen weißer (4,1), grüner (3,8) und langer Pfeffer (2,7) sowie der Cubebenpfeffer (1,9) geringere Intensitäten (Abbildung 53). Neben der Schärfe konnte auch die tingelnde Note der unterschiedlichen Pfeffersorten gegeneinander gewichtet werden, wobei der weiße (1,1) im Vergleich zu dem langen (0,8), grünen (0,5), schwarzen (0,5) und Cubebenpfeffer (0,2) die höchste Intensität aufwies. Lediglich bei langem Pfeffer (0,2) und Cubebenpfeffer (0,4) konnte zusätzlich eine leichte Bitternote detektiert werden. Die fünf Extraktionsrückstände wurden dagegen durch das Sensorikpanel als sensorisch inaktiv bewertet, sodass die Ethanolextraktion bezüglich geschmacks- und sinnesaktiver Verbindungen als ausreichend angesehen werden konnte.



**Abbildung 53: Vergleichende Profilanalysen zwischen schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum* L.), weißem Pfeffer (*Piper nigrum* L.), grünem Pfeffer (*Piper nigrum* L.), langem Pfeffer (*Piper longum* L.) und Cubebenpfeffer (*Piper cubeba* L.). Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall ( $P = 95\%$ ) des Mittelwertes.**

Bei der sensorischen Beurteilung der Gesamtschärfe unterschiedlicher Pfeffersorten fiel insbesondere der schwarze Pfeffer (*Piper nigrum* L.) durch seine stark scharfe Note auf und wurde somit für die weiteren molekularsensorischen Experimente ausgewählt.

## 4.2 Einfluss von Piperin auf die Gesamtschärfe

In der Literatur wird Piperin (21, Abbildung 54) immer wieder als der Träger des scharfen sensorischen Eindrucks von Pfeffer beschrieben (Franke, 1997; Freist, 1991). Um den Beitrag, den Piperin zur Gesamtschärfe des schwarzen Pfeffers leistet, zu verdeutlichen, wurde die im Pfefferextrakt vorliegende natürliche Piperinkonzentration quantifiziert, auf Filterpapier aufgezogen und gegen einen Blindwert (minimale Schärfe = 0) und schwarzen Pfefferextrakt (maximale Schärfe = 5) von einem geschulten Sensorikpanel bewertet. Die Mitglieder des geschulten Panels stufte die Schärfe des darin natürlich enthaltenen Piperins bei 2,5 ein (Abbildung 54).

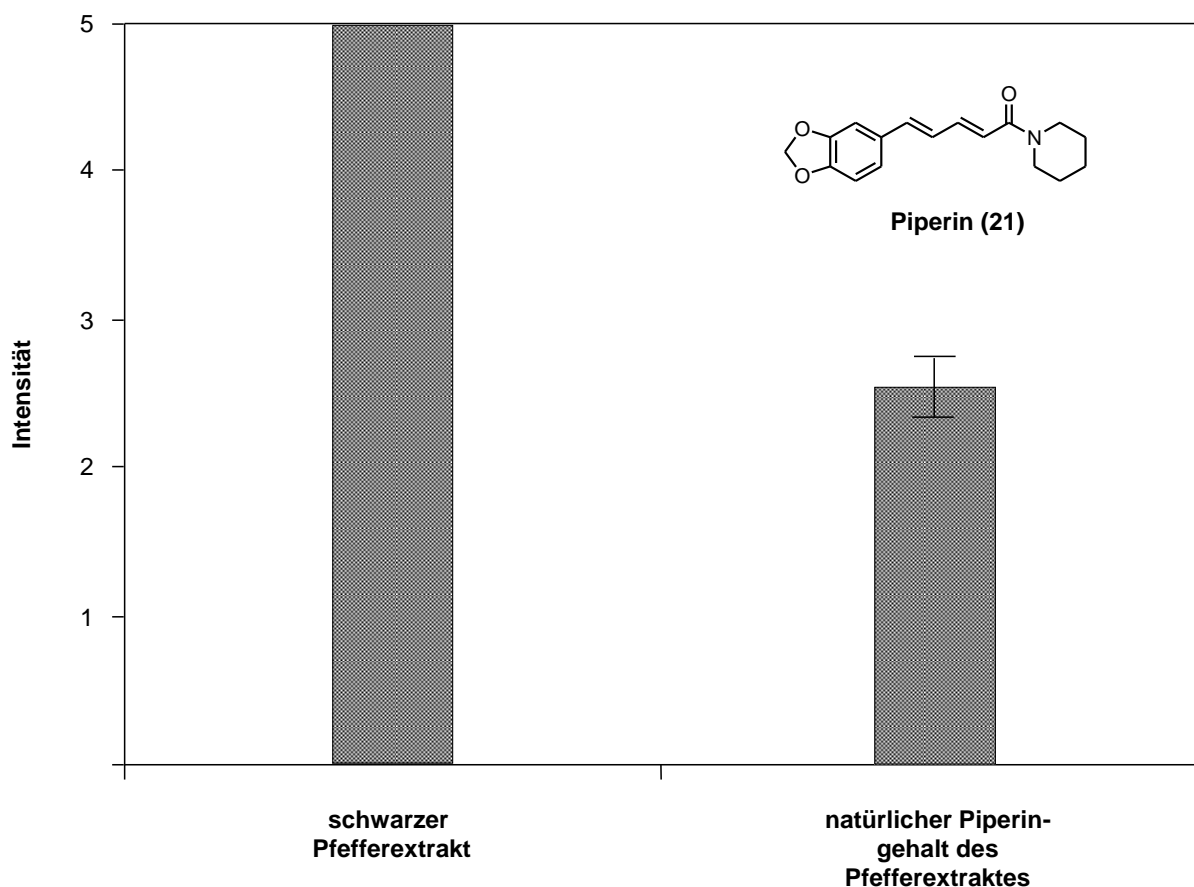


Abbildung 54: Sensorischer Vergleich des schwarzen Pfefferextraktes mit der darin natürlich vorliegenden Piperinkonzentration. Der Fehlerbalken zeigt das Konfidenzintervall ( $P = 95\%$ ) des Mittelwertes.

Dieses sensorische Experiment zeigt, dass die Scharf-Intensität des schwarzen Pfefferextraktes nicht alleine durch den Gehalt an Piperin (21) zu erklären ist.

Um weiterhin die Bedeutung anderer Pfefferinhaltsstoffe auf den sensorischen Gesamteindruck des Pfeffers zu charakterisieren und zu vervollständigen, wurde im Folgenden eine Geschmacksverdünnungsanalyse des Ethanolextraktes von schwarzem Pfeffer durchgeführt.

### **4.3 HPLC-Geschmacksverdünnungsanalyse (HPLC-GVA) des Ethanolextraktes**

Mit Hilfe der Geschmacksverdünnungsanalyse konnten in dem als scharf und tingling bewerteten Ethanolextrakt des schwarzen Pfeffers 41 Fraktionen mit Verdünnungsfaktoren von 2 bis über 1024 wahrgenommen und lokalisiert werden. Hierzu wurde ein ethanolischer Pfeffereextrakt mittels präparativer RP-HPLC in einzelne Fraktionen aufgetrennt, lyophilisiert, seriell 1+1 in Ethanol verdünnt, auf Filterpapierstreifen aufgebracht und mittels des modifizierten „Half-Mouth“-Tests (Scharbert et al., 2004), wie unter 4.5.1 beschrieben, sensorisch verkostet. Wie aus der Abbildung 55, in der die GV-Faktoren (rechte Seite) gegen das HPLC-Chromatogramm (linke Seite) aufgetragen sind, zu entnehmen ist, konnten neben den 32 scharfen Fraktionen weitere 10 tingelnde Fraktionen detektiert werden. Die als scharf wahrgenommene Fraktion 7 zeigte mit einem GV-Faktor von über 1024 die höchste Aktivität, gefolgt von den gleichfalls scharf wirkenden Fraktionen 5, 6, 9, 10, 11, 13, 33 und 37, welche mit GV-Faktoren von über 64 bewertet wurden. Die Fraktionen 10, 13 und 33 bis 40 wurden mit GV-Faktoren zwischen 2 und 32 neben scharf auch als tingelnd empfunden.

Außerdem wiesen die Fraktionen 1 und 2 einen leicht bitteren Geschmack auf. Da bei dieser Arbeit das Hauptgewicht auf den scharf und tingelnd wirkenden Substanzen lag, wurden die Fraktion 1 und 2 nicht weiter analysiert.

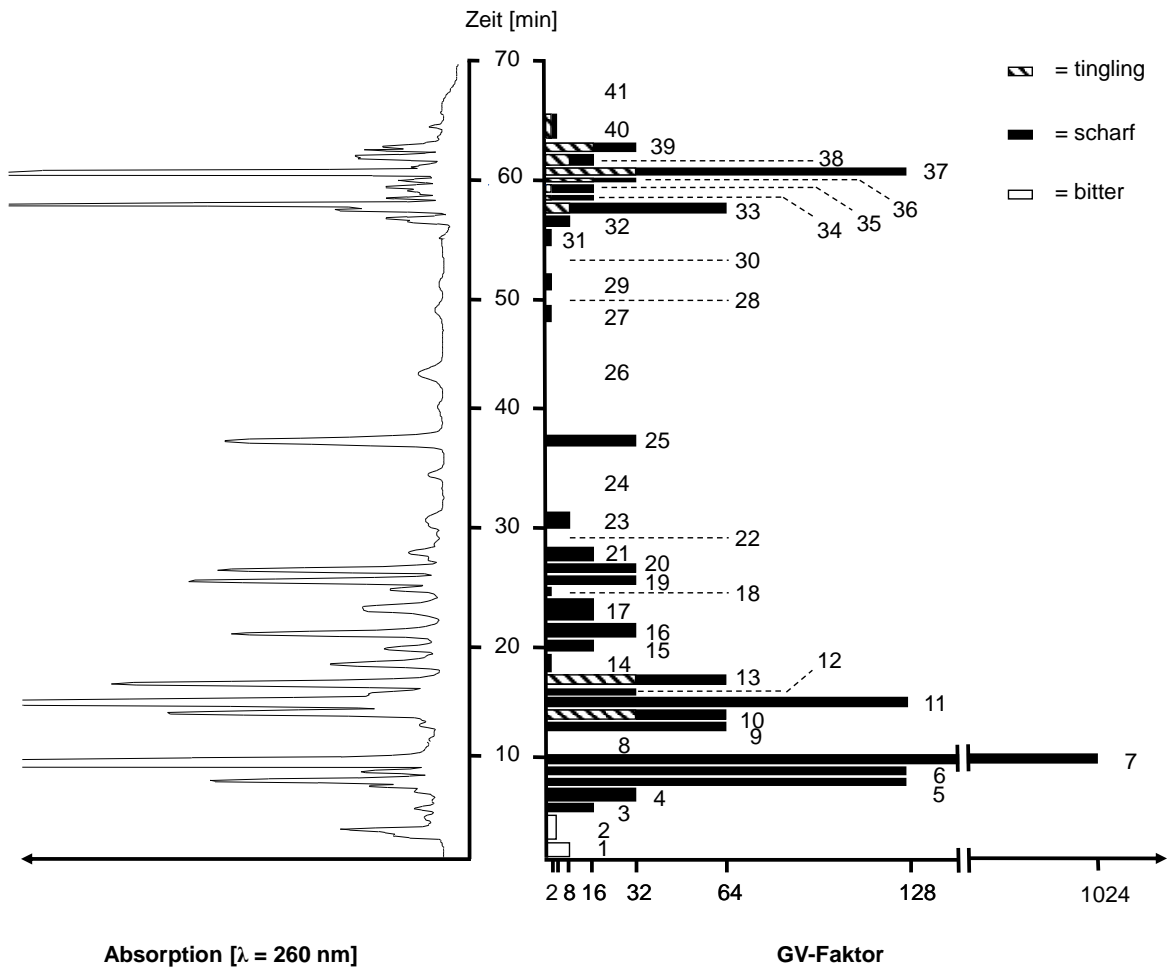


Abbildung 55: RP-HPLC Chromatogramm ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ , linke Seite) und Geschmacksverdünnungsanalyse mit GV-Faktoren (rechte Seite) eines ethanologischen Pfefferextraktes.

Neben den GV-Faktoren und sensorischen Qualitäten der einzelnen Fraktionen, sind deren Ausbeuten in Tabelle 7 aufgeführt. Die Ergebnisse der Ausbeuten in Tabelle 7 zeigen, dass Fraktion 7 neben dem höchsten GV-Faktor auch die höchste Ausbeute aufwies.

**Tabelle 7: Ausbeuten, sensorische Qualität und GV-Faktoren des Ethanolextraktes des schwarzen Pfeffers.**

Fraktion	Ausbeute [mg]	sensorische Qualität	GV-Faktor
1	30,7	bitter	8
2	23,1	bitter	4
3	<1	scharf	16
4	1,2	scharf	32
5	45,1	scharf	128
6	38,9	scharf	128
7	188,1	scharf	1024
8	3,8	-	-
9	<1	scharf	64
10	12,3	scharf / tingling	64 / 32
11	34,6	scharf	128
12	1,7	scharf	32
13	7,1	scharf / tingling	64 / 32
14	5,1	scharf	2
15	<1	scharf	16
16	27,8	scharf	32
17	1,5	scharf	16
18	<1	scharf	2
19	3,6	scharf	32
20	3,2	scharf	32
21	1,2	scharf	16
22	<1	-	-
23	<1	scharf	8
24	<1	-	-
25	3,1	scharf	32
26	0,8	-	-
27	<1	scharf	2
28	<1	-	-
29	<1	scharf	2
30	<1	-	-
31	<1	scharf	4
32	<1	scharf	8



33	2,3	scharf / tingling	64 / 8
34	<1	scharf / tingling	16 / 2
35	1,0	scharf / tingling	16 / 2
36	<1	scharf / tingling	8 / 4
37	7,6	scharf / tingling	128 / 32
38	<1	scharf / tingling	16 / 8
39	1,1	scharf / tingling	32 / 16
40	<1	scharf / tingling	8 / 4
41	<1	-	-

Um Einblicke in die molekulare Zusammensetzung der einzelnen sensorisch aktiven Fraktionen zu gewinnen, wurde der Ethanolextrakt, wie im Folgenden beschrieben, polaritätsorientiert aufgetrennt und mittels spektroskopischer Analysen identifiziert.

#### 4.4 Isolierung und Identifizierung sensorisch aktiver Inhaltsstoffe

Um ausreichende Mengen der wertgebenden Pfefferinhaltsstoffe für deren molekulare Charakterisierung zu gewinnen, wurden Ethanolextrakte aus 500 g Pfefferkörnern angefertigt und mittels RP18-Material säulenchromatographisch vorgetrennt. Analog zum angewendeten Methanol/Wasser-Gradienten wurden die gewonnenen Fraktionen wie folgt bezeichnet: Fraktion A (70/30, v/v; Ausbeute: 11,6%), Fraktion A-II (80/20, v/v; Ausbeute: 71,6%), Fraktion B (90/10, v/v; Ausbeute: 10,1%) und Fraktion C (100/0, v/v; Ausbeute: 6,7%). Durch die säulenchromatographische Vortrennung lagen die Pfefferinhaltsstoffe in den Fraktionen A–C so vor, dass sie mittels präparativer HPLC isoliert und nach Gefriertrocknung per LC/MS- und NMR-Spektroskopie sowie durch Synthesen eindeutig in ihren Strukturen identifiziert werden konnten.

Im vorliegenden Abschnitt der Arbeit wurden die Strukturidentifizierungen der detektierten Pfefferinhaltsstoffe, um die Übersichtlichkeit der Darstellung zu gewährleisten, entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge in den RP-18-Fraktionen A–C aufgezeigt. Abschließend ist in der Diskussion unter 4.4.4 in Tabelle 8 eine weitere Zuordnung der identifizierten Verbindungen in Bezug auf das HPLC-Chromatogramm der GVA (Abbildung 55 und Tabelle 7) getroffen worden.

#### 4.4.1 Identifizierung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in Fraktion A

Zur präparativen Isolierung der verschiedenen Inhaltsstoffe der Fraktion A wurde ein Aliquot der aus 500 g Pfefferkörnern gewonnenen SPE-Fraktion mittels RP-18-Material in drei Subfraktionen aufgetrennt. Die isolierten Fraktionen wurden, wie in Abbildung 56 aufgeführt, durchnummeriert.

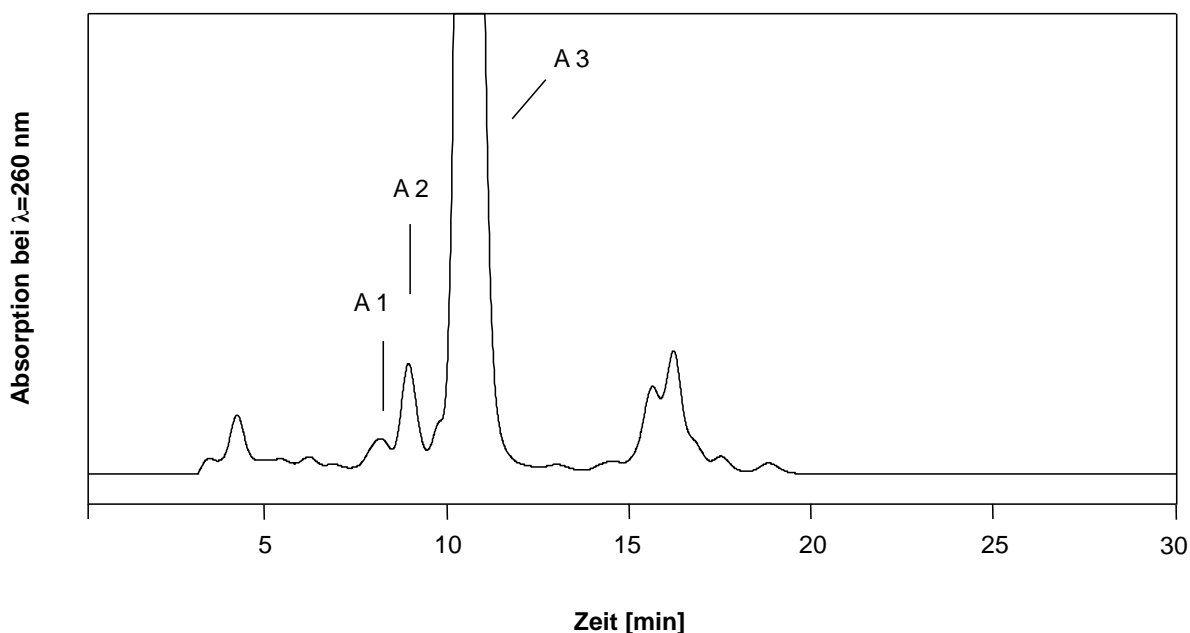


Abbildung 56: RP-HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) der Fraktion A des schwarzen Pfefferextraktes.

Die Strukturaufklärung der einzelnen Subfraktionen, die mittels LC/MS- und NMR-Spektroskopie sowie durch Synthese eindeutig erreicht wurde, wird im Folgenden beschrieben.

##### **Identifizierung der Fraktion A1–A3**

Die Scharfstoffe der HPLC-Fractionen A1, A2 und A3 der SPE-Fraktion A wurden spektroskopisch als Piperlonguminin (**22**), Piperilin (**23**) und Piperin (**21**) identifiziert.

Mittels Cochromatographie konnte in einem ersten Identifizierungsexperiment der Fraktion A3 das Hauptamid des Pfeffers, Piperin (**21**), zugeordnet werden. Das typische UV/VIS-

Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 348 \text{ nm}$  (gemessen in Methanol) sowie ein Pseudomolekülion  $[\text{M}+1]^+$  bei  $m/z$  286 im positiven Electron Spray Ionisation Modus bestätigten die Identität von Piperin. Auch die Resonanzsignale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum stimmten mit den 19 Protonen des käuflich erworbenen Piperins überein (Abbildung 58).

Obwohl die Verbindungen **22** und **23**, anders als **21**, Pseudomolekülionen von  $[\text{M}+1]^+$  bei  $m/z$  274 und  $m/z$  272 im  $\text{ESI}^+$ -Modus aufwiesen, konnten in den  $\text{MS}^2$ -Spektren (Abbildung 57) gleiche Fragmentationen beobachtet werden. Analog zur Literatur (Sun et al., 2007 und Friedman et al., 2008) gaben die erhaltenen Fragmentierungsmuster der drei Verbindungen im  $\text{MS}^2$  weitere Aufschlüsse über deren Struktur. Resultierend aus den charakteristischen Abspaltungen des Isobutylamin-  $[\text{M}+\text{H}-73]^+$ , Pyrrolidin-  $[\text{M}+\text{H}-71]^+$  beziehungsweise Piperidin-Restes  $[\text{M}+\text{H}-85]^+$ , konnte übereinstimmend bei allen drei Substanzen die Bildung des Produkts bei 201 amu beobachtet werden. Neben dem Produktion bei  $m/z$  201, ist auch  $m/z$  135 ein eindeutiger Indiz für die Benzodioxol-Teilstruktur. Während das dominante Produktion bei  $m/z$  201 dem in Abbildung 57 aufgeführten Ion zuzuordnen ist, entspricht  $m/z$  bei 135 einem Methylbenzodioxolion  $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2]^+$ .

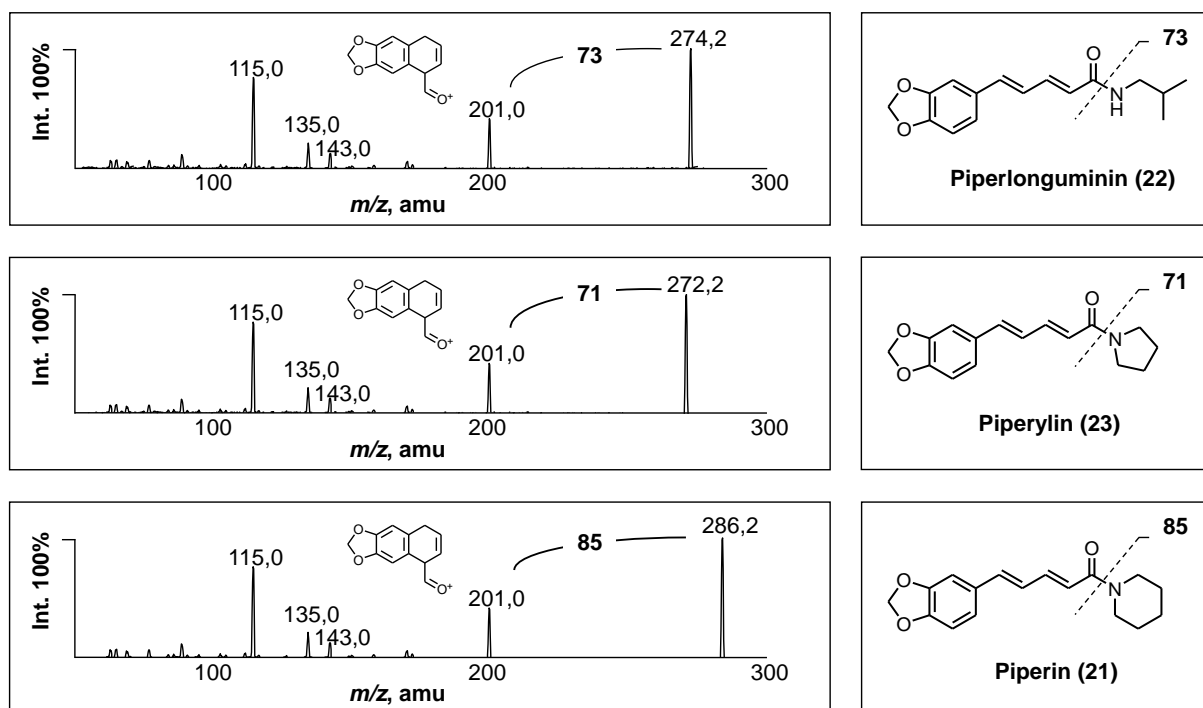
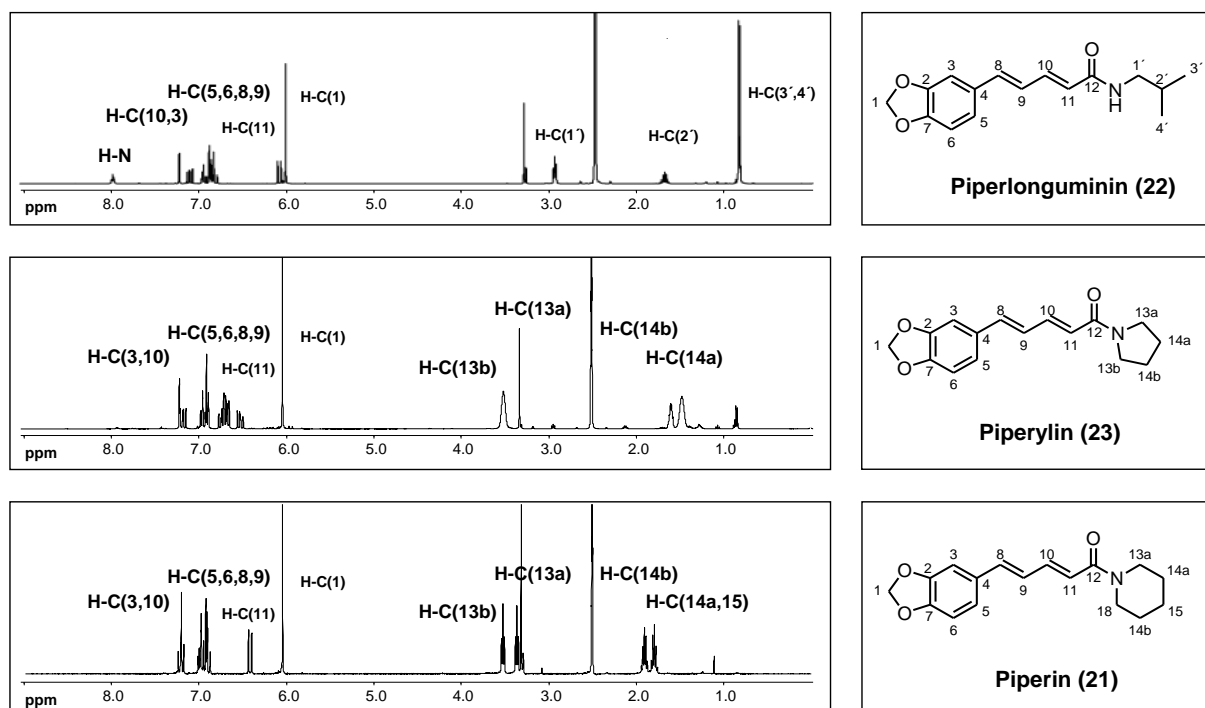


Abbildung 57: Vergleich der  $\text{MS}^2$ -Spektren von Piperlonguminin (22), Piperylin (23) und Piperin (21) im positiven Modus ( $\text{ESI}^+$ ).

Um die Strukturen der drei Verbindungen weiter abzusichern, wurden 1D- und 2D-NMR-Experimente durchgeführt und deren Spektren vergleichend ausgewertet. In Abbildung 58 sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der drei Analoga abgebildet. Dabei bestätigten die drei  $^1\text{H}$ -Spektren der isolierten Substanzen den für Piperinanaloga charakteristischen Benzodioxol-Grundbaustein. Das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 6.08 ppm mit einer Intensität von 2 konnte beispielsweise, aufgrund der fehlenden Kopplungspartner im COSY-Spektrum, bei allen drei Verbindungen den Protonen am Kohlenstoffatom C(1) zugeordnet werden. Auch die Long-Range-Kopplung zwischen dem Proton am Kohlenstoffatom C(3) und dem Kohlenstoffatom C(5) im HMBC kann in allen drei Spektrensätzen wieder gefunden werden. Dies gilt gleichfalls für die gemeinsame, spezifisch kleine Kopplungskonstante von 1.5 Hz am H-(C3) ebenso wie am H-C(5), die typisch ist für eine Kopplung in Metastellung in einem aromatischen Ring (Hesse et al., 2005).



**Abbildung 58:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Piperlonguminin (22, 500 MHz), Piperylin (23, 400 MHz) und Piperin (21, 500 MHz) in  $\text{DMSO-d}_6$ .

Außerdem weisen alle  $^{13}\text{C}$ -Spektrensätze Signale bei 165 ppm auf, die aufgrund ihres quartären Charakters im HMQC der jeweiligen Carbonylgruppe im Säureamid zugeordnet werden

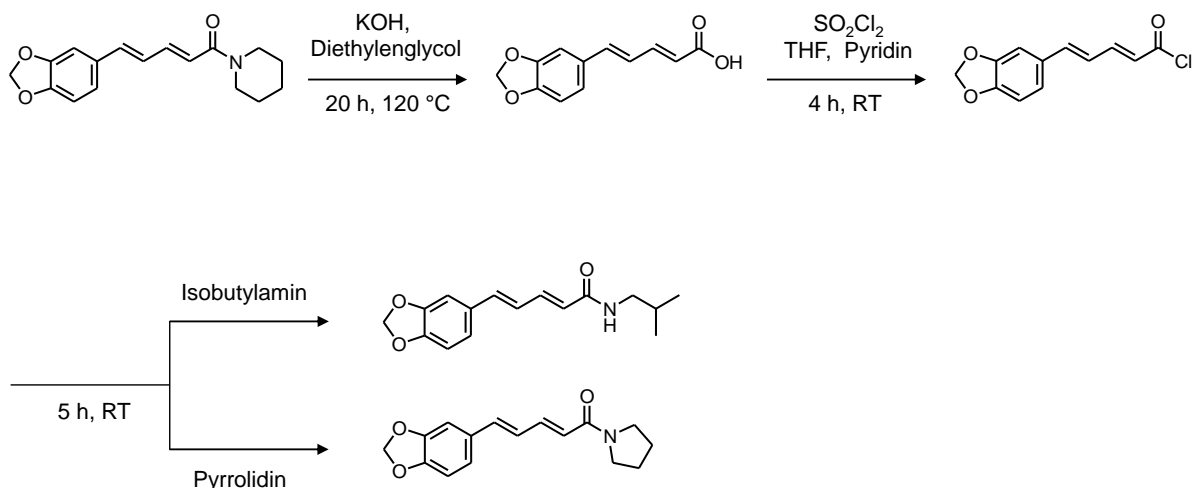
konnten. In den HMBC-Spektren konnten Kopplungen zwischen dem Proton am Kohlenstoffatom C(11) und Kohlenstoffatom C(12) festgestellt werden. Das jeweilige Proton am Kohlenstoffatom C(11) erzeugt im  $^1\text{H-NMR}$  ein Dublett bei der chemischen Verschiebung von  $\sim 6,42$  ppm und einer Kopplungskonstante von 15 Hz. Dieses Dublett konnte durch die Kopplung des Protons mit dem Proton am Kohlenstoffatom H-C(10) im COSY erklärt werden, da in dem entstandenen Doppeldublett des Protons am Kohlenstoffatom H-C(10) die Kopplungskonstante 15 Hz wieder gefunden werden konnte.

Auch aus den Multipletts bei 6.82–6.98 ppm der Protonen H-C(8) und H-C(9) konnten Kopplungskonstanten von 15 Hz herausgelesen werden. Folglich konnten die Konfigurationen der jeweiligen Doppelbindungen mit Hilfe der vicinalen  $^2J_{\text{(H,H)}}$ -Kopplungen zwischen H-C(8,9) und H-C(10,11) der drei Verbindungen mit Hilfe der Kopplungskonstanten ( $\sim 15$  Hz) als jeweils *trans-trans* ständig ermittelt werden (Hesse et al., 2005).

Unterschiede zeigen die drei  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, analog zu den MS-Spektren, bei den drei unterschiedlichen Basen. Der an Position 12 substituierte Rest von Piperylin (**23**) lässt aufgrund seines charakteristischen Kopplungsmusters der Protonen H-C(13a)/ H-C(13b)/ H-C(14a)/ H-C(14b) sowie des koppelnden Spin-Systems im COSY auf Pyrrolidin schließen. Bei dem Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **23** und **21** konnte bei **21** ein zusätzliches Multiplett mit der Intensität von zwei Protonen gefunden werden, welches aufgrund der chemischen Verschiebung bei 1.58 ppm und der Kopplung im COSY zur Position H-C(14a,b), der zusätzlichen Methylengruppe des Piperidins, zugeordnet werden konnte.

Abweichend von **23** und **21** konnte für **22** die Isobutylamidstruktur mit den chemischen Verschiebungen bei 2.96 ppm (t, 1H, H-C(1')) und 0.85 ppm (d, 6H, H-C(3',4')) bestätigt werden. Auch wenn hierdurch das Signal der zwei Methylenprotonen von H-C(1') bei 2.96 ppm zu einem Pseudotriplett aufgespalten wird, ist es doch eigentlich ein Dublett vom Dublett, denn die beiden Kopplungskonstanten von H-C(1') zu H-C(2') und N-H sind identisch. Weiterhin ist das stark aufgespaltene Multiplett bei 1,79 ppm, das zu dem Proton H-C(2') gehört und theoretisch ein tqq ist, sowie das Triplett bei 8.01 ppm (N-H) charakteristisch für die Isobutylamidstruktur des Piperlonguminins.

Um Piperlonguminin und Piperylin abschließend in ihrer Struktur zu bestätigen, wurden diese, wie in Abbildung 59 dargestellt, ausgehend von Piperin synthetisiert.



**Abbildung 59: Syntheseweg zur Darstellung von Piperlonguminin (22) und Piperylin (23).**

Dazu wurde Piperin, in Anlehnung an Venkatasamy et al. (2004) und Becker et al. (2009), alkalisch zur Piperinsäure verseift und anschließend mittels einer modifizierten Methode nach de Paula et al. (2000) mit Thionylchlorid in trockenem Tetrahydrofuran zum Säurechlorid umgesetzt. Im nächsten Schritt wurde Piperinsäurechlorid entweder mit Isobutylamin oder mit Pyrrolidin zu Piperlonguminin beziehungsweise Piperylin überführt. Zur Reindarstellung der Verbindungen für NMR- und LC-MS/MS-Experimente wurden die Säureamide mittels Festphasenextraktion von ihren Edukten abgetrennt und in 98% Reinheit erhalten. Die massen- und kernresonanzspektroskopischen Daten der isolierten Substanzen aus den Fraktionen A1 und A2 sowie der synthetisierten Verbindungen stimmten überein, sodass neben Piperin (21) auch Piperylin (23) und Piperlonguminin (22) eindeutig identifiziert werden konnten. Sämtliche Verbindungen wurden in der Vergangenheit zahlreiche Male aus *Piper nigrum* L. isoliert und in ihrer Struktur bestätigt (z. B.: Oersted, 1820; Landenburg, 1894; Grewe et al., 1970; Hashimoto et al., 1996; Wei et al., 2004; Lin et al., 2007; Okumura et al., 2010).

#### 4.4.2 Identifizierung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in Fraktion B

Zur Isolierung der Scharfstoffe aus Fraktion B wurde, analog zu den Untersuchungen der Fraktion A, ein Aliquot der RP-18-Fraktion mittels RP-HPLC in 11 Subfraktionen aufgetrennt. Die isolierten HPLC-Fraktionen wurden, wie in Abbildung 60 aufgeführt, nummeriert. Die Identifizierung der einzelnen Subfraktionen aus Fraktion B ist im Folgenden beschrieben.

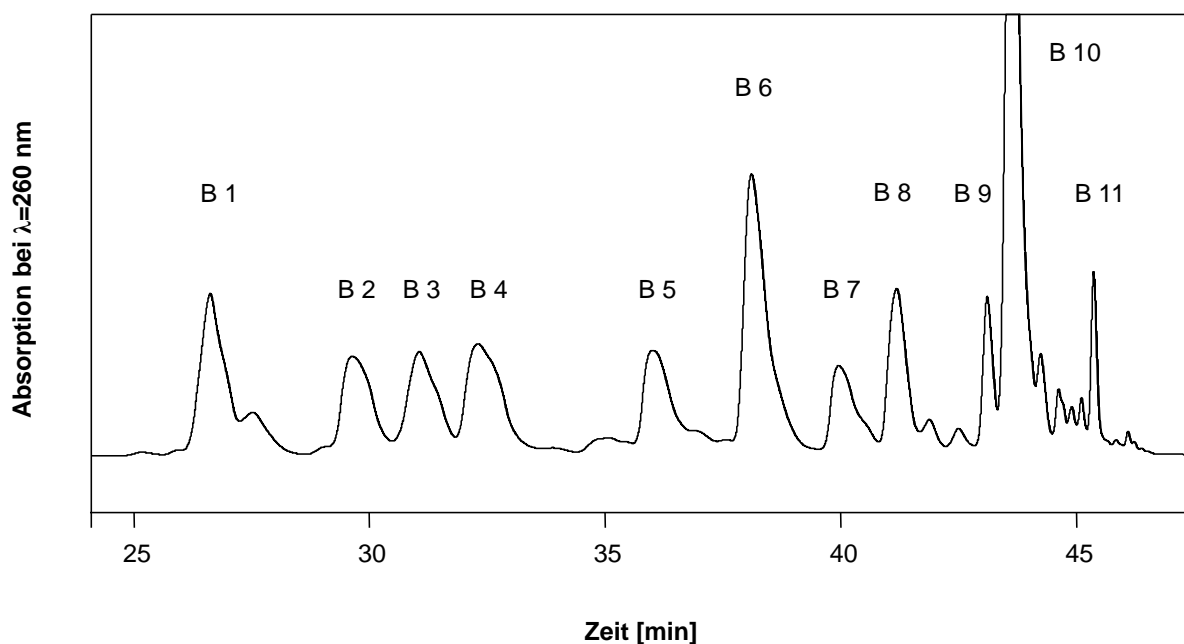


Abbildung 60: RP-HPLC-Chromatogramm ( $\lambda=260$  nm) der Fraktion B des schwarzen Pfefferextraktes.

#### Identifizierung der Fraktionen B1 und B2

Es gelang aus den Fraktionen B1 und B2 jeweils eine scharf wirkende Verbindung präparativ zu isolieren (B1=**24**; B2=**25**). Bei der massenspektrometrischen Überprüfung (ESI<sup>+</sup>-Modus) zeigte die Substanz aus der HPLC-Fraktion B1 ein intensives Quasimolekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  298 (100%) und **25** bei  $[M+H]^+$   $m/z$  312 (100%). Die Betrachtung der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren erbrachte für **24** die Existenz von 18 Kohlenstoffatomen, für **25** dagegen 19. Unter Zuhilfenahme des Protonen- und DEPT-Spektrums ließen sich fünf Methylen- und neun Methin-Gruppen für **24** identifizieren. Die Verbindung aus B2 besaß hingegen eine zusätzliche Methylengruppe bei  $\delta_C$  24.5 ppm [C(17)]. Daneben waren bei beiden Molekülen vier quartäre Kohlenstoffatome zu finden. Die Zahl der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome sowie die ungeraden Molmassen der Substanzen ließen dabei auf die Anwesenheit eines Stickstoffatoms pro Molekül schließen. Demnach lauten die Summenformeln für **24** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> und für **25** C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>. Bei der LC-MS/MS-Analyse der Fraktionen zeigten sich, ähnlich wie bei **21** und **23**, die Abspaltungen der zwei unterschiedlichen Basen, mit Massenverlusten von 71 Da für den Pyrrolidin- (**24**) beziehungsweise 85 Da für den Piperidin-Rest (**25**). Abweichend zum Piperin und seinem Pyrrolidin-Analogen Piperylin zeigten **24** und **25** jeweils eine um 26 Ein-

heiten höhere Molekülmasse. Daher wurde vermutet, dass **24** und **25** die Heptatriensäureanaloge der Verbindungen, Piperolein und Piperettin, darstellen (Abbildung 61).

Zur Bestätigung der Strukturen erfolgte die Synthese von Piperolein (**24**) und Piperettin (**25**) in Anlehnung an ein von Venkatasamy et al. (2004) beschriebenes Verfahren über eine Aldolkondensation von Piperonal an 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin beziehungsweise 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin (Abbildung 61). Zur Darstellung von 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin und 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin wurde dazu zunächst die Carbonylfunktion der Sorbinsäure mit Thionylchlorid (SOCl<sub>2</sub>) in das Säurechlorid überführt. In einem weiteren Schritt erfolgte die Umsetzung des Alkylchlorides mit den Basen Piperidin beziehungsweise Pyrrolidin.

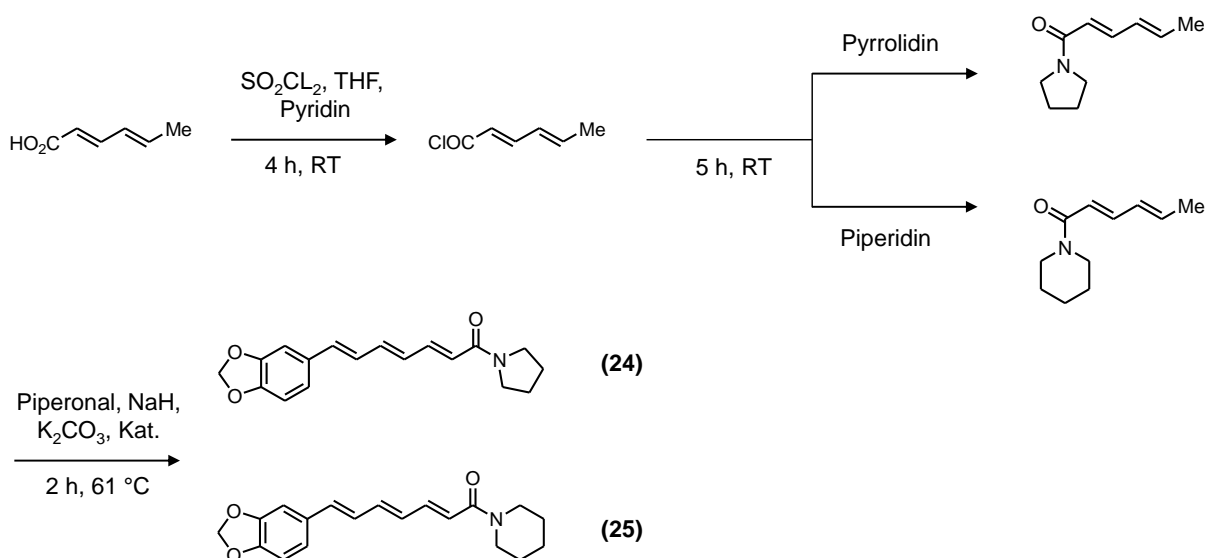


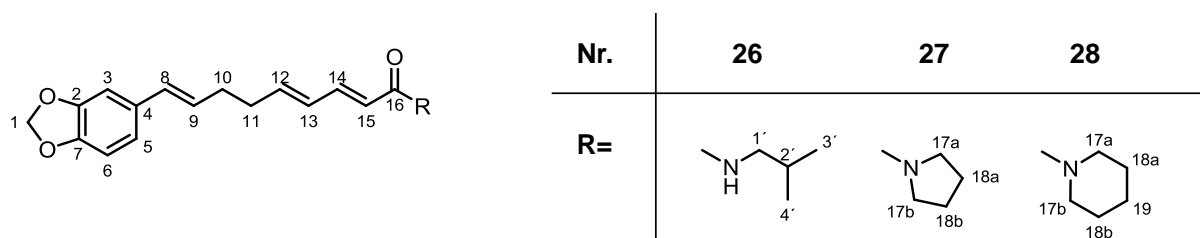
Abbildung 61: Syntheseweg zur Darstellung von Piperolein (**24**) und Piperettin (**25**).

Ein Vergleich der erhaltenen spektroskopischen und chromatographischen Daten der synthetisierten Verbindungen mit den Substanzen aus Fraktion B1 und B2 bestätigte die Vermutung, dass es sich bei diesen Verbindungen um Piperolein (**24**) und Piperettin (**25**) handelt, die beide als Pfefferinhaltsstoffe bekannt sind (z. B. bei Spring und Stark, 1950; Wei et al., 2004).



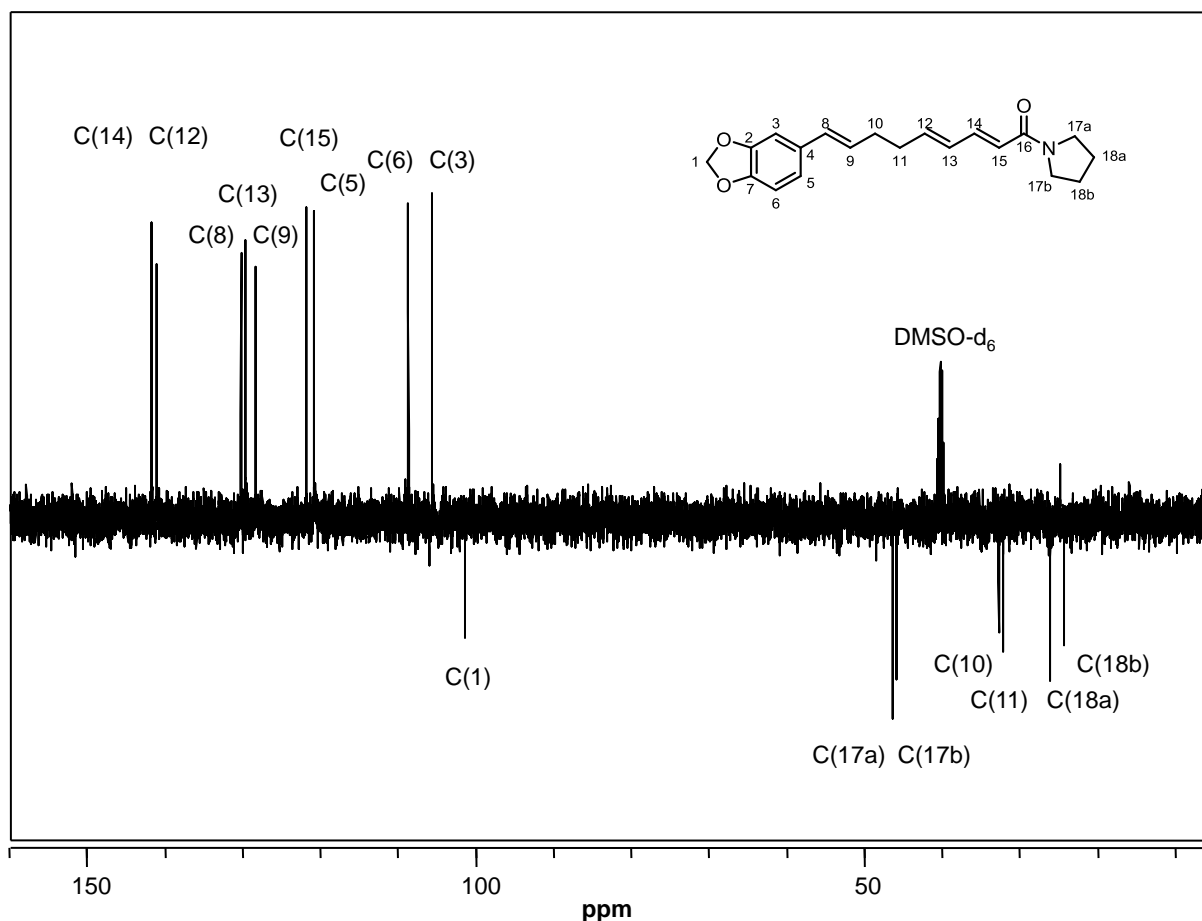
### Identifizierung der Fraktionen B3–B5

Die HPLC-Fraktionen B3–B5 aus der SPE Fraktion B, aus denen die Verbindungen **26–28** gewonnen werden konnten, wiesen alle identische UV-Spektren mit Maxima bei  $\lambda_{\max} = 264$  nm auf. Auch im MS/MS-Spektrum war diesen Verbindungen ein Tochterion bei  $m/z$  135 gemeinsam, sodass von einer Benzodioxol-Teilstruktur ausgegangen werden konnte (Sun et al., 2007; Friedman et al., 2008). Für das Piperin-Analogum **26** wurde mittels LC/MS ein Molekulargewicht von 327 Da ermittelt, dessen ungerade Masse ebenfalls auf ein Stickstoffatom im Molekül hinweist. Diese Vermutung wurde durch das  $^1\text{H-NMR}$ -Experiment bestätigt, aus dem ein Triplett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.92 ppm mit dem Integral von einem Wasserstoffatom, das charakteristisch ist für acide NH-Gruppen, ausgemacht werden konnte. Aufgrund der chemischen Verschiebungen bei  $\delta_{\text{H}}$  0.83 ppm [d, 6H,  $J=7.2$  Hz, H-C(3', 4')],  $\delta_{\text{H}}$  1.66–1.70 ppm [m, 1H, H-C(2')],  $\delta_{\text{H}}$  2.93 ppm [t, 2H,  $J=6.0$  Hz, H-C(1')] und  $\delta_{\text{H}}$  7.92 ppm [t, 1H,  $J=5.7$  Hz, N-H] konnte der Verbindung **26** aus B3 die Isobutylamin-Teilstruktur zugeordnet werden. Weiterhin konnten im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Benzodioxol-Teilstruktur der Verbindung durch das charakteristische AMX-Spinsystem im tiefen Feld der aromatischen Protonen des B-Rings bestätigt werden. Typisch für eine Benzodioxol-Teilstruktur wurde für das Proton am Kohlenstoffatom H-C(5) neben der Long-Range-Kopplung zu dem Kohlenstoffatom C(3) auch eine spezifisch kleine Kopplungskonstante von 1.2 Hz festgestellt. Diese Größe der Kopplungskonstante ist charakteristisch für eine Kopplung in Metastellung in einem aromatischen Ring (Hesse et al., 2005). Im olefinischen Bereich waren weitere vier Signalgruppen zu erkennen, die neben der *trans/trans*-ständigen 13,15-Dienamidstruktur auch der *trans* konfigurierten Doppelbindung zwischen C(8) und C(9) zugeordnet werden konnten. Abweichend zu den Verbindungen aus Fraktion B1 und B2 konnten zwei weitere Methylengruppen zwischen den soeben beschriebenen Doppelbindungen mittels  $^{2,3}\text{J}_{\text{C,H-HMQC}}$ - und  $^1\text{J}_{\text{H,H-COSY}}$ -Experimenten ausgemacht werden. Die eindeutige Zuordnung der Kohlenstoff- und Wasserstoffsignale erfolgte mittels  $^1\text{J}_{\text{C,H-HMQC}}$ - und  $^{2,3}\text{J}_{\text{C,H-HMQC}}$ -Experimenten und erbrachte die in Abbildung 62 abgebildete Struktur des Retrofractamides A (**26**), das auch von Park et al. (2002) oder von Okumura et al. (2010) aus *Piper nigrum* L. isoliert wurde.



**Abbildung 62: Strukturen von Retrofractamid A (26), 1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin (27) und Dehydropiperonalin (28).**

Das breitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Verbindung aus Fraktion B4 (**27**) zeigte, genauso wie Retrofractamid A (**26**), insgesamt 20 Signale zwischen  $\delta_{\text{C}}$  24.3 ppm und 164.2 ppm. Die Integration der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum lieferte jedoch mit 25 zwei Wasserstoffatome weniger. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Verbindung **27** brachte ähnliche Resonanzsignale wie das des Retrofractamids A hervor. Insbesondere die Benzodioxol- sowie die Methyl- und Methingruppen der aliphatischen Teilstruktur von C(8) bis C(15) konnten analog zugeordnet werden. Ein Vergleich der mittels homo- und heteronuklearen  $\delta, \delta$ -Korrelationsexperimenten (COSY, HMBC, HMQC) erhaltenen NMR-Signale erbrachte, dass die Verbindung B4 weder einen Isobutylaminrest noch ein Proton am Stickstoff aufweist. Stattdessen wurden zwei zusätzliche Triplets bei den chemischen Verschiebungen  $\delta_{\text{H}}$  3.22 ppm, [t, 2H,  $J=6.8$  Hz, H-C(17 b)] und  $\delta_{\text{H}}$  3.47 ppm [t, 2H,  $J=6.8$  Hz, H-C(17a)] wie auch ein Multiplett bei  $\delta_{\text{H}}$  1.73–1.91 ppm [m, 4H, H-C(18a, b)] beobachtet. Aufgrund des charakteristischen Kopplungsmusters dieser Protonen im COSY- und im HMBC-Spektrum konnten die Protonen dem am Kohlenstoffatom C(16) substituierten Pyrrolidinring zugeordnet werden. Besonders die Methylengruppen C(17a,b) und C(18a,b) des Pyrrolidinringes waren gut im DEPT-Spektrum als Methylen-Gruppen zu erkennen (Abbildung 63). Auf Basis der ermittelten NMR und MS-Daten, die mit den Literaturdaten von Wei et al. (2004) übereinstimmten, konnte die Verbindung aus der Fraktion B4 somit als 1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin (**27**) identifiziert werden.



**Abbildung 63:** DEPT-Spektrum von 1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin (**27**).

Die dritte als farbloser Feststoff isolierte Verbindung (**28**) lieferte ein Quasimolekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  340 und somit eine um 12 Da höhere Masse als Retrofractamid A (**26**). Eine Abspaltung von 85 amu im  $MS^2$  sowie der Vergleich der  $MS/MS$ -Daten mit Literaturspektren (Sun et al., 2007) ließ vermuten, dass es sich bei dieser Substanz um Dehydropiperonalin, ein Piperidin-Analogon der Verbindung **26**, handelt. Zur weiteren Strukturcharakterisierung und um den vorgeschlagenen Säurerest zu bestätigen, wurden diverse 1D- und 2D-NMR-Experimente durchgeführt. Das  $^1H$ -NMR-Spektrum der aus Fraktion B5 isolierten Verbindung zeigte zehn Resonanzsignale, die nicht nur mit der Benzodioxol-Teilstruktur, sondern auch mit dem aliphatischen Zwischenstück von H-C(8) bis H-C(15) der Substanzen **26** und **27** korrelierten. Zusätzlich wurden drei Protonensignale bei  $\delta_H$  1.35–1.68 ppm [m, 2H, H-C(19)],  $\delta_H$  1.55–1.61 ppm [m, 4H, H-C(18a, b)] und  $\delta_H$  3.45–3.50 ppm [m, 4H, H-C(17a, b)] von fünf Methylengruppen detektiert, deren  $^1H/^1H$ -Spinsystem mit der Protonenfolge H-C(17a)/H-

C(18a)/H-C(19)/H-C(18b)/ H-C(17b) im COSY-Experiment dem vermuteten Pyrrolidinrest entsprach und die in Abbildung 62 dargestellte Struktur **28** bestätigte. Dehydropipernonalin (**28**) wurde auch von Lee et al. (2006) aus einem Methanolextrakt der getrockneten Pfefferfrüchte (*Piper nigrum* L.) isoliert und mittels NMR-spektroskopischen Techniken analysiert.

### **Identifizierung der Fraktion B7**

Wie die zuvor beschriebenen Amide wurde die Verbindung **29** aus Fraktion B7 präparativ isoliert und als weiße Kristalle gewonnen. Das UV-Spektrum dieser Substanz wich mit einem Maximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 268$  nm von denen der Säureamide **21–23** ab und deutete auf ein Monoenamid hin. Bei der LC/MS-Analyse zeigte **29** ein intensives Ion des Typs  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  342 und die typische Abspaltung von 85 amu im MS/MS-Spektrum deutete auf eine Piperidinbase im Molekül hin. Anhand des Benzodioxolfingerprints im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war deutlich zu erkennen, dass diese Verbindung ein Analogon zu den bisher charakterisierten Säureamidstrukturen darstellte. Neben der Säureamidfunktion konnte vor allem auch die Piperidin-Teilstruktur mit Signalen bei  $\delta_{\text{H}}$  1.36–1.48 ppm, 1.48–1.61 ppm und 3.43 ppm der Verbindungen bestätigt werden. Auch das Kohlenstoffatom C(16) bei  $\delta_{\text{C}}$  164 ppm sowie dessen quartärer Charakter im HMQC bestätigte die Amidbindungen der Substanz. Im olefinischen Resonanzbereich des Protonenspektrums konnten die Signale der Protonen H-C(14) und H-C(15) auffindig gemacht werden, die jeweils mit einer Kopplungskonstante von 15.1 Hz, entsprechend einer *E*-Konfiguration der Doppelbindungen, miteinander koppelten. Die intensive heteronucleare Kopplung der Protonen H-C(14) und H-C(15) zum C(16) im HMBC- sowie die homonucleare  $^1\text{H-}^1\text{H}$ -Kopplung im COSY-Spektrum von H-C(14) zur Methylengruppe H-C(13) verifizierte die Monoenamidstruktur. Für das quartäre Kohlenstoffatom an Position C(4) wurde außerdem eine Long-Range-Kopplung mit den olefinischen Protonen der Kohlenstoffatome H-C(8) und H-C(9) im HMBC festgestellt. Die Kopplungskonstante von 15.6 Hz zwischen den Protonen H-C(8) und H-C(9) zeigte an, dass diese miteinander *trans* verknüpft waren. Alle weiteren Kopplungen der Methylengruppen H-C(10)-H-C(13) untereinander wurden ebenfalls aus den COSY- und HMBC-Spektren herausgelesen und sind in Abbildung 64 aufgeführt.

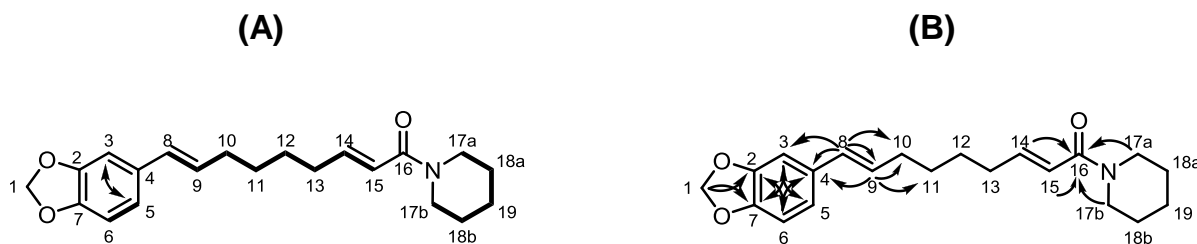


Abbildung 64: Die wichtigsten COSY- (A) und HMBC-Kopplungen (B) von Piperonalin (**29**).

Abweichend von den bisher beschriebenen Amiden **26–28** wies **29** in der Alkylketten-Teilstruktur eine Doppelbindung weniger auf. Bei der Verbindung **29** handelte es sich also um Piperonalin, dessen Struktur in Abbildung 64 dargestellt ist. Während Wu et al. (2004) und Lee et al. (2006) Piperonalin aus *Piper longum* L. isolierten, konnten Wei et al. (2004) **29** aus den Wurzeln von *Piper nigrum* L. spektroskopisch identifizieren.

#### Identifizierung der Fraktion B8

Analog zu Retrofractamid C und Piperonalin wurde auch die Verbindung (**30**) aus B8 spektroskopisch in ihrer Struktur geklärt. Das LC/MS-Spektrum zeigte neben dem Ion  $[2M+H]^+$  bei  $m/z$  687 (100%) auch das Quasimolekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  344 (86%). Im Tochterionenspektrum wurde das Ion bei  $m/z$  259 (100%) beobachtet, das dem für Pyrrolidinabspaltungen typischen Massenverlust von 85 amu entspricht  $[M+H-85]^+$ .

Da das breitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum insgesamt 21 Signale zwischen  $\delta_{\text{C}}$  24.6 ppm und 170.5 ppm zeigte und die Integration der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum 29 Wasserstoffatome lieferte, konnte die Summenformel  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_3$  bestimmt werden. Sowohl diese Summenformel als auch die Massendifferenz von zwei Da entsprach Piperolein B (**30**), dem Dihydroderivat von Piperonalin (**29**).

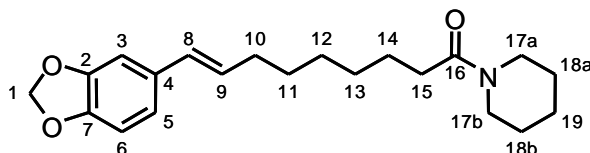


Abbildung 65: Struktur von Piperolein B (**30**).

Der Vergleich des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums mit dem DEPT-Experiment ermöglichte die Zuordnung von 12 Methylenignalen, fünf Methinignalen sowie von den Signalen vier quartärer Kohlenstoffatome. Anders als bei Pipernonalin wies Verbindung **30** neben den drei Methin-gruppen des Bezodioxolringes nur eine weitere Doppelbindung auf. Entsprechend der zuvor erwähnten Doppelbindung wurde aus dem olefinischen Resonanzbereich nicht nur ein Multiplett bei  $\delta_{\text{H}}$  6.08–6.18 ppm [1H, H-C(9)], sondern auch ein Dublett bei  $\delta_{\text{H}}$  6.29 ppm [1H,  $J=15.2$  Hz, H-C(8)] herausgelesen, deren Kopplungskonstante auf eine *trans*-Verknüpfung schließen ließ. Die Konnektivität der Protonen H-C(8) und H-C(9) mit C(4) der Benzodioxol-teilstruktur im HMBC ließ eine eindeutige Bestimmung der Lage der Doppelbindung zu und führte zu der in Abbildung 65 abgebildeten Struktur des Piperolein B (**30**). Die spektroskopischen Daten korrelierten gut mit den von Wei et al. (2004) und Lee et al. (2006) publizierten Werten.

#### 4.4.3 Identifizierung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in Fraktion C

Zur präparativen Isolierung und Strukturaufklärung der scharf und tingelnd wirkenden Verbindungen des ethanolischen Pfefferextraktes, wurde ein Aliquot der SPE-Fraktion C aus 4.4 mittels RP-HPLC in 9 Subfraktionen aufgetrennt und wie in Abbildung 66 aufgeführt nummeriert. Die entwickelte Isolierungsmethode gestattete es, die im Folgenden aufgeführten Verbindungen mittels diverser spektroskopischer Techniken zu identifizieren.

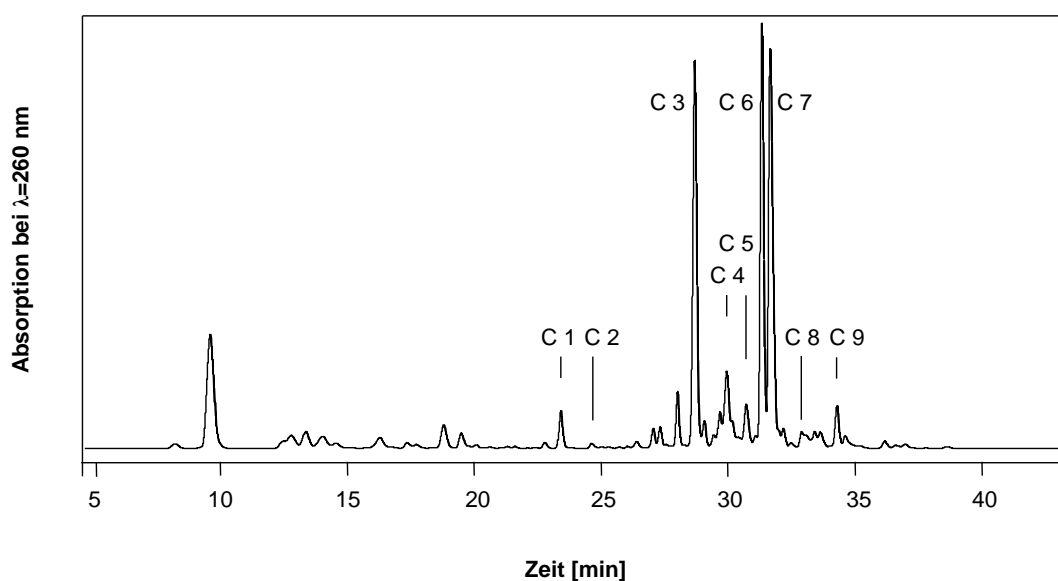


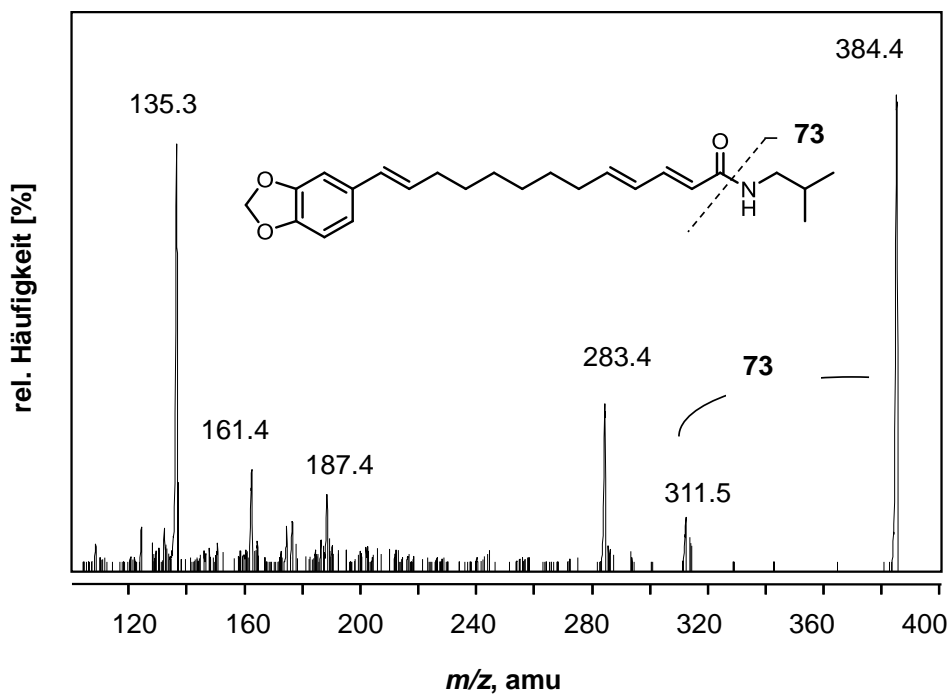
Abbildung 66: RP-HPLC-Chromatogramm ( $\lambda = 260$  nm) der Fraktion C des schwarzen Pfefferextraktes.

### Identifizierung der Fraktionen C1 und C2

Aus den Fraktionen C1 und C2 gelang es, jeweils eine scharf wirkende Verbindung zu isolieren, deren HPLC/DAD-Analyse ähnliche Absorptionsspektren mit Maxima im Bereich von  $\lambda_{\text{max}} = 260$  nm hervorbrachte. Die LC-MS Analyse ergab für die beiden Verbindungen (**31** und **32**) Quasimolekülonen  $[M+1]^+$  bei  $m/z$  von 384 für die Verbindung **31** aus Fraktion C1 und  $m/z$  382 für die Verbindung **32** aus Fraktion C2. Eine Abspaltung von 73 Da für **31** und eine von 71 Da für **32** wurde ermittelt, sodass in beiden Spektrensätzen die Tochterionen  $m/z$  311 zu finden waren, die jeweils mit der Abspaltung eines Isobutylamin- beziehungsweise Pyrrolidinrestes korrelierten (Abbildung 67). Weiterhin konnten in beiden MS/MS-Spektren, die in Abbildung 67 aufgeführt sind, die charakteristischen Methylbenzodioxol- und Propenylbenzodioxolionen bei  $m/z$  135 und  $m/z$  161, die bereits von Sun et al. (2007) diskutiert wurden, beobachtet werden. Daraus ergaben sich folglich Molekulargewichte von 383 Da für die Verbindung aus Fraktion C1 und 381 Da für die Verbindung aus Fraktion C2, die gut mit den Strukturen von Guineensin (**31**) und Brachymid A (**32**) übereinstimmten (Abbildung 68).

Anhand des Benzodioxolfingerprints in den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren war deutlich zu erkennen, dass beide Verbindungen Analoga zu den bisher charakterisierten Pfefferstrukturen darstellten. Neben der Säureamidfunktion konnte vor allem auch die Isobutylamin- beziehungsweise Pyrrolidin-Teilstruktur der beiden Verbindungen bestätigt werden. Analog den zuvor beschriebenen 2,4-Dienamiden ließen sich auch hier aus den Signalen der Protonen H-C(16) bis H-C(19) zwei *trans*-Verknüpfungen ( $J=15$  Hz und  $J=16$  Hz) herauslesen. Weiterhin konnte in beiden  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren eine weitere olefinische Doppelbindung mit chemischen Verschiebungen von  $\delta_{\text{H}}$  6.02–6.12 ppm [m, 2H,  $J=15.9$ , H-C(9, 16)] und  $\delta_{\text{H}}$  6.31 ppm [d, 1H,  $J=16.1$  Hz, H-C(8)] für C1, beziehungsweise  $\delta_{\text{H}}$  6.06–6.12 ppm [m, 2H, m,  $J=15.8$  Hz, H-C(9, 16)] und  $\delta_{\text{H}}$  6.28 ppm [d, 1H,  $J=16.0$  Hz, H-C(8)] für C2 beobachtet werden. Anhand der beiden Kopplungskonstanten  $J=15.9$  Hz und  $J=15.8$  Hz wurde auf die jeweilige *trans*-Konfiguration der Doppelbindungen geschlossen. Die Konnektivität der Protonen H-C(8) und H-C(9) mit C(4) der Benzodioxol-Teilstruktur im HMBC ließ, analog zu Piperolein B, eine eindeutige Bestimmung der Lage der Doppelbindungen zu.

(A)



(B)

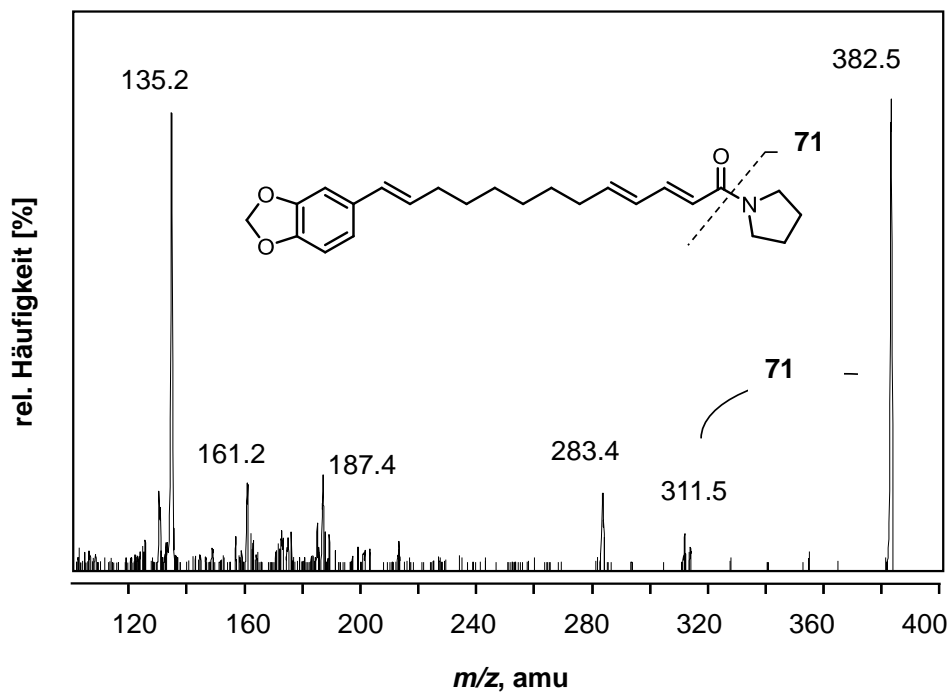
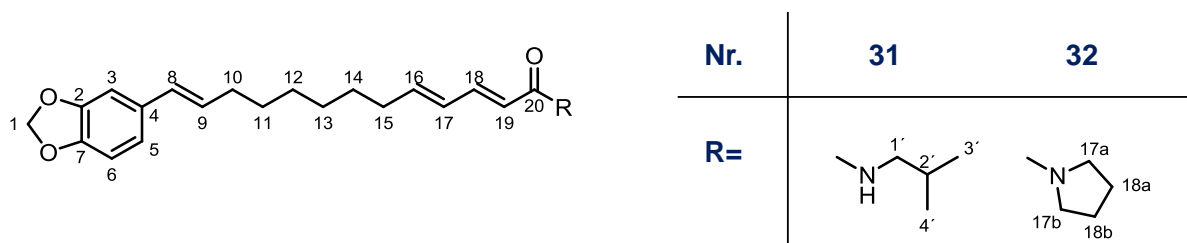


Abbildung 67: MS/MS-Spektren von Guineensin (A, 31) und Brachyamid A (B, 32).



Die Kreuzsignale sowohl von H-C(9) zu H-C(10) wie auch von H-C(16) zu H-C(15) erlaubten den ersten Schritt für die Zuordnung der Alkylketten-Teilstruktur H-C(10–15). Kennzeichnend für Alkyl-Teilsysteme führten starke Kreuzsignale im homonuclearen COSY- genauso wie im heteronuclearen HMBC-Experiment zur Zuordnung der restlichen sechs Methylen-Gruppen.



**Abbildung 68: Strukturen von Guaneensin (31) und Brachyamid A (32).**

Durch die Übereinstimmung der massenspektrometrischen und NMR-Daten mit Werten aus der Literatur (Koul et al., 1988; Tsukamoto et al., 2002; Park et al., 2002; Morikawa et al.; 2004, Wu et al., 2004 und Sun et al., 2007) konnten Verbindung **31** und **32** als Guaneensin und Brachyamid A in ihrer Struktur bestätigt werden.

### **Identifizierung der Fraktionen C3, C4 und C5**

Die während der HPLC/DAD-Messungen aufgenommenen UV-Spektren der Substanzen **33a/b** bis **35a/b** wiesen identische Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}} = 260$  nm auf, die charakteristisch sind für 2,4-Dienamid-Chromophore. Die Strukturaufklärung der Pfefferamide **33a/b** bis **35a/b** durch spektroskopische Methoden soll zunächst exemplarisch an dem größten Peak C4 (ein Gemisch aus Verbindung **33a** und **33b**) gezeigt werden.

Bei der massenspektrometrischen Überprüfung (ESI<sup>+</sup>-Modus) zeigte die Substanzmischung aus der HPLC-Fraktion C3 ein intensives Quasimolekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  334 Da und  $[M+Na]^+$  bei  $m/z$  356 Da. Die ungerade Molmasse der Substanzen sowie die Ergebnisse der hochauflösenden Massenspektroskopie ( $m/z$  334.3110  $[M+H]^+$ ; C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>3</sub>) induzierten für beide Verbindungen die gleiche Masse sowie die Anwesenheit eines Stickstoffatoms pro Molekül.

Die NMR-spektroskopische Analyse der Mischung aus **33a** und **33b** erbrachte für beide Substanzen identische  $^1\text{H}$ -NMR-Verschiebungen und lediglich geringfügige Verschiebungsänderungen im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum. Exemplarisch soll im Folgenden zunächst die mengenmäßig dominierende Verbindung **33a** vorgestellt werden.

Das breitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte 22 dominierende Signale zwischen  $\delta_{\text{C}}$  13.8 ppm und 165.2 ppm und die Integration der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum lieferte 39 Wasserstoffatome. Das breite Triplet bei  $\delta_{\text{H}}$  7.91 ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum mit dem Integral von einem Wasserstoffatom ist typisch für acide NH-Gruppen und weit ins Tieffeld verschoben. Unter Berücksichtigung der Molekülmasse von 333 Da wurde damit die Summenformel  $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{NO}$  berechnet, welche mit der in Abbildung 69 dargestellten Struktur korreliert.

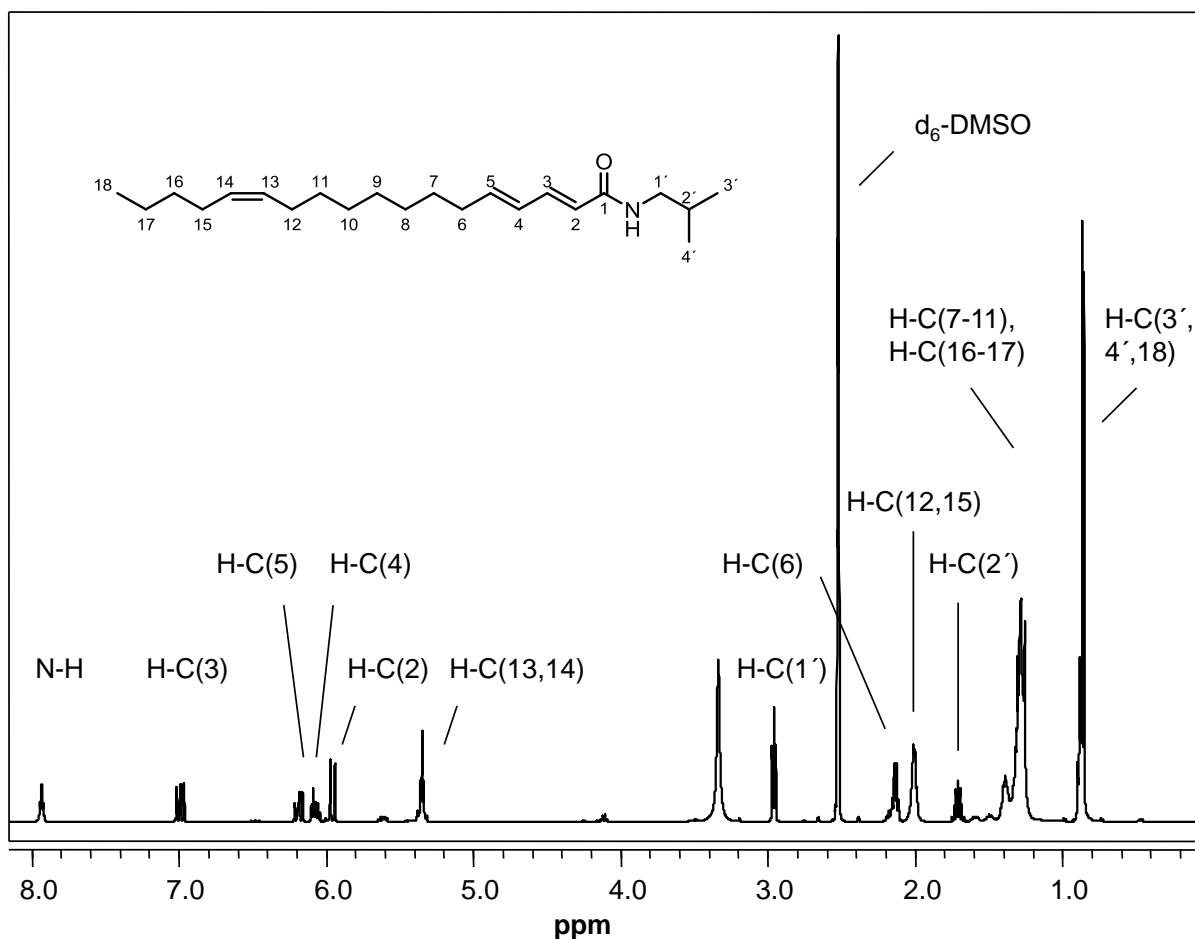


Abbildung 69: Struktur und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von (2E,4E,13Z)-N-Isobutyl-octadeca-2,4,13-trienamid (**33a**), isoliert aus C3.

In Abbildung 69 ist weiterhin das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung dargestellt, aus dem sich drei terminale Methylgruppen bei  $\delta_{\text{H}}$  0.83 ppm und  $\delta_{\text{H}}$  0.83–0.87 ppm, zwölf Methylen-signale in der Region von  $\delta_{\text{H}}$  1.22–1.31 ppm und drei disubstituierte Doppelbindungen im olefinischen Bereich herauslesen ließen.

Ausgehend von den Resonanzen bei  $\delta_{\text{H}}$  0.83 ppm [d, 6H,  $J=6.6$  Hz, H-C(3',4')],  $\delta_{\text{H}}$  1.62–1.73 ppm [m, 1H, H-C(2')],  $\delta_{\text{H}}$  2.93 ppm [t, 2H,  $J=6.6$  Hz, H-C(1')] und  $\delta_{\text{H}}$  7.91 ppm [t, 1H,  $J=5.6$  Hz, N-H] konnte der Verbindung **33a** aus C3 zunächst die Isobutylamin-Teilstruktur, wie bereits bei den Piperinanaloga vorgestellt, zugeordnet werden. Sowohl das Signal der Carbonylgruppe bei  $\delta_{\text{C}}$  165.2 ppm (C(1)) im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum und dessen quartärer Charakter im HMQC als auch das zu einem Triplet aufgesplattene Proton der Amidbindung bei  $\delta_{\text{H}}$  7.91 ppm [t, 1H,  $J=5.6$  Hz, N-H] bestätigten die offenkettige Säureamidstruktur. Besonders die Verknüpfung des Isobutylaminrestes mit dem Fettsäurerest über eine Säureamidbindung waren gut aus den COSY- und HMBC-Spektren herauszulesen (vgl. Abbildung 70). Nicht nur die intensiven Kopplungen des Protons an Position H-N zu H-C(1') im COSY, sondern auch die heteronuclearen Kopplungen von H-C(1'), H-N, H-C(2) sowie H-C(3) zu C(1) sind hier hervorzuheben.

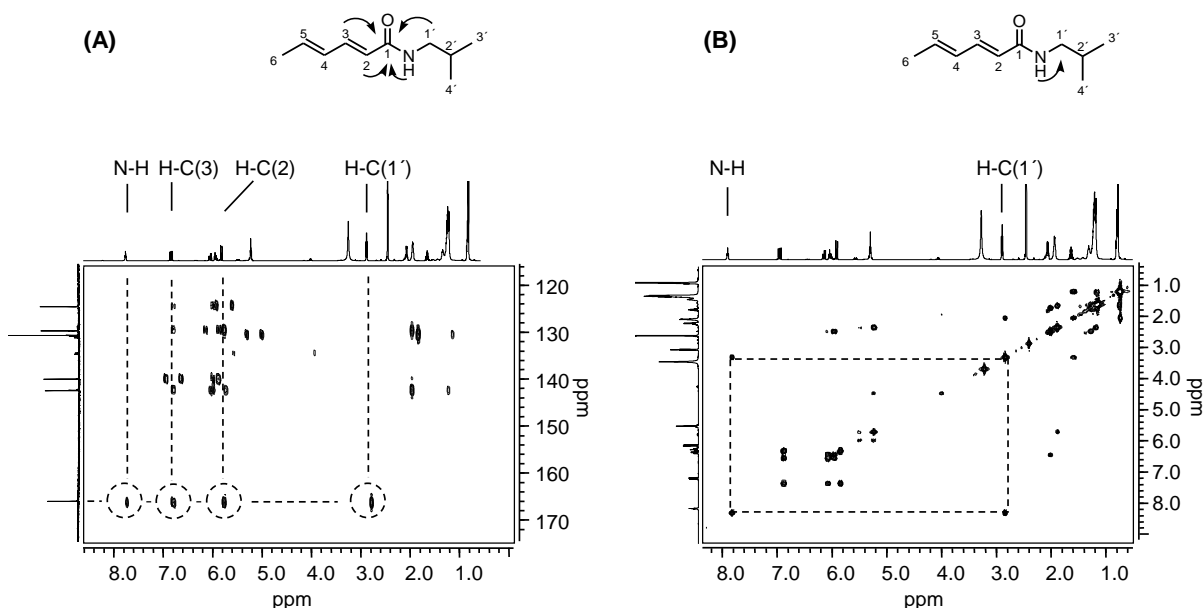


Abbildung 70: Ausschnitte aus den HMBC- (A) und COSY-Spektren (B) der Verbindung (**33a**) aus Fraktion C3.

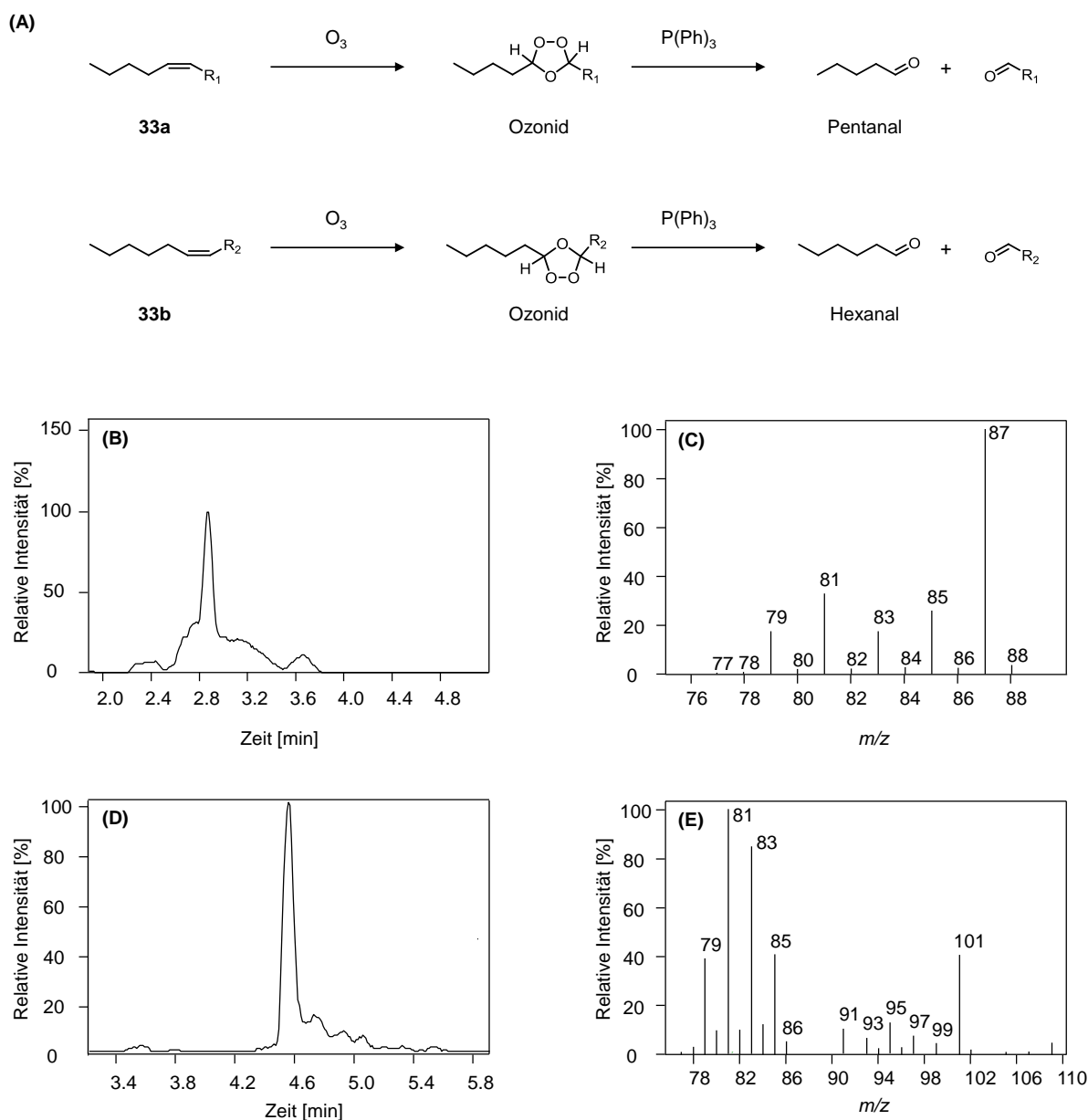
Für die Identifizierung des Fettsäurerestes wurde die Carboxylfunktion als Startpunkt gewählt. Die intensive heteronucleare Kopplung der olefinischen Protonen H-C(2) und H-C(3) zum C(1) im HMBC- sowie die homonucleare  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Kopplung im COSY-Spektrum von H-C(3) zu H-C(4) verifizierten die 2,4-Dienamidstruktur in direkter Nachbarschaft zu der Säureamidfunktion. Aufgrund der hohen Kopplungskonstanten der vier olefinischen Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  5.92 ppm [d, 1H,  $J=15.5$  Hz, H-C(2)],  $\delta_{\text{H}}$  6.00–6.07 ppm [m, 1H, H-C(5)],  $\delta_{\text{H}}$  6.15 ppm [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.5$  Hz, H-C(4)],  $\delta_{\text{H}}$  6.96 ppm [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.5$  Hz, H-C(3)] wurde auf deren *trans/trans*-Konfiguration geschlossen. Wie es für  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppen charakteristisch ist, wurde das Signal von H-C(3) durch den elektronenziehenden Einfluss der Carbonylgruppe bei  $\delta_{\text{H}}$  6.96 ppm sehr weit ins Tieffeld verschoben. Durch die Aufspaltung von H-C(6) zum Dublett vom Triplet [  $J=7.3$  Hz ] war eine weitere Doppelbindung zwischen H-C(6) und H-C(7) ausgeschlossen. Typisch für langkettige Alkylsysteme koppelten die Methylengruppen im HMBC- und COSY-Spektrum von H-C(6) bis H-C(12). Das Pseudotriplett bei  $\delta_{\text{H}}$  5.31 ppm [pt, 2H,  $J=4.9$  Hz, H-C(13, 14)] deutete neben den *trans*- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -olefinischen Protonen noch auf ein weiteres konjugiertes Doppelbindungssystem mit abweichender Konfiguration im hinteren Teil der Verbindung.

Die Aufspaltung der Protonen an Position H-C(13) und H-C(14) zu einem Pseudotriplett im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist durch deren Kopplungen zu den jeweils benachbarten  $\text{CH}_2$ -Gruppen zu erklären, denn die  $^1J$ -Kopplung beträgt circa die Hälfte der  $^3J$ -*cis*-Kopplung, sodass beide Kopplungsanteile der  $^3J$ -Gruppe zusammenfielen.

Das Kohlenstoffatom bei  $\delta_{\text{C}}$  13.8 ppm und das Multiplet bei  $\delta_{\text{H}}$  0.83–0.87 ppm wurde im HMQC-Spektrum eindeutig als Methylgruppe C(18) identifiziert. Ausgehend von dieser an eine langkettige Alkylkette gebundene Methylgruppe koppelten die Signale der Methylengruppen H-C(17) bis H-C(15) sowohl im homonuclearen COSY- als auch im heteronuclearen HMBC-Spektrum charakteristisch miteinander.

Zur Verifizierung der Position der *cis*-ständigen Doppelbindung an Position C(13)/C(14) wurde in Anlehnung an Bauer (2002) Fraktion C3 mit Ozon behandelt. Die über mehrere Stufen entstehenden Ozonide wurden reduktiv mit Triphenylphosphin gespalten und die resultierenden Aldehyde abschließend mittels GC-MS identifiziert (Becker et al., 2009). Das bei der massenspektrometrischen Messung detektierte Pentanal ermöglichte die eindeutige Zuordnung der Doppelbindungsposition zwischen Kohlenstoffatom C(13) und C(14) (Abbildung 71). Neben dem Pentanal wurde zusätzlich Hexanal identifiziert. Beide Verbindungen lagen im Verhältnis 4,6:1 (Pentanal:Hexanal) vor. Um zu überprüfen, ob bei der Ozonolyse von **33a/b** beide Aldehyde gebildet wurden, wurde *cis*-Vaccensäure als Referenzsubstanz analog mit Ozon umgesetzt. Da aus der Ozonisierung der *cis*-Vaccensäure lediglich Heptanal her-

vorging, wurde davon ausgegangen, dass Fraktion C3 neben Verbindung **33a**, bei der die *cis*-ständige Doppelbindung an Position C(13)/C(14) vorliegt, zusätzlich Substanz **33b**, bei der die Doppelbindung an Position C(12)/C(13) zu finden ist, beinhaltet.



**Abbildung 71: Ozonolyse von 33a/b (A) und GC-MS-Chromatogramme mit den dazugehörigen Massenspektren (C1; Isobutan) von Pentanal (B und C) sowie von Hexanal (D und E).**

Die zusätzlich zu findenden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale bei  $\delta_{\text{C}}$  31.1 ppm [C(16b)] und  $\delta_{\text{C}}$  22.1 ppm [C(17b)] bestätigten die Anwesenheit von **33b** in Fraktion C3. Auch die Verhältnisse nach Integration der  $^{13}\text{C}$ -Signale der Positionen C(16a) und C(16b) in einem komplett relaxierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bestätigten das 4,5:1 Verhältnis von **33a** zu **33b** in der Fraktion C3 (Abbildung 72).

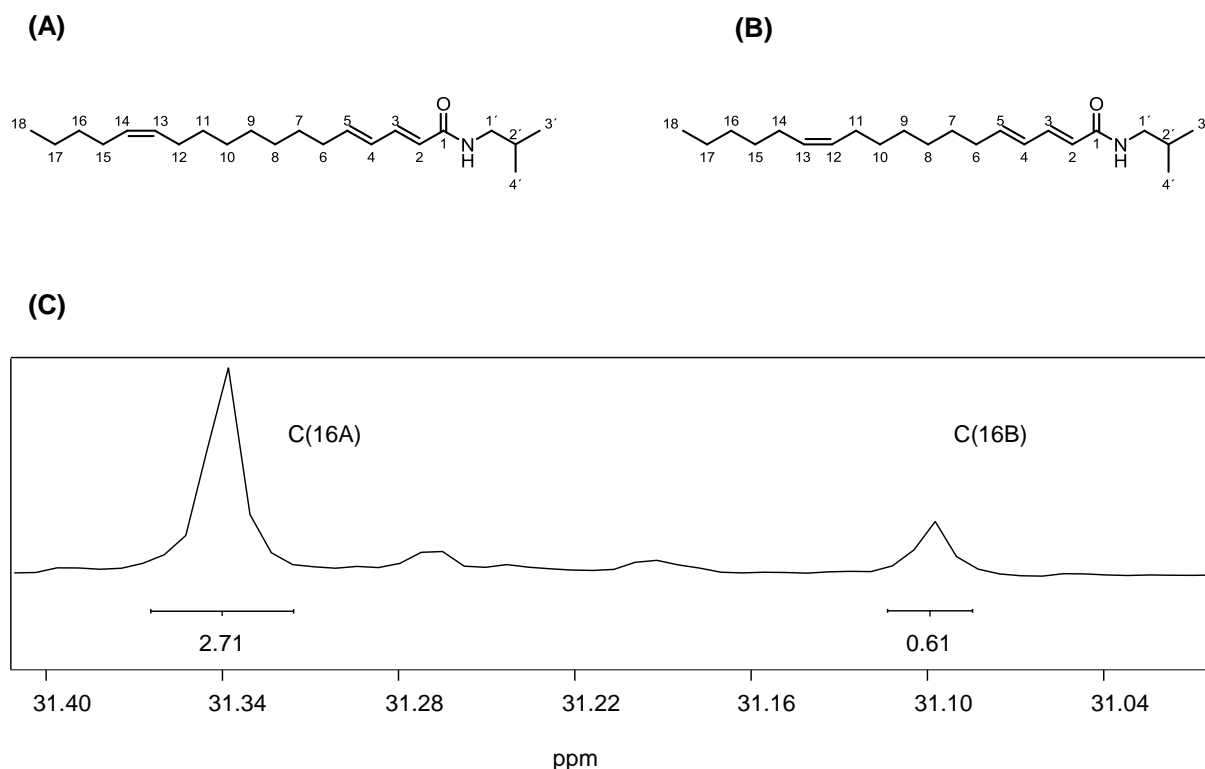
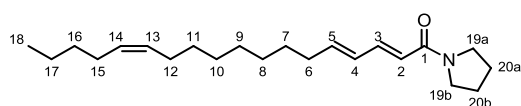
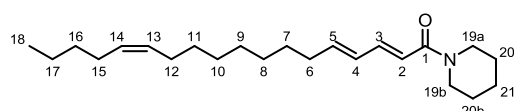
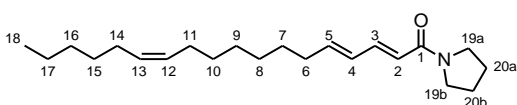
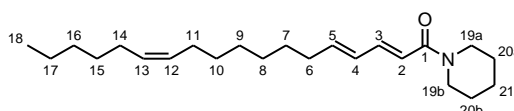


Abbildung 72: Strukturen von  $(2E,4E,13Z)$ -N-Isobutyl-octadeca-2,4,13-trienamid (A, **33a**) und  $(2E,4E,12Z)$ -N-Isobutyl-octadeca-2,4,12-trienamid (B, **33b**) sowie einem Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum beider Verbindungen, das die Integration der  $^{13}\text{C}$ -Signale an Position C(16) von A und B wiedergibt .

Bei den Verbindungen aus Fraktion C3 handelte es sich folglich um  $(2E,4E,12Z)$ -N-Isobutyl-octadeca-2,4,12-trienamid (**33b**), das bereits zuvor von Wei et al. (2004) aus schwarzem Pfeffer isoliert wurde, sowie um  $(2E,4E,13Z)$ -N-Isobutyl-octadeca-2,4,13-trienamid (**33a**), das erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit in schwarzem Pfeffer identifiziert wurde.

Die Molekülmassen der isolierten Substanzen **34a/b** und **35a/b** aus C4 und C5 wurden in der HPLC-MS Analyse über die Quasimolekülonen  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  332 [100%] für **34a/b** und  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  346 [100%] für **35a/b** bestimmt. Im Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrensätze mit **33a/b** konnte für die Verbindungen aus den Fraktionen C4 und C5 ebenfalls eine Alkamidstruktur angenommen werden. Zur Absicherung der vorgeschlagenen Alkamidstrukturen (Abbildung 73) wurden anschließend weitere 1D- und 2D-NMR-Experimente durchgeführt.

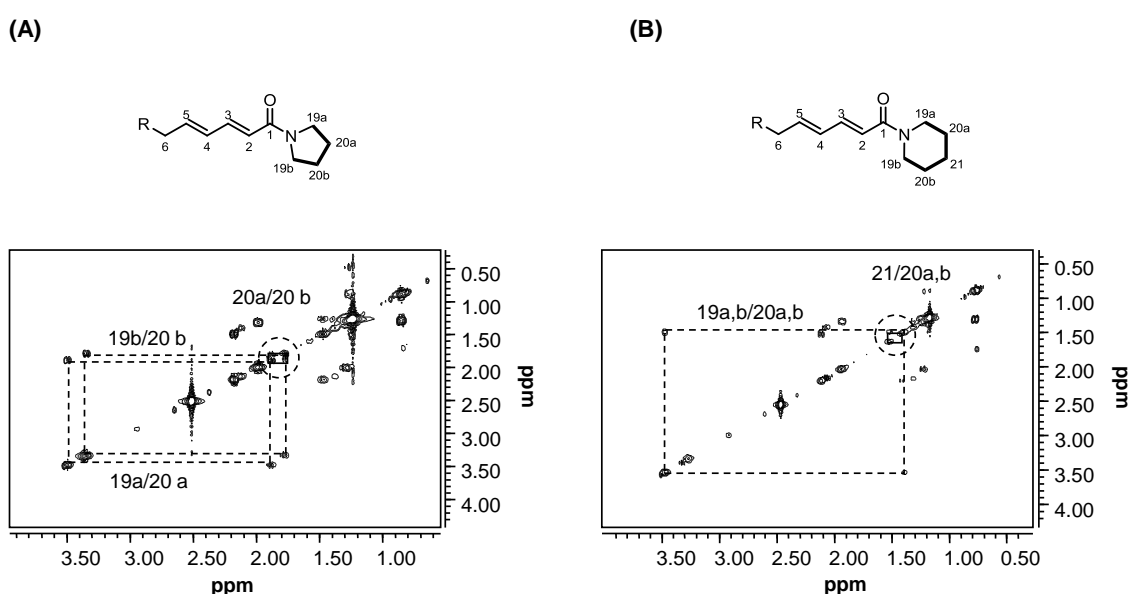
**(34a)****(35a)****(34b)****(35b)**

**Abbildung 73:** Strukturen der Verbindungen 1-(Octadeca-2E,4E,13Z-trienyl)-pyrrolidin (**34a**), 1-(Octadeca-2E,4E,12Z-trienyl)-pyrrolidin (**34b**), 1-(Octadeca-2E,4E,13Z-trienyl)-piperidin (**35a**) und 1-(Octadeca-2E,4E,12Z-trienyl)-piperidin (**35b**).

Durch Vergleiche der spektroskopischen Daten der Verbindungen **34a/b** und **35a/b** aus Fraktion C4 und C5 mit den Spektrensätze von **33a/b** wurde in allen drei Fraktionen je eine Zweiermischung mit den gleichen Fettsäureresten identifiziert. Auch der Aldehydnachweis nach Ozonolysen der Verbindungen **34a/b** und **35a/b** erbrachte sowohl Pentanal, als auch Hexanal. Während bei den Verbindungen **34a/b** das Verhältnis bei 3:1 (Pentanal:Hexanal) lag, betrug es bei **35a/b** 1,8:1 (Pentanal:Hexanal).

Ein Vergleich der beiden  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren der Fraktionen C4 und C5 mit den jeweiligen DEPT-Spektren führte zu der Erkenntnis, dass alle vier Verbindungen je ein quartäres Kohlenstoffatom bei 163.8 beziehungsweise 164.3 ppm  $[\text{C}(1)]$  besitzen, das für Ketoamide üblich ist. Da jedoch das typische N-H-Triplett im Tieffeld des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bei sämtlichen Verbindungen fehlte, konnte auf ein zyklisches Strukturelement der basischen Teilregion

geschlossen werden. COSY-Experimente der beiden Verbindungsmischungen bestätigten den zyklischen Charakter der basischen Teile der beiden Substanzen. Der Pyrrolidinring der Verbindungen **34a/b** wurde somit aus dem charakteristischen Kopplungsmuster der Protonen  $\delta_{\text{H}}$  1.82–1.90 ppm [m, 2H, H-C(20a)],  $\delta_{\text{H}}$  1.73–1.78 ppm [m, 6H, H-C(20b)],  $\delta_{\text{H}}$  3.27–3.40 ppm [m, 2H, H-C(19b)] und  $\delta_{\text{H}}$  3.47 ppm [t, 2H,  $J=7.1$  Hz, H-C(19a)] im COSY-Spektrum bestätigt (Abbildung 74, (A)). Dagegen wurde mittels des üblichen Kopplungsmusters der Protonen  $\delta_{\text{H}}$  3.44–3.51 ppm [m, 4H, H-C(19a, b)],  $\delta_{\text{H}}$  1.40–1.51 ppm [m, 4H, H-C(20a, b)],  $\delta_{\text{H}}$  1.55–1.60 ppm [m, 2H, H-C(21)] der Piperidinring der Verbindungen **35a/b** untermauert (Abbildung 74, (B)).



**Abbildung 74:** Ausschnitte der COSY-Spektren der Verbindungen **34a/b** und **35a/b** aus Fraktion C4 (A) und C5 (B).

Folglich wurden auf Basis der spektroskopischen Daten die Strukturen von 1-(Octadeca-2*E*,4*E*,13*Z*-triényl)-pyrrolidin (**34a**), 1-(Octadeca-2*E*,4*E*,12*Z*-triényl)-pyrrolidin (**34b**) sowie von 1-(Octadeca-2*E*,4*E*,13*Z*-triényl)-piperidin (**35a**) und 1-(Octadeca-2*E*,4*E*,12*Z*-triényl)-piperidin (**35b**) identifiziert. Während die Verbindung **35b** aus Fraktion C5 von Kikuzaki et al. (1993) aus *Piper retrofractum* Vahl. erstmals isoliert und identifiziert wurde, liegen soweit ersichtlich bis dato für die Verbindungen **34a/b** und **35a** noch keine Literaturdaten vor.



### Identifizierung der Fraktion C6

Der Inhaltsstoff **36** aus C6 wies im UV-Spektrum ebenfalls das für Alkamide charakteristische UV-Maximum bei  $\lambda_{\text{max}} = 260$  nm auf. Nach präparativer Isolierung wurde dessen Molekülmasse über das Quasimolekülion  $[M+H]^+$  bei  $m/z$  336 [100%] bestimmt. Die Masse von 335 Da ließ vermuten, dass **36** ein Dihydroderivat der Verbindungen **33a/b** war und somit eine Doppelbindung weniger aufwies als die Fettsäurereste der Alkamide **33a/b–35a/b**.

Um die Vermutung zu bekräftigen, dass es sich bei **36** um (2*E*,4*E*)-*N*-Isobutyl-octadeca-2,4-dienamid handelte (Abbildung 75), wurden weitere 1D- und 2D-NMR-Experimente durchgeführt. Die 2,4-Dienamid-Struktur konnte im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, das in Abbildung 75 aufgeführt ist, wieder gefunden werden. Neben dem breiten Triplett bei  $\delta_{\text{H}}$  7.97 ppm [t, 1H,  $J=6.0$  Hz] des Stickstoffprotons konnten im olefinischen Bereich drei weitere Signalgruppen zugeordnet werden, deren chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten identisch waren zu den Signalen der Protonen H-C(2), H-C(3), H-C(4) und H-C(5) des Amides **33a**. Durch Vergleich der  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-NMR-Spektren wird deutlich, dass **36** im Gegensatz zu **33a** keine weitere *cis*-ständige Doppelbindung aufwies, denn bei **36** waren insgesamt 13 Methylengruppen anzufinden. Die eindeutige Zuordnung des Dubletts vom Triplett von H-C(6) bei  $\delta_{\text{H}}$  2.17 ppm, des Multipletts von H-C(7–13; 17–19) bei  $\delta_{\text{H}}$  1.23–1.34 ppm sowie des Multipletts der terminalen Methylgruppe H-C(18) bei  $\delta_{\text{H}}$  0.81–0.89 ppm konnte über homonucleare  $^{1,2}J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen der COSY- und  $^{2,3,4}J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen der HMBC-Experimente erbracht werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse aus **33a** konnten weiterhin die charakteristischen Isobutylaminsignale zugeordnet werden.

Die in Abbildung 75 dargestellte Struktur konnte folglich mit den erhaltenen spektroskopischen Daten der Verbindung **36** in Einklang gebracht werden, die bereits von Nakatani und Inatani (1981) aus *Piper nigrum* L. und von Morikawa et al. (2004) und Sun et al. (2007) aus diversen Piperaceae isoliert wurde.

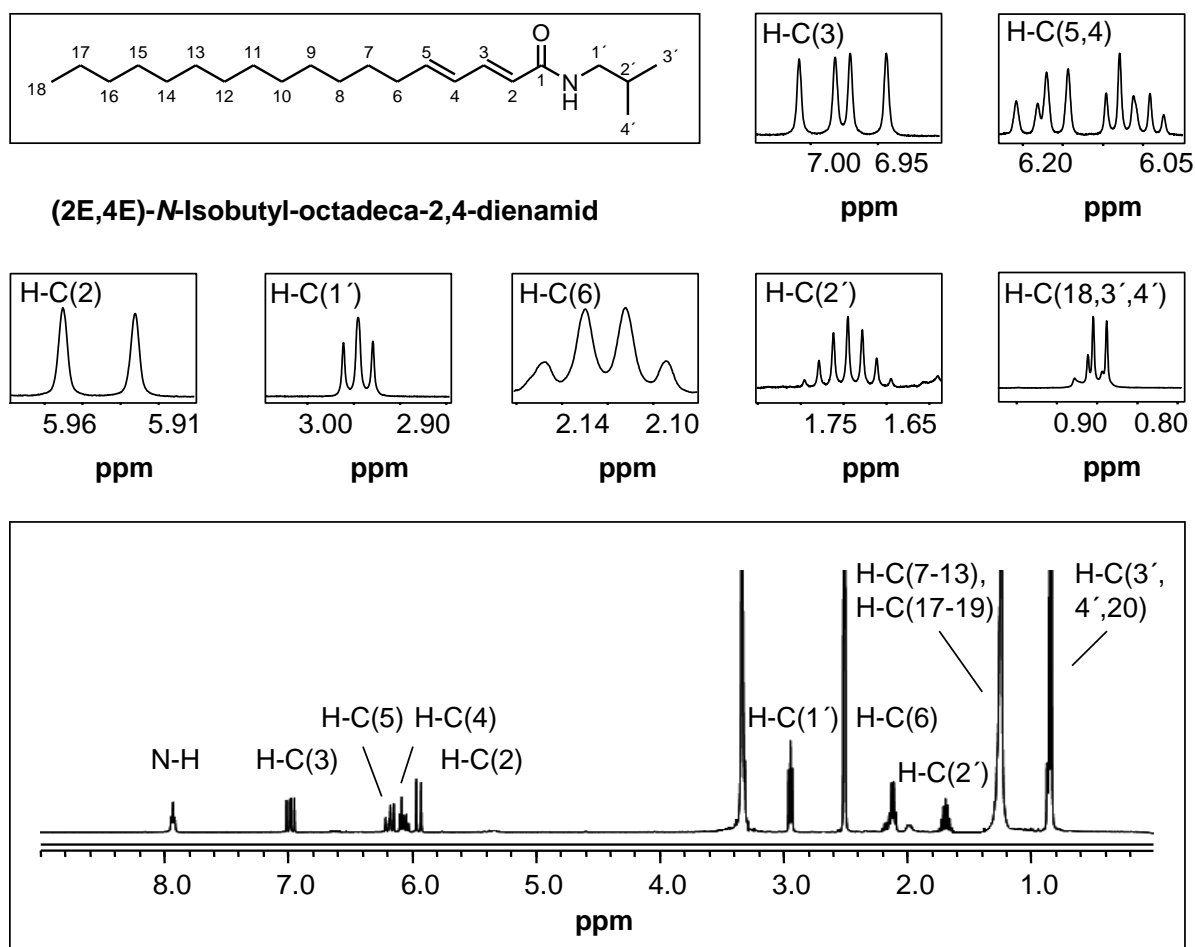


Abbildung 75:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (2E,4E)-N-Isobutyl-octadeca-2,4-dienamid (36) in  $\text{DMSO-d}_6$ .

### Identifizierung der Fraktionen C7, C8 und C9

Um eine eindeutige Strukturaufklärung mittels  $\text{UV}_{\text{vis}}$ -, LC-MS/MS- und NMR-Spektroskopie durchführen zu können, wurden die Fraktionen C7–C9 mittels parativer HPLC aufgereinigt. Die während der HPLC/DAD-Messungen aufgenommenen UV-Spektren der Substanzen **37a/b–39a/b**, die aus den Subfraktionen C7–C9 gewonnen wurden, wiesen ebenfalls identische und für 2,4-Dienamid-Chromophore typische Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$  auf. Analog zu den Fraktionen C3–C5, wurden auch aus den Fraktionen C7–C8 je zwei Isomere einer Verbindung, die sich jeweils in der Position der *cis*-ständigen Doppelbindung unterschieden, identifiziert.

Bei der LC/MS-Analyse (ESI<sup>+</sup>-Modus) zeigten alle drei Verbindungen intensive Ionen des Typs [M+H]<sup>+</sup> mit  $m/z$  362 [100%] für **37a/b**,  $m/z$  360 [100%] für **38a/b** und  $m/z$  374 [100%] für **39a/b**. Durch den Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektrensätze mit **33a/b** konnte für die Verbindungen aus den Fraktionen C7–C9 ebenfalls auf eine Alkamidstruktur geschlossen werden.

In ersten Identifizierungsexperimenten wurden die Verbindungen **37a** und **37b** spektroskopisch näher untersucht. Die Ähnlichkeit des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums (vgl. Abbildung 76) mit den Alkaminen **33a/b** sowie die Massendifferenz von 28 Da ließen den Schluss zu, dass es sich bei **37a/b** um strukturverwandte Verbindungen mit zwei zusätzlichen Methylengruppen handeln könnte. Da im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum die typischen Isobutylaminsignale bei  $\delta_{\text{H}}$  0.81 ppm [H-C(3', 4')],  $\delta_{\text{H}}$  1.62–1.70 ppm [H-C(2')] und  $\delta_{\text{H}}$  2.91 ppm [H-C(1')] ebenso wie die olefinischen Protonen bei  $\delta_{\text{H}}$  5.26–5.33 ppm [m, 2H,  $J=4.9$  Hz, H-C(15a, 16a bzw. 14b, 15b)],  $\delta_{\text{H}}$  5.91 ppm [d, 1H,  $J=15.2$ , H-C(2)],  $\delta_{\text{H}}$  5.99–6.06 ppm [m, 1H, H-C(5)],  $\delta_{\text{H}}$  6.08–6.18 ppm [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(4)] und  $\delta_{\text{H}}$  6.94 ppm [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(3)] mit den typischen Kopplungskonstanten gut erkennbar waren, konnte davon ausgegangen werden, dass **37a/b** im Vergleich zu **33a/b** eine Kettenverlängerung des Fettsäurerestes um zwei Methylengruppen aufwies. Die Integration des Multipletts bei  $\delta_{\text{H}}$  1.17–1.29 ppm bestätigte die beiden zusätzlichen CH<sub>2</sub>-Gruppen in den Molekülen von (2*E*,4*E*,15*Z*)-*N*-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (**37a**) und (2*E*,4*E*,14*Z*)-*N*-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (**37b**).

Zur Verifizierung der Position der *cis*-ständigen Doppelbindung an Position C(14)/C(15) beziehungsweise C(15)/C(16) wurden wie bei den Verbindungen **33a/b** die Aldehyde nach Ozonisierung und reduktiver Spaltung mittels GC-MS identifiziert. Das bei der massenspektrometrischen Messung detektierte Hexanal ermöglichte ebenso wie das Pentanal die eindeutige Zuordnung der Doppelbindungspositionen (Pentanal:Hexanal, 4:1).

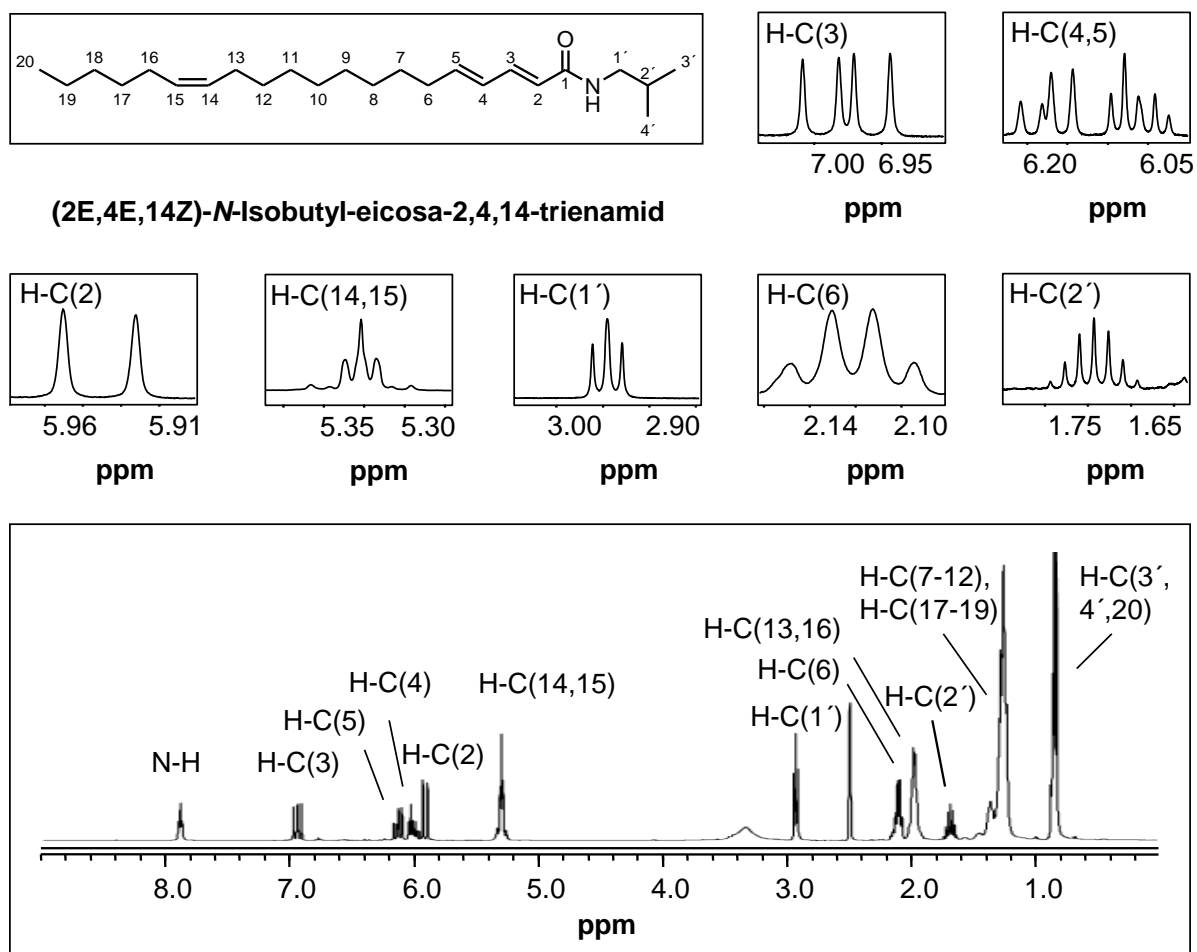
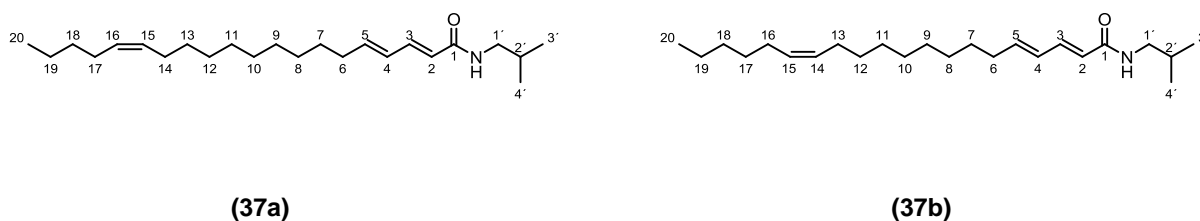


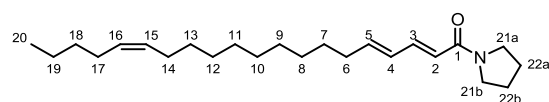
Abbildung 76:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum am Beispiel von (2E,4E,14Z)-N-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (**37b**) in  $\text{DMSO-d}_6$ .

Die Auswertung aller spektroskopischer Daten führte zur Identifizierung von (2E,4E,15Z)-N-Isobutyl-eicosa-2,4,15-trienamid (**37a**) sowie von (2E,4E,14Z)-N-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (**37b**) (Abbildung 77). Neben Morikawa et al. (2004) und Wu et al. (2004) konnten auch Kikuzaki et al. (1993) (2E,4E,14Z)-N-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (**37b**) aus *Piper retrofractum* Vahl. sowie aus *Piper longum* L. gewinnen und strukturell analysieren. Studien zu der Anwesenheit in *Piper nigrum* L. liegen bislang nicht vor. Dagegen wurde **37b** in der Literatur noch nicht beschrieben.

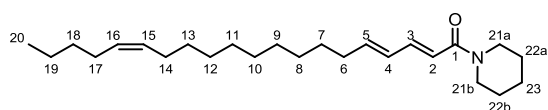


**Abbildung 77: Strukturen von (2E,4E,15Z)-N-Isobutyl-eicosa-2,4,15-trienamid (37a) und von (2E,4E,14Z)-N-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (37b).**

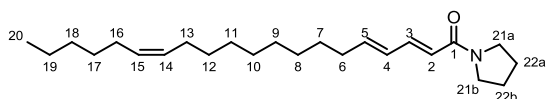
Das breitbandenkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Verbindungen **38a/b** erbrachte insgesamt 25 Signale zwischen  $\delta_{\text{C}}$  13.7 ppm und 163.6 ppm. Im DEPT-Spektrum von **38a/b** konnten, anders als bei **37a/b**, eine Methyl-, 15 Methylen-, sechs Methin-Gruppen sowie ein quartäres Kohlenstoffatom für jede der Verbindungen identifiziert werden, sodass die Vermutung nahe lag, diese Strukturen besitzen im Gegensatz zu einer Isobutylamin- eine Pyrrolidin-Teilstruktur. Besonders die drei Multipletts bei  $\delta_{\text{H}}$  1.72–1.80 ppm [m, 2H, H-C(22b)],  $\delta_{\text{H}}$  1.82–1.91 ppm [m, 2H, H-C(22a)], 3.27–3.39 ppm [m, 2H, H-C(21b)], und  $\delta_{\text{H}}$  3.43–3.51 ppm [m, 4H, H-C(21a)] im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum lagen im Bereich der charakteristischen chemischen Verschiebungen für Methylengruppen eines Pyrrolidinrestes. Auch deren stark koppelndes  $^1\text{H}$ -Spinsystem im COSY unterstützte diese Hypothese weiterhin (vgl. Abbildung 79, A). Die eindeutige Zuordnung der Kohlenstoff- und Wasserstoffsignale erfolgte mittels  $^1\text{J}_{\text{C,H}}$ -HMQC- und  $^{2,3}\text{J}_{\text{C,H}}$ -HMBC-Experimenten und erbrachte die in Abbildung 78 dargestellten Strukturen von 1-(Eicosa-2E,4E,15Z-trienoyl)-pyrrolidin (**38a**) und 1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)-pyrrolidin (**38b**). Aufgrund der Verhältnisse von Pentanal zu Hexanal (5,7 zu 1) wurde Verbindung **38a** als mengenmäßig dominierende Substanz in Fraktion C8 identifiziert. Anders als bei den Verbindungen **33a/b–35a/b** und **37a/b**, die an einem 125 Mhz Spektrometer gemessen wurden, wurde **38a/b** bei 100 Mhz analysiert. Obwohl für die Kohlenstoffatome an den Positionen C(18a) und C(18b) Signale unterschiedlicher chemischer Verschiebungen gefunden wurde, erbrachte das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum für die Kohlenstoffatome an Position C(19a) und C(19b), aufgrund der schwachen Intensität im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum und des hohen Signal/Rausch-Verhältnisses, lediglich ein Signal mit einer chemischen Verschiebung bei  $\delta_{\text{C}}$  22.8 ppm.



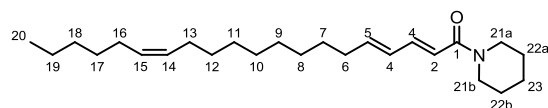
(38a)



(39a)



(38b)



(39b)

**Abbildung 78:** Strukturen von 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,15*Z*-trienoyl)-pyrrolidin (**38a**), 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,14*Z*-trienoyl)-pyrrolidin (**38b**), 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,15*Z*-trienoyl)-piperidin (**39a**) und 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,14*Z*-trienoyl)-piperidin (**39b**).

Die Integration der Protonensignale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindungen **39a/b** aus Fraktion C9 ließ auf je 41 Wasserstoffatome pro Molekül schließen und das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigte für jede Verbindung 24 Signale. Aus den Daten der Massenspektrometrie ( $m/z$  374.3427 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{NO}_3$ ) wie auch der NMR-Experimente wurde für **39a** ebenso wie für **39b** auf die Summenformel  $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{NO}_3$  geschlossen. Die Massendifferenz zwischen dem Molekülionen von Nr. **39a/b** zum 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,14*Z*-trienoyl)-pyrrolidin betrug 14 Da, woraus die Anwesenheit einer weiteren Methylengruppe abgeleitet wurde. Es wurde daher vermutet, dass es sich bei dieser Verbindungsmischung um 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,15*Z*-trienoyl)piperidin (**39a**) und 1-(Eicosa-2*E*,4*E*,14*Z*-trienoyl)-piperidin (**39b**) handelt (vgl. Abbildung 78). Die Substanzen aus Fraktion C9 ergaben vergleichbare NMR-Spektren zu **38a/b**. Insbesondere die vermutete Fettsäureeinheit wurde durch den Fettsäure-typischen Protonen-Fingerprint bei  $\delta_{\text{H}}$  0.80–0.88 ppm [H-C(20)],  $\delta_{\text{H}}$  1.14–1.32 ppm [H-C(8, 9, 10, 11, 12, 13a, 17b, 18, 19)],  $\delta_{\text{H}}$  1.90–2.03 ppm [H-C(13b, 16b, 14a, 17a)] und  $\delta_{\text{H}}$  2.16 ppm [H-C(6)], und im olefinischen Bereich bei  $\delta_{\text{H}}$  6.00–6.12 ppm [H-C(5)],  $\delta_{\text{H}}$  6.09–6.28 ppm [H-C(4)],  $\delta_{\text{H}}$  6.51 ppm [H-C(2)] und  $\delta_{\text{H}}$  7.02 ppm [H-C(3)] im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt. Mit Hilfe der 2D-NMR-Daten konnten sowohl die Methylen- und Methin-Gruppen der Fettsäureteilstruktur als auch deren Verknüpfung zum basischen Teil charakterisiert werden. Unterschiede zu **38a/b** ließen sich dennoch im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch ein zusätzliches Multiplett mit einer Intensität von zwei Protonen bei einer chemischen Verschiebung von 1.54–1.61 ppm aus-

machen, das charakteristisch ist für H-C(23) von Piperidinringen. Aufgrund des homonuclearen Kopplungsmusters des  $^1\text{H}/^1\text{H}$ -Spinnsystems H-C(21)/H-C(22)-H-C(22)/H-C(23) im CO-SY-Experiment wurden außerdem anders als bei **38a/b** die Piperidinteilstruktur der Verbindungen **39a/b** bestätigt (Abbildung 79). Auf der Basis von LC-MS, 1D- und 2D-NMR-Daten gelang es folglich **39a/b** als 1-(Eicosa-2E,4E,15Z-trienoyl)-piperidin (**39a**) und 1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)-piperidin (**39b**) zu identifizieren (Abbildung 78). Der Unterschied zwischen **39a** und **39b** ließ sich analog zu **38a/b** zum einen aus der zusätzlichen chemischen Verschiebung bei  $\delta_{\text{C}}$  31.1 ppm [C(18b)] und  $\delta_{\text{C}}$  31.4 ppm [C(18a)] sowie durch den Nachweis von Pentanal und Hexanal (8:1) nach Ozonolyse erbringen.

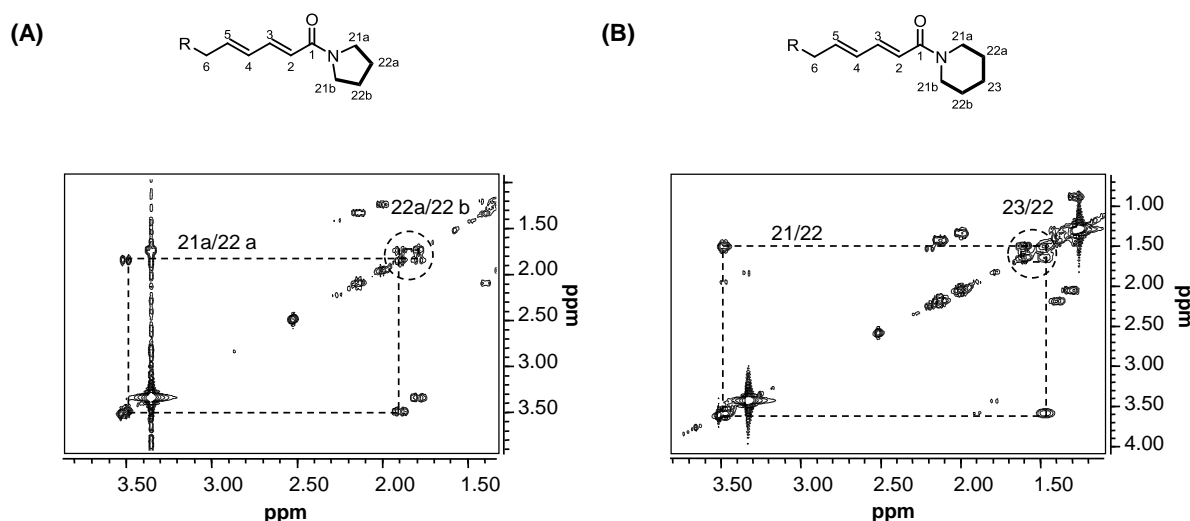


Abbildung 79: COSY-Spektren von 1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)-pyrrolidin (**38b**) (A) und 1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)-piperidin (**39b**) (B).

Während Kikuzaki et al. (1993) 1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)piperidin (**39b**) bereits in *Piper retrofractum* L. beschrieben, sind in der Literatur keine Ausführungen zu **38a/b** und **39a/b** in *Piper nigrum* L. zu finden. Vielmehr wurden **38a/b** sowie **39a** erstmals aus einer Piperaceae isoliert und strukturell analysiert.

#### 4.4.4 Diskussion

Erste sensorische Analysen zeigten, dass sich insbesondere der schwarze Pfeffer (*Piper nigrum* L.), ein Vertreter aus der Familie der Piperaceae, durch eine dominierende Schärfe sowie durch einen angenehmen Tingling-Effekt auszeichnet. Obwohl das global am meisten gehandelte Gewürz laut Literatur sein scharfes Prinzip vor allem dem Säureamid Piperin (**21**) verdankt (Franke, 1997; Freist, 1991), konnte in sensorischen Vorexperimenten gezeigt werden, dass der Pipingehalt in schwarzem Pfeffer zwar eine sensorische Schlüsselrolle einnimmt, jedoch lediglich die Hälfte seiner Schärfe ausmacht. Um die sensorisch aktiven Substanzen des schwarzen Pfeffers systematisch aufzuklären, wurden diese durch Extraktion mit Ethanol angereichert und anschließend mittels Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) aktivitätsorientiert fraktioniert (Frank et al., 2001). Mit Hilfe der GVA konnten in schwarzen Pfefferkörnern insgesamt 34 sensorisch aktive Fraktionen detektiert werden, aus denen neben Piperin (**21**) 24 weitere Pfefferinhaltsstoffe, die aufgrund ihrer hohen GV-Faktoren ausgewählt worden waren, identifiziert wurden (Tabelle 8). Im Einklang mit der Literatur (z. B.: Parmar et al., 1997) wurden alle sensorisch aktiven Verbindungen der Gruppe der Säureamide zugeordnet. Dabei gelang es, neben zwölf Strukturanaloga des Piperins 13 Alkylamide auf Basis von LC/MS- und NMR-Experimenten und teilweise durch Synthesemethoden in ihren Strukturen zu charakterisieren.

Um die sensorisch aktiven Substanzen des schwarzen Pfeffers in hohen Reinheiten und Ausbeuten für strukturelle ebenso wie für psychophysikalische Experimente aus dem Ethanolgesamtextrakt zu gewinnen, wurde zunächst eine geeignete Subfraktionierung über RP-18-Material entwickelt. Dabei wurde der Ethanolextrakt des schwarzen Pfeffers mit Hilfe eines Methanol/Wasser-Gradienten in vier Fraktionen vorgetrennt, von denen drei mittels präparativer HPLC subfraktioniert wurden. Aus den Unterfraktionen gelang es, die Pfeffersäureamide **21–39a/b** in ausreichenden Mengen zu isolieren, sodass diese in ihren Strukturen spektroskopisch und spektrometrisch charakterisiert werden konnten. Der Tabelle 8 sind die Zuordnungen der einzelnen Subfraktionen zu den GVA-Fraktionen, die mit Hilfe von Cochromatographieexperimenten getroffen wurden, zu entnehmen.

Neben dem Hauptamid des *Piper nigrum* L., Piperin (**21**), gelang es elf weitere literaturbekannte (vgl. Tabelle 8) Piperinanaloga, denen eine Benzodioxolgrundstruktur ebenso wie eine Amidbindung gemeinsam ist, als Pfefferscharfstoffe zu identifizieren (Abbildung 80). Weiterhin erbrachte die strukturelle Analyse der polaren Pfefferverbindungen, dass alle identifizierten Piperinanaloga, wie das Piperlonguminin (**22**), Piperylin (**23**), Piperolein (**24**), Pipereitin (**25**), Retrofractamid A (**26**), 1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2*E*,4*E*,8*E*-nonatrienyl]-pyrrolidin (**27**), Dehydropipernonalin (**28**), Pipernonalin (**29**), Piperolein B (**30**),



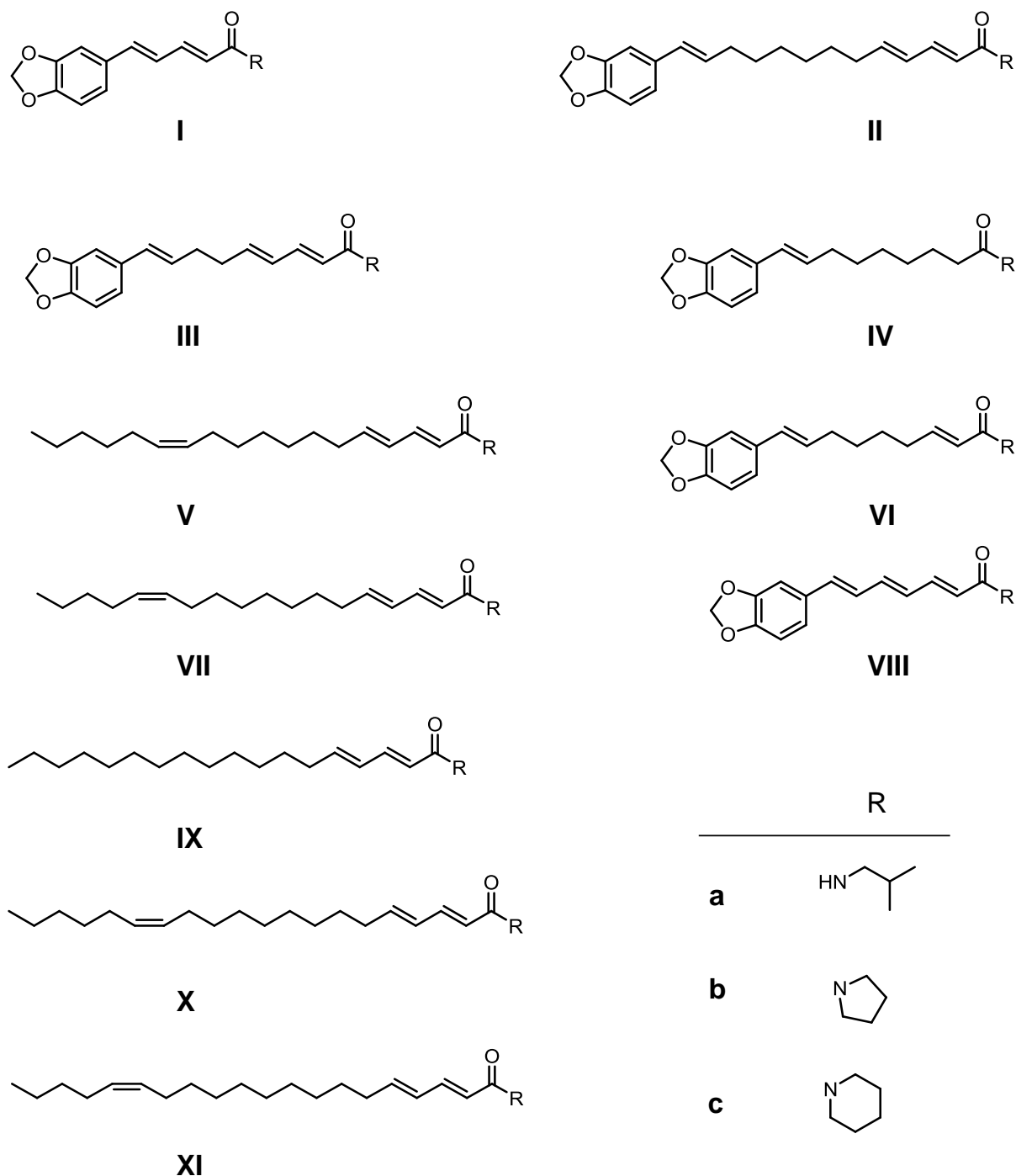
Guineensin (**31**) ebenso wie Brachyamid A (**32**) entweder Isobutylamin, Pyrrolidin oder Piperidin als Base enthalten. Zusätzliche synthetische Experimente untermauerten die Strukturidentifizierung von Piperlonguminin (**22**), Pipyrylin (**23**), Piperolein (**24**) und Piperettin (**25**) in schwarzen ganzen Pfefferkörnern.

Als potenteste Inhaltsstoffe des Pfeffers gelang es mittels LC/MS- und NMR-Studien neben den bereits erwähnten zwölf Säureamiden (**21–32**) 13 weitere langkettige ungesättigte, unpolare Alkylamide (**33a/b–39a/b**) zu identifizieren. Unter anderem wurden (*2E,4E,12Z*)-*N*-isobutyloctadeca-2,4,12-trienamid (**33b**), 1-(Octadeca-2*E,4E,12Z*-trienoyl)-pyrrolidin (**34b**) und 1-(Octadeca-2*E,4E,12Z*-trienoyl)-piperidin (**35b**) als C18:3 Fettsäureanaloge identifiziert, von denen lediglich Verbindung **33b** in *Piper nigrum* L. beschrieben ist (Wei et al., 2004). Während **35b** bereits von Kikuzaki et al. (1993) aus *Piper retrofractum* Vahl. isoliert wurde, ist 1-(Octadeca-2*E,4E,12Z*-trienoyl)-pyrrolidin (**34b**) hingegen in der Literatur unbekannt. Auch die C20:3 Alkylamidanaloga **37a/b–39a/b** sind bislang nicht als Naturstoffe in *Piper nigrum* L. beschrieben. Obwohl **37b** und **39b** bereits in anderen Vertretern der Piperaceae nachgewiesen wurden, fehlen die Datensätze zu (*2E,4E,15Z*)-*N*-isobutyleicosa-2,4,15-trienamid (**37a**), 1-(Eicosa-2*E,4E,15Z*-trienoyl)-pyrrolidin (**38a**), 1-(Eicosa-2*E,4E,14Z*-trienoyl)-pyrrolidin (**38b**) und 1-(Eicosa-2*E,4E,15Z*-trienoyl)-piperidin (**39a**) dagegen gänzlich (Morikawa et al., 2004; Wu et al., 2004; Kikuzaki et al., 1993). Das dreizehnte identifizierte Alkylamid (*2E,4E*)-*N*-isobutyloctadeca-2,4-dienamid (**36**), dem die *cis*-ständige Doppelbindung fehlt, konnte bereits oftmals als Inhaltsstoff verschiedener Pfefferarten beschrieben werden (Nakatani und Inatani, 1981; Morikawa et al., 2004; Sun et al., 2007).

Von besonderer Bedeutung bei der Strukturidentifizierung der Verbindungen **33a/b–35a/b** und **37a/b–39a/b** war die Bestimmung der Position der *cis*-ständigen Doppelbindung, denn aus den Vertretern der Piperaceae sind unterschiedliche Doppelbindungspositionen bekannt. Während Nakatani und Inatani (1981) *N*-Isobutyl-2*E,4E,8Z*-eicosatrienamid in *Piper nigrum* L. fanden, beschreiben Kikuzaki et al. (1993) das Isobutylamin *N*-Isobutyl-2*E,4E,14Z*-eicosatrienamid mit der Doppelbindungsposition zwischen C14 und C15. Beide Arbeitsgruppen nutzten zur Bestimmung der Doppelbindungsposition OsO<sub>4</sub>, mit dem die *cis*-Bindung der Alkylamide dihydroxyliert wurde, sodass die Dihydroxide anschließend zu den jeweiligen Aldehyden gespalten werden konnte. Die Aldehyde wurden abschließend wiederum mittels GC-MS nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Doppelbindungspositionen aller Alkylamide bestimmt. Dazu wurden die Alkylamide mit Ozon zu den entsprechenden Ozoniden umgewandelt, die nach reduktiver Spaltung in die Aldehyde Pentanal und Hexanal zerfielen. Die zwei Aldehy-

de, die mittels GC-MS detektiert wurden, führten zur eindeutigen Identifizierung von **33a/b–35a/b** und **37a/b–39a/b**.



**Abbildung 80: Identifizierte Säureamide in Pfeffer: 21 (Ic), 22 (Ia), 23 (Ib), 24 (VIIIb), 25 (VIIIc), 26 (IIIa), 27 (IIIb), 28 (IIIc), 29 (VIc), 30 (IVc), 31 (IIa), 32 (IIb), 33a (VIIa), 33b (Va), 34a (VIIIb), 34b (Vb), 35a (VIIc), 35b (Vc), 36 (IXa), 37a (XIa), 37b (XIa), 38a (XIb), 38b (XIb), 39a (XIc) und 39b (XIc).**

Tabelle 8: Identifizierte sensorisch aktive Inhaltsstoffe des Pfeffers.

Nr. <sup>a</sup>	Verbindung <sup>b</sup>	Fraktion (GVA) <sup>c</sup>	Fraktion (SPE) <sup>d</sup>	Literatur <sup>g</sup>
22	Piperlonguminin	5	SPE-A1	Lin et al. (2007) <sup>f</sup> ; Wu et al. (2004) <sup>g</sup>
23	Piperilin	6	SPE-A2	Grewe et al. (1970) <sup>f</sup> ; Kapoor et al. (2009) <sup>g</sup> ; Wei et al. (2004) <sup>f</sup>
21	Piperin	7	SPE-A3	Oersted (1820) <sup>f</sup> ; Landenburg (1894) <sup>f</sup> ; Wu et al. (2004) <sup>g</sup>
24	Piperolein	10	SPE-B1	Wei et al. (2004) <sup>f</sup>
25	Piperettin	11	SPE-B2	Spring et al. (1950) <sup>f</sup> ; Wei et al. (2004) <sup>f</sup> ; Li et al. (2004) <sup>g</sup>
26	Retrofractamid A	13	SPE-B3	Park et al. (2002) <sup>f</sup> ; Okumura et al. (2010) <sup>f</sup>
27	1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin	14	SPE-B4	Wei et al. (2004) <sup>f</sup>
28	Dehydropiperonalin	16	SPE-B5	Lee et al. (2006) <sup>f</sup>
29	Piperonalin	19	SPE-B7	Wei et al. (2004) <sup>f</sup> ; Wu et al. (2004) <sup>g</sup> ; Lee et al. (2006) <sup>f</sup>
30	Piperolein B	20	SPE-B8	Wei et al. (2004) <sup>f</sup> ; Lee et al. (2006) <sup>f</sup>
31	Guineensin	25	SPE-C1	Nakatani und Inatani (1981) <sup>f</sup> ; Morikawa et al. (2004) <sup>g</sup> ; Wu et al. (2004) <sup>g</sup> ; Park et al. (2002) <sup>f</sup>
32	Brachyamid A	26	SPE-C2	Tsukamoto et al. (2002) <sup>f</sup> ; Koul et al. (1988) <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Die Nummerierung bezieht sich auf die in den Abbildungen der Strukturformeln verwendete durchlaufende Nummerierung; <sup>b</sup> Die Verbindung wurde mittels UV/VIS, LC-MS/MS, NMR und gegebenenfalls synthetisch identifiziert; <sup>c</sup> Zuordnung der Verbindung zu der entsprechenden GVA-Fraktion (vgl. 4.3); <sup>d</sup> Zuordnung der Verbindung zu der entsprechenden SPE-Fraktion A, B oder C; <sup>e</sup> Literaturbeispiele, in denen die Verbindungen aufgeführt und spektroskopisch charakterisiert sind; <sup>f</sup> Diese Verbindung wurde in der Literatur als Pfefferinhaltsstoff (*Piper nigrum* L.) identifiziert; <sup>g</sup> Diese Verbindung wurde in der Literatur als Inhaltsstoff aus einer Piperaceae isoliert und identifiziert.

Nr. <sup>a</sup>	Verbindung <sup>b</sup>	Fraktion (GVA) <sup>c</sup>	Fraktion (SPE) <sup>d</sup>	Literatur <sup>g</sup>
33a	(2E,4E,13Z)-N-Isobutyloctadeca-2,4,13-trienamid	33	SPE-C3	---
33b	(2E,4E,12Z)-N-Isobutyloctadeca-2,4,12-trienamid	33	SPE-C3	Wei et al. (2004) <sup>f</sup> ; Wu et al. (2004) <sup>g</sup> ; Kikuzaki et al. (1993) <sup>g</sup>
34a	1-(Octadeca-2E,4E,13Z-trienoyl)-pyrrolidin	35	SPE-C4	---
34b	1-(Octadeca-2E,4E,12Z-trienoyl)-pyrrolidin	35	SPE-C4	---
35a	1-(Octadeca-2E,4E,13Z-trienoyl)-piperidin	36	SPE-C5	---
35b	1-(Octadeca-2E,4E,12Z-trienoyl)-piperidin	36	SPE-C5	Kikuzaki et al. (1993) <sup>g</sup>
36	(2E,4E)-N-Isobutyloctadeca-2,4-dienamid	37	SPE-C6	Nakatani und Inatani (1981) <sup>f</sup> ; Morikawa et al. (2004) <sup>g</sup> ; Sun et al. (2007) <sup>g</sup>
37a	(2E,4E,15Z)-N-Isobutyleicosa-2,4,15-trienamid	37	SPE-C7	---
37b	(2E,4E,14Z)-N-Isobutyleicosa-2,4,14-trienamid	37	SPE-C7	Morikawa et al. (2004) <sup>g</sup> ; Wu et al. (2004) <sup>g</sup> ; Kikuzaki et al. (1993) <sup>g</sup>
38a	1-(Eicosa-2E,4E,15Z-trienoyl)-pyrrolidin	38	SPE-C8	---
38b	1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)-pyrrolidin	38	SPE-C8	---
39a	1-(Eicosa-2E,4E,15Z-trienoyl)-piperidin	39	SPE-C9	Kikuzaki et al. (1993) <sup>g</sup>
39b	1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)-piperidin	39	SPE-C9	---

<sup>a</sup> Die Nummerierung bezieht sich auf die in den Abbildungen der Strukturformeln verwendete durchlaufende Nummerierung; <sup>b</sup> Die Verbindung wurde mittels UV/VIS, LC-MS/MS, NMR und gegebenenfalls synthetisch identifiziert; <sup>c</sup> Zuordnung der Verbindung zu der entsprechenden GVA-Fraktion (vgl. 4.3); <sup>d</sup> Zuordnung der Verbindung zu der entsprechenden SPE-Fraktion A, B oder C; <sup>e</sup> Literaturbeispiele, in denen die Verbindungen aufgeführt und spektroskopisch charakterisiert sind; <sup>f</sup> Diese Verbindung wurde in der Literatur als Pfefferinhaltsstoff (*Piper nigrum* L.) identifiziert; <sup>g</sup> Diese Verbindung wurde in der Literatur als Inhaltsstoff aus einer Piperaceae isoliert und identifiziert.

## 4.5 Psychophysikalische Studien zu den Säureamiden aus Pfeffer

In weiterführenden sensorischen Studien wurden anschließend die unter 4.4 identifizierten Pfefferinhaltsstoffe näher charakterisiert. Dazu wurde zunächst ein sensorisches Testverfahren entwickelt, mit dem nicht nur die Schwellenwerte und Dose/Response-Kurven ausgewählter Säureamide erfasst, sondern auch strukturelle Voraussetzungen für den Scharfgeschmack herausgearbeitet werden konnten.

### 4.5.1 Entwicklung eines sensorischen Testverfahrens

Aus der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Schärfe eines Stoffes bekannt. Der amerikanische Pharmakologe W. L. Scoville entwickelte 1912 beispielsweise ein Verfahren, um die Schärfe von Capsaicin in Chilis zu messen. Bei diesem Test wurden Chilis püriert, das enthaltene Capsaicin mit Alkohol extrahiert und die erhaltene Lösung so lange mit einer Zuckerlösung verdünnt, bis kaum noch eine Schärfe wahrzunehmen war. Der Grad der Verdünnung, bei dem keine Schärfe mehr festzustellen war, wurde als Scoville-Grad (SCU für *Scoville Units*) angegeben (Scoville, 1912). Neben scharfen Einzelverbindungen, wie Capsaicin, wurden auch tingelnd wirkende Sanshoolerivate in der Vergangenheit mit Scoville-Units charakterisiert (Sugai et al., 2005). Sugai et al. (2005) konnten weiterhin erstmals die Detektionsschwellenwerte diverser Sanshoolerivate, mit Hilfe einer Propylenglycol-Lösung mit 5% Saccharose und 0,1% Ethanol, ermitteln. Außerdem kann die Schärfe einer Verbindung in Bezug auf eine Referenzlösung bestimmt werden; so erhält *E,E*-Piperin definitionsgemäß eine Schärfe von 1, Piperilin eine Schärfe von 0,1–1 und Piperanin eine Schärfe von 0,5 (Belitz et al., 2001).

Jedoch gelingt es nicht, mit den in der Vergangenheit entwickelten Scharf-Sensorikmethoden, wie den Scoville-Units oder Schärfevergleichen, Korrelationen zwischen der sensorischen Wahrnehmung eines Inhaltsstoffes und dessen Beitrag zum Gesamtgeschmack zu erstellen. Dazu werden vielmehr Scharf- oder Tingling-Schwellenwerte benötigt. Pfeffersäureamide sind aufgrund ihres hydrophoben Charakters mangelhaft in Wasser, jedoch gut in Ethanol zu lösen. Der brennende Eigengeschmack des Ethanols beeinträchtigt jedoch die sensorische Beurteilung der Scharfstoffe, denn Ethanol selber ist neben Piperin und anderen Säureamiden aus dem Pfeffer ein weiterer chemischer Agonist des TRPV 1 (Trevisani et al., 2002; Okumura et al., 2010) und somit als Matrix oder Matrixzusatz bei der sensorisch Analyse ungeeignet. Aus diesem Grund sollten für die Verkostungen eine Ethanol- und geruchsfreie Matrix gefunden werden. In Anlehnung an den bereits entwickelten

„Half-Mouth“-Test (Scharbert et al., 2004) wurde daraufhin eine neue Sensorikmethode zur Pfefferinhaltsstoffcharakterisierung entwickelt. Die Verkostung auf definierten Filterpapierstreifen als Sensorikmatrix, anstelle von wässrigen Lösungen, erwies sich dabei als ideal.

Dazu wurden die zu untersuchenden scharfen oder tingelnden Verbindungen beziehungsweise Extrakte in Ethanol gelöst und vollständig auf ein Filterpapier definierter Größe mit Hilfe einer Pipette aufgebracht. Hierbei war zu beachten, dass die Lösungen nur auf eine Seite des Filterpapierstreifens aufgeträufelt und getrocknet wurden, sodass sich die Scharf-/Tinglingstoffe direkt und vollständig auf der Oberfläche des Papiers befanden. Die beträufelten Papierstreifen wurden anschließend, um sämtliches Ethanol zu verdampfen, bei 38 °C im Trockenschrank getrocknet und einem geschulten Sensorikpanel bereitgestellt. Für die Blindwerte wurden Filterpapierstreifen mit der gleichen Menge Ethanol versehen und ebenfalls im Trockenschrank bei 38 °C getrocknet. Bei den Sensoriken wurde das Panel gebeten, zwischen sämtlichen Verkostungen Wartezeiten einzuhalten und die Zunge mit Evian sowie einer 3%-igen Saccharoselösungen zu spülen.

Um den Einfluss der Filterpapierdimension auf die sensorische Wahrnehmung von scharfen und tingelnden Komponenten zu überprüfen, wurden die Erkennungsschwellenwerte von Piperin auf Filterpapieren unterschiedlicher Größen (0,5 × 0,5; 0,5 × 1; 1 × 1; 1 × 2; 1 × 3 und 1 × 4 cm) gegen Blindwerte, mit Hilfe der modifizierten „Half-Mouth“-Strategie, getestet. Tabelle 9 zeigt die dafür erhaltenen Ergebnisse. Die Scharfschwellen der Filterpapierdimensionen 0,5 × 0,5 cm sowie 1 × 4 cm wurden während der Verkostung vom Sensorikpanel als schlecht zu handhaben beschrieben. Während die Filterpapiere mit einer Fläche von 0,5 × 0,5 cm als zu klein empfunden wurden, weil eine Lokalisierung der Schärfe kaum möglich war, empfanden die Probanden die 1 × 4 cm Filterpapiere zu lang, um sie auf die Zungenseite auflegen zu können. Beide Filterpapierdimensionen kamen damit für sensorische Studien nicht in Frage. Die Schwellenwerte in  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  der Größen 0,5 × 1; 1 × 1; 1 × 2 und 1 × 3 cm waren innerhalb ihrer natürlichen Schwankungsbreiten als gleich anzusehen und unterscheiden sich nicht signifikant. Für eine sensorische Beurteilung konnte somit ein Schwellenwert in  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  angegeben werden. Da das Panel die Filterpapierdimension 1 × 2 cm am angenehmsten empfand, wurden im Folgenden alle Schwellenwerte auf 1 × 2 cm Papierstreifen aufgenommen.

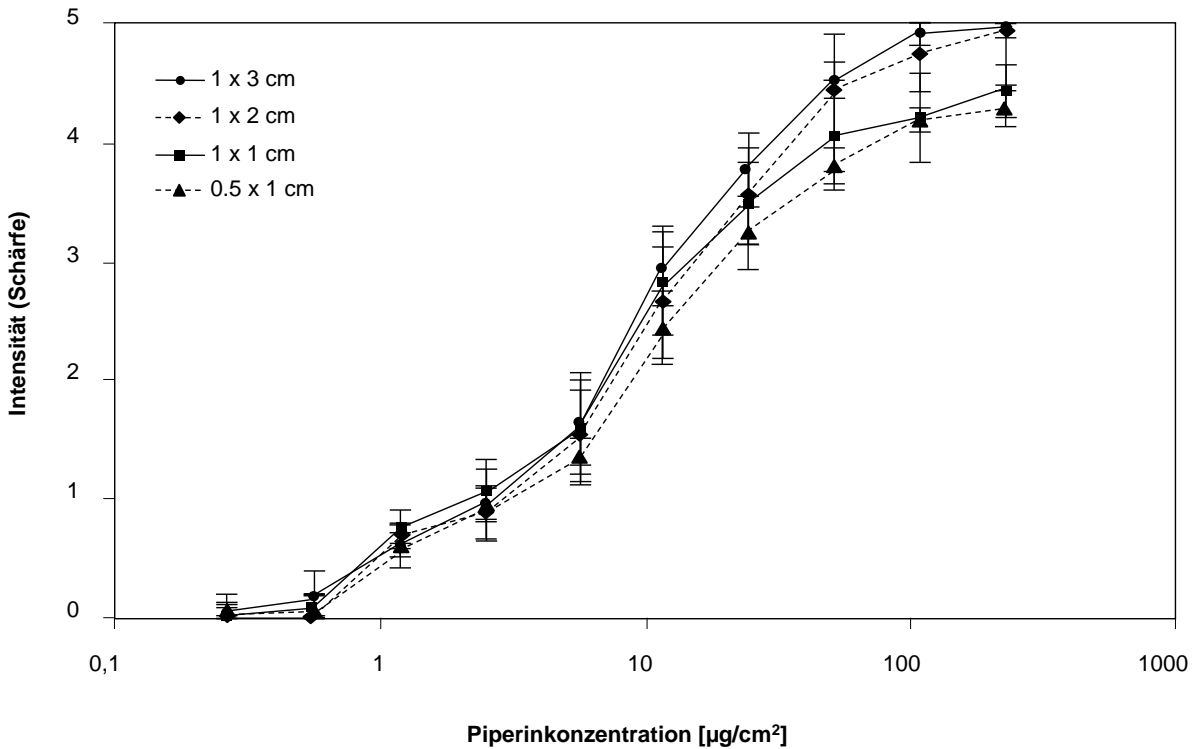
**Tabelle 9: Schwellenwerte von Piperin auf unterschiedlichen Filterpapierdimensionen.**

Filterpapierdimension	Schwellenwert [ $\mu\text{mol}$ ]	Schwellenwert [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ]
0,5 × 0,5 cm	0,0002	0,0008
0,5 × 1,0 cm	0,0003	0,0006
1,0 × 1,0 cm	0,0003	0,0003
1,0 × 2,0 cm	0,0006	0,0003
1,0 × 3,0 cm	0,002	0,0007
1,0 × 4,0 cm	0,004	0,001

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, inwieweit die Filterpapiergröße bei Konzentrationen oberhalb der Schwellenwertkonzentration, zwischen 0,21 bis 222,72  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , einen Einfluss auf die Scharfwahrnehmung ausübt. Dazu wurden Dose-Response-Kurven der unterschiedlichen Filterpapiergrößen (0,5 × 1; 1 × 1; 1 × 2 und 1 × 3 cm) mit jeweils derselben Konzentration Piperin pro  $\text{cm}^2$  von einem sensorischen Panel auf einer Skala von 0 (nicht detektierbar) bis 5 (stark detektierbar) gegeneinander gewichtet. In einem ersten Teilexperiment wurde dafür die Dose-Response-Kurve von Piperin auf 1 × 2 cm aufgenommen und anschließend dem Panel als Referenz zur Verfügung gestellt. Per Definition wurde weiterhin die Maximalkonzentration von 222,72  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  Piperin des 1 × 3 cm Filterpapierstreifens auf 5 gesetzt. Nachdem das Panel gebeten wurde jeweils die Maximalkonzentrationen der jeweiligen Filterpapierdimensionen gegeneinander mit Hilfe des modifizierten „Half-Mouth“-Tests zu bewerten, wurden alle weiteren Piperinkonzentrationen gegen diese Intensitäten gewichtet. Wie in Abbildung 81 zu sehen, wurden abschließend die Ergebnisse so dargestellt, dass auf der x-Achse die jeweiligen Piperinkonzentrationen pro  $\text{cm}^2$  und auf der y-Achse die Scharfintensitäten aufgetragen wurden.

Die Scharfintensität von Piperin bei gleicher Konzentration pro  $\text{cm}^2$  auf unterschiedlichen Filterpapiergrößen wurde vom Panel unterschiedlich bewertet. Zudem verdeutlichen die unterschiedlichen Dose-Response Kurven, dass die Panelisten in der Lage waren, zwischen den Absolutmengen an Piperin auf den individuellen Filterpapieren zu unterscheiden. Höhere Absolutmengen von Piperin, unterhalb der Sättigung, wurden beispielsweise vom Panel mit höheren Intensitäten eingestuft. Das zeigt, dass die Größe der stimulierten Region auf der Zunge einen Einfluss auf die Scharfintensität ausübt. Die Absolutmenge Piperin pro aktivierter Fläche hat darüber hinaus einen Einfluss auf die Absättigung der Scharfintensität. Während bei Konzentrationen von 111,36 und 222,72  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  der größeren Filterpapiere (1 × 2 und 1 × 3 cm) bereits ein Maximum der Scharfintensität erreicht war, reichte die gleiche Kon-

zentration pro  $\text{cm}^2$  bei den  $0,5 \times 1$  sowie  $1 \times 1$  cm Dimensionen nicht aus, um maximale Scharfintensitäten von 5 zu erreichen.



**Abbildung 81: Einfluss der Filterpapierdimension auf die humanen Dose/Response-Funktionen von Piperin unter Verwendung der Filterpapiermethode. Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall ( $P=95\%$ ) des Mittelwertes.**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Scharfempfindung abhängig von der Größe der aktivierten Fläche sowie der Absolutkonzentration des Stimulus ist. Um erstmals detaillierte Kenntnisse über die sensorische Aktivität von natürlichen und strukturverwandten Säureamiden des Pfeffers zu erhalten, wurden diese im Folgenden durch Bestimmung von Geschmacksschwellenwerten sowie von Dosis-Wirkungs-Kurven humansensorisch mittels des modifizierten „Half-Mouth“-Tests unter Verwendung der  $1 \times 2$  cm Filterpapiere als Matrix charakterisiert.



#### 4.5.2 Humane Geschmacksschwellenwerte

Die humansensorischen Schwellenwerte der identifizierten Säureamide wurden mittels des modifizierten „Half-Mouth“-Tests (s. 4.5.1) auf Filterpapierstreifen (Tabelle 10) detektiert. Vor den sensorischen Untersuchungen wurde die Reinheit synthetisch hergestellter oder isolierter Verbindungen mittels LC/MS-Analyse und NMR-Spektroskopie überprüft. Die Alkylamide **33a/b–35a/b** sowie **37a/b–39a/b** wurden als Mischungen verkostet.

Tabelle 10: Schwellenwerte der Pfefferinhaltsstoffe.

Substanz- Nummer	Struktur	sensorische Qualität	Schwellenwert [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ]
21	Piperin	scharf	0,003
22	Piperlonguminin	scharf	0,01
23	Piperylin	scharf	0,005
24	Piperolein	scharf	0,01
25	Piperettin	scharf	0,005
26	Retrofractamid A	scharf	0,025
27	1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)- 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i> -nonatrienyl]-pyrrolidin	scharf	n.b.
28	Dehydropiperonalin	scharf	0,15
29	Pipernonalin	scharf	n.b.
30	Piperolein B	scharf	1,15
31	Guineensin	scharf	0,81
32	Brachyamid A	scharf	n.b.
33a/b	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,13 <i>Z</i> )- <i>N</i> -Isobutyloctadeca- 2,4,13-trienamid / (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> )- <i>N</i> - Isobutyloctadeca-2,4,12-trienamid	scharf	0,54
		tingling	2,16
34a/b	1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,13 <i>Z</i> -trienoyl)- pyrrolidin / 1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> - trienoyl)-pyrrolidin	scharf	n.b.
		tingling	n.b.
35a/b	1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,13 <i>Z</i> -trienoyl)- piperidin / 1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> - trienoyl)-piperidin	scharf	n.b.
		tingling	n.b.
36	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- <i>N</i> -Isobutyloctadeca-2,4- dienamid	scharf	0,76
37a/b	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> )- <i>N</i> -Isobutyleicosa-2,4,15- trienamid / (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> )- <i>N</i> -	scharf	0,74
		tingling	1,48

	Isobutyleicosa-2,4,14-trienamid		
<b>38a/b</b>	1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> -trienoyl)-pyrrolidin / 1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -trienoyl)-pyrrolidin	scharf	0,40
		tingling	0,81
<b>39a/b</b>	1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> -trienoyl)-piperidin / 1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> -trienoyl)-piperidin	scharf	0,26
		tingling	0,52

n.b. = nicht bestimmt.

Bei den sensorischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass neben Piperin (**21**) alle seine Analoga (**22–32**) einen scharfen Sinneseindruck auslösten. Die Alkamide hingegen verursachten, neben einer scharfen, zusätzlich eine tingelnde Empfindung, wenn sie neben der 2,4-Dienamid-Struktur eine *cis*-ständige Doppelbindung aufwiesen (**33a/b–35a/b** und **37a/b–39a/b**). Verbindung **36**, der diese Doppelbindung fehlt, löste folglich auch bei höheren Konzentrationen eine reine Schärfe aus. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Untersuchungen von Galopin et al. (2004), die langkettige Polyenammine aus der Sanshool- und Bungeanool-Familie sensorisch bewerteten. Die Arbeitsgruppe um Galopin konnte zeigen, dass die Schärfe und der Tingling-Effekt dieser Verbindungen von der *trans*-konfigurierten Doppelbindung in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe und von der *cis*-konfigurierten Doppelbindung in  $\gamma$ -Position zu dieser Doppelbindung entscheidend beeinflusst wird.

Während die Piperinanaloga Scharfschwellenwerte zwischen 0,003 und 1,15  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  aufwiesen, lagen die Scharfschwellen der Alkylamide zwischen 0,26 und 0,76  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ . Die Tingling-Schwellenwerte der Alkamide lagen durchschnittlich zwei bis drei Verdünnungsschritte über deren jeweiligen Scharfschwellen zwischen 0,52 und 2,14  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ .

Den geringsten Schwellenwert mit 0,003  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  hat dabei das Sensorikpanel für Piperin detektiert. Im Gegensatz dazu lagen die Schwellenwerte für Piperlonguminin (0,01  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ) und Piperilin (0,005  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ), die lediglich eine andere Base in ihrer Molekülstruktur aufweisen, um den Faktor 2 bis 3 höher. Bei dem Vergleich aller Schwellenwerte **21–39a/b** bestätigt sich die Annahme, dass die Piperidinderivate geringere Schwellenwerte aufweisen als die Pyrrolidin- beziehungsweise Isobutylaminanaloga. Neben der Amidfunktion beeinflusst weiterhin die Alkylteilstruktur die Scharfwahrnehmung. Während eine weitere *trans*-ständige Doppelbindung im Vergleich zu Piperin (**21**) keinen großen Einfluss auf die sensorische Wahrnehmung ausübt (vgl. Piperettin), hat die Absättigung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -ständigen Doppelbindungen, wie bei **30**, einen Anstieg des Schwellenwertes zur Folge.

### 4.5.3 Struktur und Aktivität von geschmacksaktiven Säureamiden

Für eine hohe biologische, ebenso wie für eine sensorische Aktivität, ist das Vorhandensein von bestimmten funktionellen Gruppen erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die für die scharfe Aktivität der Säureamide wichtigen Strukturelemente durch die Synthese chemischer Strukturanaloga identifiziert werden. Hierzu wurden verschiedene Derivate der Leitstruktur Piperin getestet und anschließend sensorischen Untersuchungen zu Struktur/Wirkungs-Beziehungen unterzogen. Für eine systematische Vorgehensweise bei der molekularen Modifikation bot es sich an, nicht nur die Base ( $R_1$  und  $R_2$ , Abbildung 82) sondern auch die Säureamidfunktion (X, Abbildung 82) der Leitstruktur unabhängig voneinander zu variieren. Vor den sensorischen Untersuchungen wurde die Reinheit synthetisch hergestellter Verbindungen mittels LC/MS-Analyse und NMR-Spektroskopie überprüft.

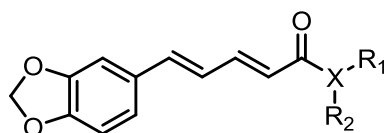
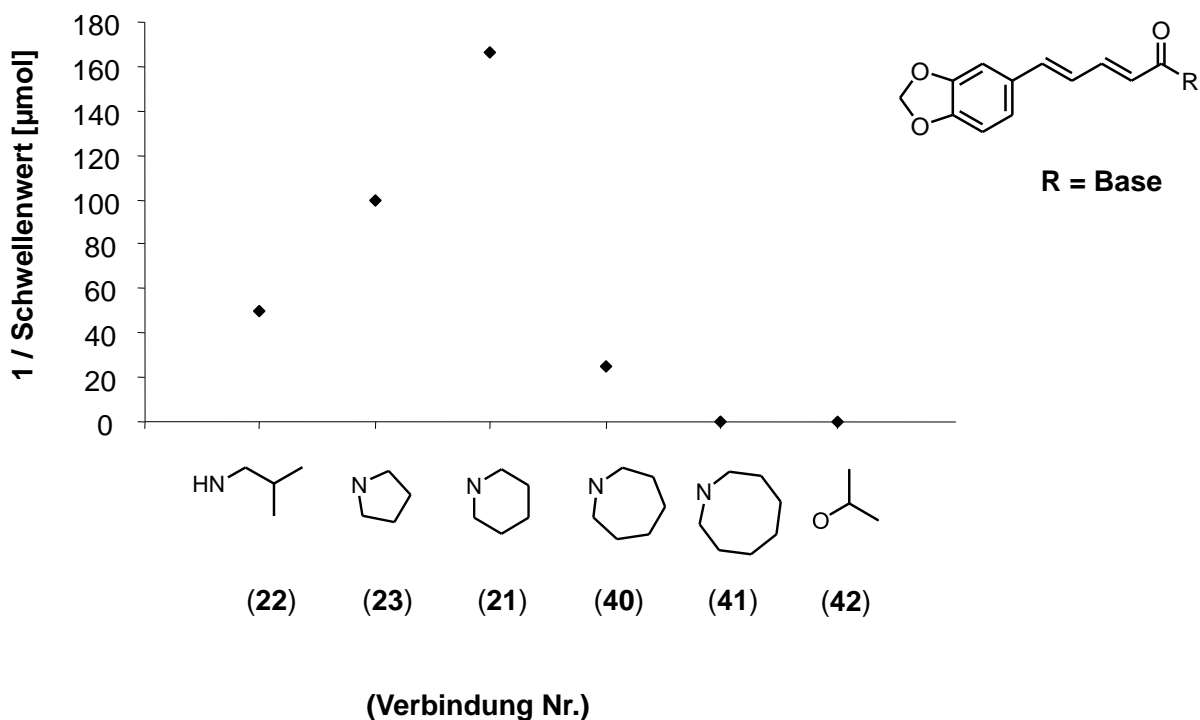


Abbildung 82: Struktur der Piperinleitstruktur.

In einem ersten Experiment wurden die Basen der Piperinleitstruktur variiert, um vor allem den Einfluss der Ringgröße auf die Scharfintensität herauszustellen. Analog zu der in Kapitel 4.4.1 vorgestellten Synthese wurde Piperinsäurechlorid mit Isobutylamin, Pyrrolidin, Hexamethylenimin, Heptamethylenimin und Diethylamin umgesetzt und aufgereinigt. Die synthetisierten Verbindungen **40–42** (Abbildung 83) wurden anschließend sensorisch charakterisiert. Hierzu wurden neben einer deskriptiven Beurteilung der Säureamide ihre Schwellenwerte mit Hilfe der Filterpapiersensorik (vgl. 4.5.1) bestimmt.



**Abbildung 83:** Untersuchung der Schärfe in Abhängigkeit von verschiedenartigen Stickstoffsubstituenten (R=Base), indem 1 durch den Schwellenwert [µmol] des Säureamides dividiert wurde.

Die sensorische Analyse ergab, dass Piperin (**21**) mit der Piperidinbase den niedrigsten Schwellenwert (0,006 µmol/ 1 × 2 cm) aufwies. Piperlonguminin (**22**) (0,02 µmol/ 1 × 2 cm) und Piperylin (**23**) (0,01 µmol/ 1 × 2 cm), die neben Piperin auch natürlich im Pfeffer vorkommen, erreichten Schwellenwerte, die um den Faktor 3 höher lagen. Eine Erhöhung der Ringgröße bis hin zum Achtring führte zu einer Abnahme beziehungsweise zu einem totalen Verlust der Schärfe. Verbindung **40**, bei der Hexamethylenimin an die Piperinsäure addiert wurde, führte beispielsweise zu einer Schwellenwerterhöhung um den Faktor 6 im Vergleich zu Piperin. Verbindung **41** wies dagegen keine Schärfe mehr auf, sondern schmeckte bitter.

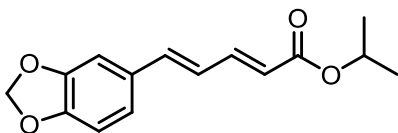
Zusammenfassend zeigte sich, dass die natürlich vorkommenden Säureamidderivate, insbesondere das Piperin, sensorisch am aktivsten sind.

Ott und Zimmermann (1921) konnten erstmals mit Hilfe von Struktur/Wirkungsbeziehungen den essenziellen Teil des Piperinmoleküls herausarbeiten, der für den scharfen Eindruck

verantwortlich ist. Durch synthetische Piperinanderivate stellten sie heraus, dass die Säureamidfunktion des Moleküls unabdingbar ist für den scharfen Eindruck des Piperins.

Auch Capsaicinanaloga, wie das Capsiat, die im Gegensatz zum Capsaicin eine Säurefunktion, jedoch keine Säureamidfunktion aufweisen, konnten erstmals von Kobata et al. (1998) aus süßem Paprika (*Capsicum annuum* L.) isoliert und sensorisch charakterisiert werden. Kobata et al. beschrieben Capsiat und Dihydrocapsiat im Gegensatz zu Capsaicin als nicht beziehungsweise nur sehr gering scharf.

Um den Einfluss des Stickstoffatoms auf die Schärfe der Piperinanaloga zu verdeutlichen und die Studien von Ott und Zimmermann zu untermauern, wurde das Piperinsäurechlorid mit 2-Propanol verestert (Verbindung **42**, Abbildung 84).



**Abbildung 84: Struktur von 5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadiensäurepropylester (42).**

Die synthetische Verbindung wurde in Ethanol gelöst, auf Filterpapierstreifen aufgezogen und sensorisch verkostet. Da kein Scharfeindruck festgestellt wurde, konnte Otts und Zimmermanns Aussage bestätigt werden (Ott und Zimmermann, 1921).

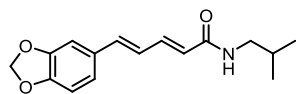
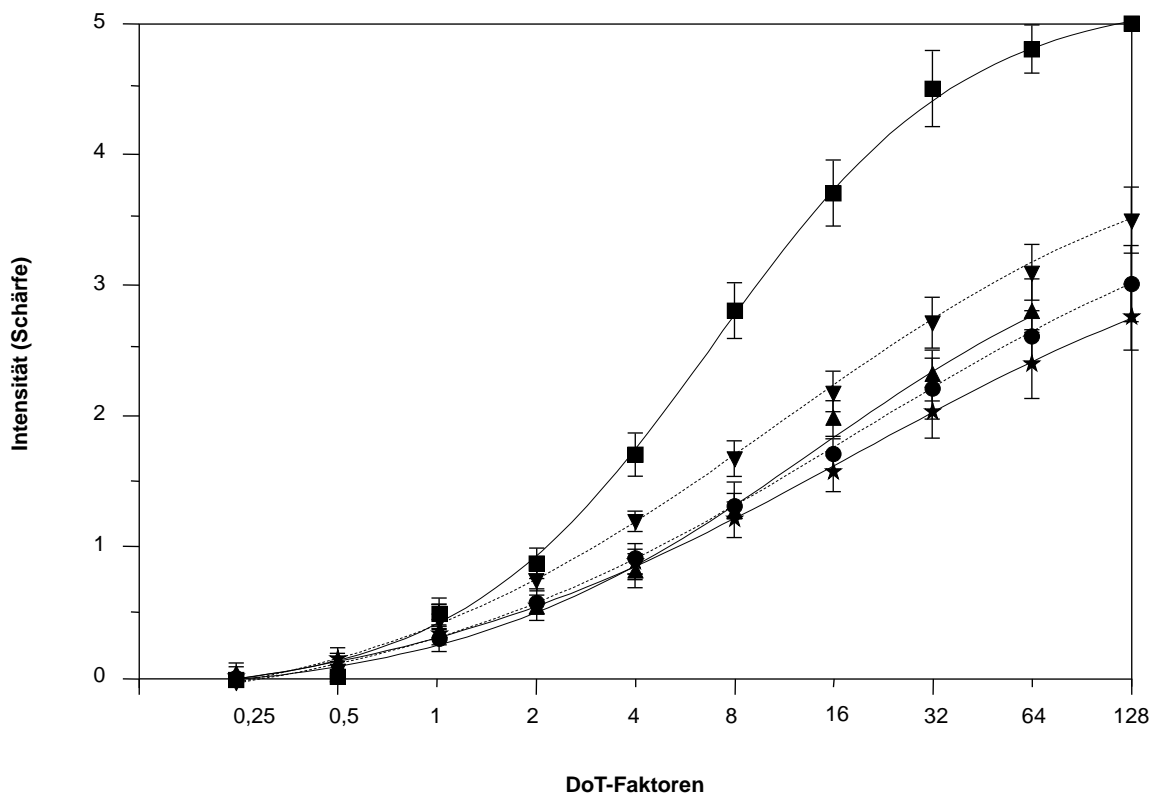
#### 4.5.4 Humane Dose/Response-Kurven ausgewählter Schlüsselinhaltsstoffe

Zusätzlich zu den Schwellenwerten und den jeweiligen DoT-Faktoren können die sensorischen Eigenschaften einer Verbindung mit Hilfe der Dose/Response-Kurven charakterisiert werden. Die Dose/Response-Kurven liefern Daten zur sensorischen Wahrnehmung eines Scharfstoffes und ermöglichen das Erstellen und die Auswertung eines Sensorikprofils, abhängig von der Konzentration. Diese Form der sensorischen Beurteilung von sinnesphysiologisch aktiven Inhaltsstoffen ist sinnvoll, da oftmals kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Stoffes und der Intensität des sensorischen Eindruckes vorliegt, wie bereits Studien von Stark et al. (2005; 2006) und Brock und Hofmann (2008) gezeigt haben. Die Dose/Response-Kurven können außerdem der Lebensmittelindustrie die Berechnung

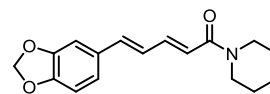
der Rezepturen von scharf wirkenden Lebensmitteln erleichtern, da die resultierende Schärfe anhand der Konzentration des Scharfstoffes abgeschätzt werden kann.

Dafür wurde eine Verdünnungsreihe einer sensorisch aktiven Verbindung von einem Faktor 0,25 bis zu 128 der jeweiligen Schwellenwertkonzentration angefertigt. Die jeweiligen Verdünnungsstufen wurden auf Filterpapier aufgebracht und von dem Panel innerhalb einer Substanz in aufsteigender Konzentration und durch Quervergleich mit den Referenzsubstanzen derselben DoT-Konzentration, mittels des „Half-Mouth“-Tests auf 1 × 2 cm großen Filterpapierstreifen evaluiert. Um jede Verdünnungsstufe auf einer Intensitätsskala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) einstuft zu können, wurde Piperin als Referenzsubstanz in einem Vorversuch, bei dem dessen 128-fache Verdünnung über dem Schwellenwert auf den Höchstwert von 5,0 festgelegt wurde, auf der Skala eingeordnet.

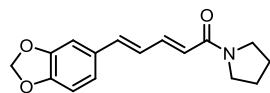
In der Abbildung 85 sind die Dose/Response-Kurven der Scharfstoffe Piperlonguminin (**22**), Piperylin (**23**), Piperettin (**25**) und der Mischung aus (2*E*,4*E*,13*Z*)-*N*-Isobutyloctadeca-2,4,13-trienamid (**33a**) und (2*E*,4*E*,12*Z*)-*N*-Isobutyloctadeca-2,4,12-trienamid (**33b**) im Vergleich zu Piperin (**21**) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist zum einen der unterschiedliche Verlauf der sigmoiden Dose/Response-Funktionen, zum anderen die verschiedenen Intensitäten bei einer 128-fachen Konzentration über dem Schwellenwert der Pfefferscharfstoffe. Obwohl Piperylin, Piperettin und Piperlonguminin Strukturanaloga zu Piperin sind, wurde keiner der evaluierten Scharfstoffe bei einer der Verdünnungskonzentrationen so intensiv empfunden, beziehungsweise zeigte einen so hohen Response wie Piperin. Während Piperin bei einer 128-fachen Schwellenwertkonzentration mit 5,0 beurteilt wurde, riefen Piperylin, Piperlonguminin und Piperettin lediglich Intensitäten von 3,0, 2,7 und 3,5 auf. Da der Schwellenwert von **33a/b** mit 0,54 µmol/cm<sup>2</sup> vergleichbar hoch lag und die Isolierung aus Pfeffer zeitaufwendig war, wurde die höchste, sensorisch beurteilte Konzentration bei 34,56 µmol/cm<sup>2</sup> gewählt. Der sigmoide Verlauf der Amidmischung **33a/b** ähnelte denen der Piperinanaloga, kam jedoch ebenfalls nicht an den oberhalb liegenden Response von Piperin heran. Bei keiner der untersuchten Verbindungen stagnierte die Dose/Response-Kurve in ihrer Sättigung. Dennoch wurde die 128-fache Konzentration über dem Schwellenwert des Piperins von dem Sensorikpanel als unerträglich scharf beschrieben.



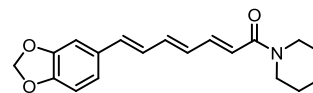
(22)



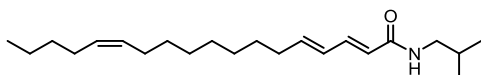
(21)



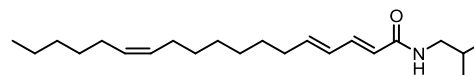
(23)



(25)



(33a)



(33b)

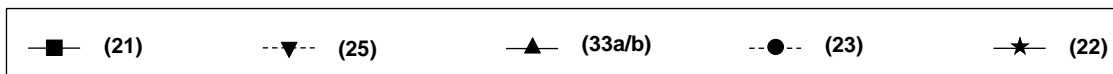


Abbildung 85: Dosis-Wirkungskurven ausgewählter Scharfstoffe. Die Fehlerbalken zeigen das Konfidenzintervall (P = 95%) des Mittelwertes.

#### 4.5.5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen bestehende Sensorikmethoden, wie den von Scharbert et al. (2004) entwickelten „Half-Mouth“-Test, so zu modifizieren, dass auch die unpolaren Pfefferinhaltsstoffe (**21–39a/b**) in einem ethanolfreien Medium evaluiert werden können. Dazu wurden die zu verkostenden Stimuli jeweils in Ethanol gelöst, auf Filterpapierstreifen definierter Größe aufgebracht und nach Entfernen des Lösungsmittels gegen einen Blindwert verkostet. Weitere psychophysikalische Experimente zeigten, dass insbesondere die Verwendung von Filterpapierstreifen mit einer Größe von 1 × 2 cm ideal sind, um Degustationsexperimente mit Scharf- ebenso wie mit Tingling-Substanzen durchzuführen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Scharfempfindung abhängig ist von der Größe der aktivierten Fläche sowie der Absolutkonzentration des Stimulus.

Um erstmals detaillierte Kenntnisse über die sensorische Aktivität von natürlichen und strukturverwandten Säureamiden des Pfeffers zu erhalten, wurden diese im Anschluss sensorisch charakterisiert. Alle isolierten und identifizierten Piperinanaloga (**21–32**) hinterließen nach ihrer Degustation einen ausgeprägten Scharfeindruck. Dagegen verursachten die Alkamide neben einer scharfen, zusätzlich eine tingelnde Wirkung, wenn sie neben der 2,4-Dienamid-Struktur eine *cis*-ständige Doppelbindung aufwiesen (**33a/b–35a/b** und **37a/b–39a/b**). Sämtliche Scharfschwellenwerte lagen zwischen 0,003 und 0,76  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , wohingegen die Tingling-Schwellenwerte der Alkamide zwischen 0,52 und 2,14  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  bestimmt wurden. Die große sensorische Schlüsselrolle, die Piperin (**21**) in schwarzem Pfeffer übernimmt, konnte nicht nur mit seinem niedrigen Schwellenwert bei 0,003  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , sondern auch mit Hilfe von Dosis/Wirkungs-Kurven untermauert werden. Auch abschließende Struktur-Wirkungsbeziehungen, die mit synthetisch generierten Piperinanaloga durchgeführt wurden, untermauern die psychophysikalische Sonderstellung des Piperins mit seiner Base Piperidin.



## 4.6 Quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Schlüssel-inhaltsstoffe des Pfeffers

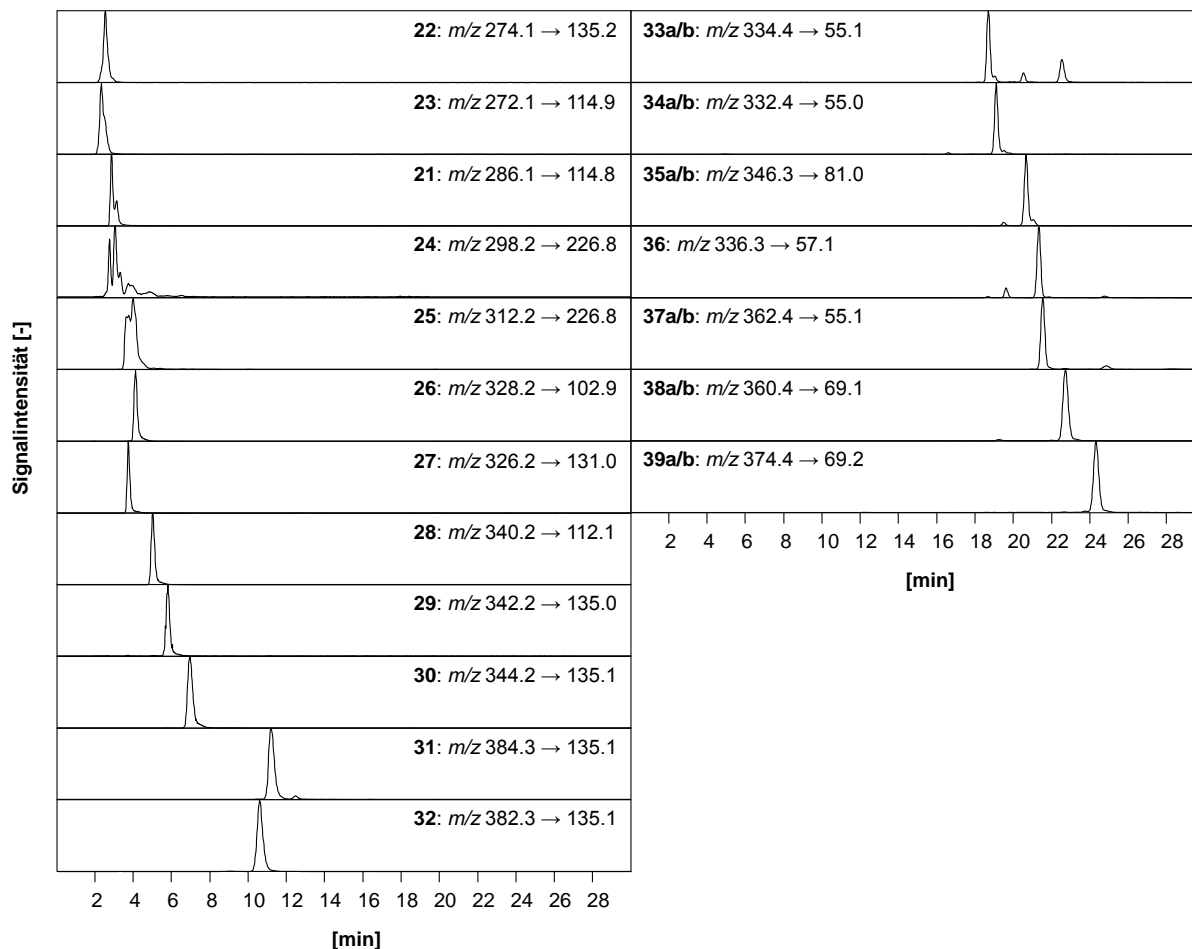
Um einen Einblick in die Konzentrationen der identifizierten Säureamide **21–39a/b** in diversen Pfefferproben zu erhalten, galt, anknüpfend an frühere Quantifizierungsmethoden, das Interesse der Entwicklung eines analytischen Verfahrens zur Untersuchung der nichtflüchtigen, sensorisch aktiven Pfefferinhaltsstoffe. Die Arbeitsgruppe um Friedman et al. entwickelte beispielsweise 2008 eine quantitative Methode mittels LC-MS/MS zur Analyse von Piperin und ausgewählten Piperinanaloga, mittels externer Kalibration über einen Standard (Piperin). Dabei wurden die Alkamide jedoch nicht berücksichtigt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ebenfalls eine quantitative Methode für die komplex zusammengesetzte Pfeffermatrix entwickelt werden, mit der alle sensorisch aktiven Verbindungen exakt erfasst und analysiert werden können. Zudem sollte eine Methode gefunden werden, in der die Pfefferverbindungen chromatographisch getrennt und selbst die Minorkomponenten exakt charakterisiert werden können. Dabei bot sich die Quantifizierung mittels externer Kalibration in Kombination mit der Massenspektroskopie an. Darüber hinaus sollte der Beitrag, den die sensorisch aktiven Inhaltsstoffe in der Matrix zum Gesamteindruck des schwarzen Pfeffers leisten, durch Ermittlung des „Dose-over-Threshold“ (DoT)-Faktors bestimmt werden.

### 4.6.1 Quantifizierung von Scharfstoffen in schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum* L.) und Berechnung von Dose-over-Threshold (DoT)-Faktoren

Alle identifizierten und unter Kapitel 4.4 beschriebenen Säure- und Alkylamide (**21–39a/b**) wurden in verschiedenen Pfefferproben mit der neu entwickelten LC-MS/MS-Methode und externer Standardkalibrierung quantifiziert. Um eine optimale Empfindlichkeit bei den LC-MS/MS-Messungen zu erreichen, wurden zunächst die Ionisierungsparameter der Reinsubstanzen beziehungsweise der Alkylamidmischungen (**21–39a/b**) im positiven Elektrospraymodus (ESI<sup>+</sup>) optimiert. Eine Übersicht über die Parameter ist der Tabelle 15 zu entnehmen. Vorversuche zum Extraktionsverhalten der Säureamide mit verschiedenen Lösungsmitteln verdeutlichten, dass mit Ethanol nach achtfacher Wiederholung eine vollständige und reproduzierbare Extraktion möglich ist. Folglich wurden zur Analyse der Pfefferproben Ethanolextrakte angefertigt und auf definierte Volumina aufgefüllt. Der Abbildung 86 sind die normierten Massenspuren der Piperin-analogen Säureamide (links) sowie der unpolaren Alkylamide

(rechts), die alle aus einem LC-MS/MS-Lauf des schwarzen Pfeffers stammen, zu entnehmen. Da die Isomere der Alkylamide chromatographisch nicht zu separieren waren, wurden diese als Summe quantifiziert.



**Abbildung 86:** Extrahierte Massenspuren der Säureamide 21–39a/b aus dem LC-MS/MS-Chromatogramm von schwarzem Pfeffer. Die Signalintensitäten der Massenübergänge sind normalisiert.

Da für die Bestimmung der Hauptkomponente des Pfeffers Piperin neben Minorkomponenten eine gemeinsame Aufarbeitungsmethode verwendet werden sollte, wurden Ethanol-extrakte der jeweils analysierten Pfefferprobe angefertigt. Bis auf Piperin (**21**) wurden alle Analyten direkt aus der Stammlösung analysiert. Zur Quantifizierung von **21**, wurde eine 1:50 Verdünnung der Stammlösung vorgenommen und in derselben Weise analysiert.

In einem ersten Experiment wurde handelsüblicher schwarzer, ganzer Pfeffer im positiven MRM-Modus mittels Elektrosprayionisierung (ESI<sup>+</sup>) analysiert. Wie aus Tabelle 11 entnommen werden kann, sind Piperin mit über 14,51  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  und die Alkylamide (2*E*,4*E*,15*Z*)-*N*-Isobutyleicosa-2,4,15-trienamid (**37a**) und (2*E*,4*E*,14*Z*)-*N*-Isobutyleicosa-2,4,14-trienamid (**37b**) mit 16,32  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  die dominierenden Komponenten in ganzen, schwarzen Pfefferkörnern. Unter den piperinanalogen Verbindungen fielen besonders Piperlonguminin, Piperylin, Piperettin und Dehydropipernonalin mit hohen Gehalten zwischen 0,37 und 1,14  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  auf. Aber auch die Alkylamide (**33a/b–39a/b**) konnten mit Mengen von 0,41 bis 16,32  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  charakterisiert werden.

Basierend auf den in 4.5.2 ermittelten psychophysikalischen Schwellenwertkonzentrationen, wurden die jeweiligen DoT-Faktoren der Pfefferamide berechnet, die das Verhältnis zwischen der Konzentration und der Schwellenwertkonzentration eines Stimulus darstellten. Da 100 mg ca. drei Pfefferkörnern entsprechen, einer Menge, deren Scharfintensität die Panelisten im Mundraum noch akzeptabel fanden, wurden die DoT-Faktoren aus den Konzentrationen  $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$  berechnet. Aufgrund der höheren DoT-Faktoren (Tabelle 11) trugen die Piperinanaloga maßgeblich zum scharfen Eindruck des schwarzen Pfeffers bei. Den höchsten DoT-Faktor erreichte mit 4836,7 Piperin (**21**), gefolgt von Piperlonguminin (**22**), Piperettin (**25**) und Piperylin (**23**). Aber auch Dehydropipernonalin (**28**) und Retrofractamid A (**26**) wiesen DoT-Faktoren über eins auf. Im Vergleich mit **21–23** wiesen die Alkylamide (**33a/b–39a/b**) geringere DoT-Werte zwischen 0,5 und 22,1 (berechnet für Schärfe) auf. Da die Fettsäureamide neben ihrem Scharfeindruck auch einen Tingling-Effekt in Degustationsexperimenten hervorgerufen hatten, konnte zusätzlich der jeweilige DoT-Faktor mit Hilfe ihrer Tingling-Schwellenwerte errechnet werden. Dabei zeigte sich, dass insbesondere die unpolaren langkettigen Amide **37a/b–39a/b** Faktoren zwischen 1,3 und 11,0 aufwiesen, die damit definitionsgemäß zum sensorischen Gesamteindruck von schwarzen Pfefferkörnern beitragen.

**Tabelle 11: Sensorische Qualität, Schwellenwerte, Konzentrationen und Dose-over-Threshold-Faktoren der in ganzen schwarzen Pfefferkörnern identifizierten Säureamide.**

Analyt	Konzentration [ $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ ]	Sensorische Qualität	Schwellenwert [ $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ]	DoT-Faktor
Piperlonguminin ( <b>22</b> )	1,14	scharf	0,01	114,0
Piperylin ( <b>23</b> )	0,37	scharf	0,005	74,0
Piperin ( <b>21</b> )	14,51	scharf	0,003	4836,7
Piperolein ( <b>24</b> )	<0,1	scharf	0,01	<0,1
Piperettin ( <b>25</b> )	0,54	scharf	0,005	108,0
Retrofractamid A ( <b>26</b> )	0,09	scharf	0,025	3,6
1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i> -nonatrienyl]-pyrrolidin ( <b>27</b> )	0,06	scharf	n.b.	n.b.
Dehydropiperonalin ( <b>28</b> )	0,51	scharf	0,15	3,4
Piperonalin ( <b>29</b> )	0,16	scharf	n.b.	n.b.
Piperolein B ( <b>30</b> )	0,09	scharf	1,15	<0,1
Guineensin ( <b>31</b> )	0,11	scharf	0,81	0,1
Brachyamid A ( <b>32</b> )	0,04	scharf	n.b.	n.b.
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> )- <i>N</i> -Isobutyloctadeca-2,4,12/13-trienamid ( <b>33a/b</b> )	1,04	scharf tingling	0,54 2,14	1,9 0,5
1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> -trienoyl)-pyrrolidin ( <b>34a/b</b> )	0,64	scharf tingling	n.b. n.b.	n.b. n.b.
1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> -trienoyl)-piperidin ( <b>35a/b</b> )	0,56	scharf tingling	n.b. n.b.	n.b. n.b.
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- <i>N</i> -Isobutyloctadeca-2,4-dienamid ( <b>36</b> )	0,41	scharf	0,76	0,5
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> )- <i>N</i> -Isobutyleicosa-2,4,14/15-trienamid ( <b>37a/b</b> )	16,32	scharf tingling	0,74 1,48	22,1 11,0
1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> -trienoyl)-pyrrolidin ( <b>38a/b</b> )	1,02	scharf tingling	0,40 0,81	2,6 1,3
1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> -trienoyl)-piperidin ( <b>39a/b</b> )	2,40	scharf tingling	0,26 0,52	9,2 4,6

n.b. = nicht bestimmt.

Die 25 ausgewählten Säureamide wurden zusätzlich mittels der entwickelten Methode in unterschiedlichen Pfefferdrogen quantifiziert, deren Ergebnisse im Folgenden aufgeführt sind.

#### 4.6.2 Quantifizierung der Säureamide in unterschiedlichen Pfefferdrogen der Familie der Piperaceae

Die zuvor aus schwarzem Pfeffer beschriebenen Säureamide wurden zusätzlich in weiteren handelsüblichen Pfefferdrogen aus der Familie der Piperaceae mittels externer Standards und LC-MS/MS im positiven ESI-Modus (vgl. 4.6.1) quantifiziert. Zum einen sollte ein Überblick über das Vorkommen der Piperinanaloga sowie der Alkamide, zum anderen über deren jeweilige Verteilung in verschiedenen Vertretern der Pfefferfamilie erhalten werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 12: Quantitative Daten [ $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ ] der identifizierten Säureamide 21–39a/b und deren DoT-Faktoren (DoT) in schwarzen ganzen (A), schwarzen gemahlenden (B), weißen ganzen (C), weißen gemahlenden (D), grünen ganzen (E) sowie langen ganzen (F) Pfefferkörnern.**

Analyt	Konzentration [ $\mu\text{mol}/100\text{ mg}$ ] und (DoT) in Pfefferproben					
	A	B	C	D	E	F
Piperlonguminin (22)	1,14 (114,0)	0,86 (86,0)	0,58 (58,0)	0,56 (56,0)	0,13 (13,0)	2,57 (257,0)
Piperylin (23)	0,37 (74,0)	0,30 (60,0)	0,31 (62,0)	0,34 (68,0)	0,41 (82,0)	n.d. (n.b.)
Piperin (21)	14,51 (4837,0)	14,95 (4983,3)	16,57 (5523,3)	16,39 (5463,3)	16,31 (5436,7)	14,37 (4790,0)
Piperolein (24)	<0,1 (n.b.)	<0,1 (n.b.)	<0,1 (n.b.)	<0,1 (n.b.)	<0,1 (n.b.)	n.d. (n.b.)
Piperettin (25)	0,54 (108,0)	0,44 (88,0)	0,48 (96,0)	0,45 (90,0)	0,69 (138,0)	n.d. (n.b.)
Retrofractamid A (26)	0,09 (3,6)	0,11 (4,4)	0,02 (0,8)	0,02 (0,8)	0,09 (36,0)	0,02 (0,8)
1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin (27)	0,06 (n.b.)	0,07 (n.b.)	<0,1 (n.b.)	<0,1 (n.b.)	0,13 (n.b.)	n.d. (n.b.)
Dehydropiperonalin (28)	0,51 (3,4)	0,46 (3,1)	0,26 (1,7)	0,30 (2,0)	0,47 (3,1)	0,90 (6,0)

Piperonalin ( <b>29</b> )	0,16 (n.b.)	0,29 (n.b.)	0,24 (n.b.)	0,30 (n.b.)	0,56 (n.b.)	4,08 (n.b.)
Piperolein B ( <b>30</b> )	0,09 (0,1)	0,17 (0,1)	0,13 (0,1)	0,16 (0,1)	0,32 (0,3)	2,34 (2,0)
Guineensin ( <b>31</b> )	0,11 (0,1)	0,10 (0,1)	0,04 (0,1)	0,05 (<0,1)	0,08 (0,1)	0,14 (0,2)
Brachyamid A ( <b>32</b> )	0,04 (n.b.)	0,03 (n.b.)	0,01 (n.b.)	0,01 (n.b.)	0,04 (n.b.)	n.d. (n.b.)
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> )- <i>N</i> - Isobutyloctadeca- 2,4,12/13-trienamid ( <b>33a/b</b> )	1,04 (1,9 <sup>s</sup> /0,5 <sup>t</sup> )	0,91 (1,7 <sup>s</sup> /0,4 <sup>t</sup> )	0,58 (1,1 <sup>s</sup> /0,3 <sup>t</sup> )	0,59 (1,1 <sup>s</sup> /0,3 <sup>t</sup> )	0,72 (1,3 <sup>s</sup> /0,3 <sup>t</sup> )	1,44 (2,7 <sup>s</sup> /0,7 <sup>t</sup> )
1-(Octadeca- 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> -trienoyl)- pyrrolidin ( <b>34a/b</b> )	0,64 (n.b.)	0,48 (n.b.)	0,19 (n.b.)	0,20 (n.b.)	0,55 (n.b.)	0,05 (n.b.)
1-(Octadeca- 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> -trienoyl)- piperidin ( <b>35a/b</b> )	0,56 (n.b.)	0,42 (n.b.)	0,17 (n.b.)	0,18 (n.b.)	0,36 (n.b.)	2,83 (n.b.)
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- <i>N</i> - Isobutyloctadeca-2,4- dienamid ( <b>36</b> )	0,41 (0,5)	0,32 (0,4)	0,12 (0,2)	0,13 (0,2)	0,17 (0,2)	0,30 (0,4)
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> )- <i>N</i> - Isobutyleicosa- 2,4,14/15-trienamid ( <b>37a/b</b> )	16,32 (22,1 <sup>s</sup> /11,0 <sup>t</sup> )	9,78 (13,2 <sup>s</sup> /6,6 <sup>t</sup> )	4,03 (5,4 <sup>s</sup> /2,7 <sup>t</sup> )	3,96 (5,4 <sup>s</sup> /2,7 <sup>t</sup> )	6,29 (8,5 <sup>s</sup> /0,7 <sup>t</sup> )	23,62 (31,9 <sup>s</sup> /15,9 <sup>t</sup> )
1-(Eicosa- 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> -trienoyl)- pyrrolidin ( <b>38a/b</b> )	1,02 (2,6 <sup>s</sup> /1,3 <sup>t</sup> )	0,46 (1,2 <sup>s</sup> /0,6 <sup>t</sup> )	0,05 (0,1 <sup>s</sup> /0,1 <sup>t</sup> )	0,08 (0,2 <sup>s</sup> /0,1 <sup>t</sup> )	0,61 (1,5 <sup>s</sup> /0,8 <sup>t</sup> )	0,15 (0,4 <sup>s</sup> /0,2 <sup>t</sup> )
1-(Eicosa- 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> -trienoyl)- piperidin ( <b>39a/b</b> )	2,40 (9,2 <sup>s</sup> /4,6 <sup>t</sup> )	1,38 (5,3 <sup>s</sup> /2,7)	0,35 (1,3 <sup>s</sup> /0,7 <sup>t</sup> )	0,43 (1,7 <sup>s</sup> /0,8 <sup>t</sup> )	1,02 (3,9 <sup>s</sup> /2,0 <sup>t</sup> )	10,98 (42,2 <sup>s</sup> /21,1 <sup>t</sup> )

<sup>s</sup>DoT-Faktor für Scharf; <sup>t</sup>Dot-Faktor für Tingling; n.b. = nicht bestimmt; n.d. = nicht detektiert.

Die quantitativen Analysen ergaben, dass in allen untersuchten Pfefferproben Piperin (**21**) mit Gehalten zwischen 14369,4 und 16570,4 µmol/100 mg und (2*E*,4*E*,14/15*Z*)-*N*-Isobutyleicosa-2,4,14/15-trienamid (**37a/b**) mit Gehalten bis zu 16321,2 µmol/100 mg die mengenmäßig dominierenden Säureamide darstellten.

Die eingangs unter 4.1 beschriebenen vergleichenden Profilsensoren zeigten deutliche Unterschiede in den Scharfintensitäten der unterschiedlichen analysierten Pfefferproben. Beispielsweise wurde schwarzer Pfeffer im Vergleich zu langem Pfeffer als deutlich schärfer empfunden (schwarzer Pfeffer: 5; langer Pfeffer: 2,7). Der Vergleich der Pipingehalte in den unterschiedlichen Handelsproben verdeutlicht jedoch, dass alle untersuchten Proben Pipingehalte zwischen 14369,4 und 16570,4 µmol/100 mg aufwiesen. Folglich lag die

Vermutung nahe, dass die Piperinkonzentrationen der Pfeffersorten zwar dominierend an deren Schärfe beteiligt sind, jedoch nicht deren sensorischen Unterschiede erklären können.

Viel stärker variieren die Gehalte der Alkylamide in den verschiedenen Pfeffersorten. Während langer Pfeffer (*Piper longum* L.) z. B. die höchsten (2*E*,4*E*,14/15*Z*)-*N*-Isobutyleicosa-2,4,14/15-trienamid-Mengen (**37a/b**) aufwies, besaß der weiße gemahlene Pfeffer (*Piper nigrum* L.) die geringsten Mengen. Die verhältnismäßig hohen DoT-Faktoren der Verbindungen **33a/b** sowie **37a/b–39a/b** für Tingling des langen Pfeffers stehen im Einklang mit dessen ausgeprägter sensorischer Tinglingnote. Die schwächere Scharfnote dieses Pfeffers lässt sich vermutlich auf das Fehlen zahlreicher Piperinanaloga wie **23**, **25** oder **27** zurückführen.

Neben der Sorte scheinen aber auch die unterschiedlichen Handelsformen (Proben A, C und E, Tabelle 12) einen Einfluss auf die Mengenverhältnisse der Schlüsselscharfstoffe zu haben. Obwohl der Vergleich zwischen schwarzem, weißem und grünem Pfeffer mit käuflich erworbenen Handelsproben aus unterschiedlichen Batches durchgeführt wurde, die nicht von ein und derselben Pflanzen unterschiedlicher Reifestadien einer Region stammen, repräsentieren die Werte jedoch Pfeffergewürze, die dem Verbraucher zur Verfügung stehen. Wie in Tabelle 12 zu sehen ist, ähnelten sich der weiße und grüne Pfeffer in Bezug auf ihre Piperingehalte von ca. 16 µmol/100 mg. Obwohl der schwarze Pfeffer geringere Konzentrationen an **21** aufwies, konnten dennoch doppelt bis neunfach so hohe Piperlongumininwerte beobachtet werden. Auffällig war zudem, dass die Zusammensetzung der Säureamide **22–31** untereinander in den Proben A, C und E stark schwankten. Auch die Alkylamidgehalte des weißen, schwarzen und grünen Pfeffers wichen voneinander ab. Während die schwarzen ganzen Pfefferkörner hohe Gehalte und damit auch DoT-Faktoren deutlich über eins aufwiesen, zeichneten sich die weißen und grünen Pfefferkörner weniger durch die Komponenten **33a/b–39a/b** aus.

Darüber hinaus wurde, im Vergleich zu den ganzen Körnern, in den gemahlene Pfeffergewürzen B und D eine verringerte Alkylamidkonzentration gefunden.

### 4.6.3 Diskussion

Um weitere Einblicke in das molekulare Verständnis des Schaf- und Tinglingeindrucks des Pfeffers zu erhalten, wurden mit Hilfe von quantitativen Untersuchungen sämtliche identifizierten sensorisch aktiven Säureamide (**21–39a/b**) in einer Auswahl an verschiedenen Pfeffergewürzen bestimmt. Obwohl bereits einige Quantifizierungsmethoden zur Bestimmung

von Säureamiden in Piperaceae zu finden sind (z. B.: Friedman et al., 2008), gelang es erstmals, neben den Piperinanaloga auch die Alkylamide in einer Methode zu erfassen. Besonders um die Relevanz einzelner Verbindungen im Hinblick auf das sensorische Gesamtprofil der Pfeffersorten zu objektivieren, sollten deren Dose-over-Threshold-Faktoren bestimmt werden. Dazu wurde zunächst eine Analysenmethode im ESI<sup>+</sup>-Modus unter Nutzung der LC-MS/MS und externer Standardkalibrierung entwickelt. Bereits die Analyse schwarzer, ganzer Pfefferkörner erbrachte, dass neben Piperin eine Vielzahl an weiteren Säureamiden aus dem Pfeffer DoT-Faktoren >1 aufwies. Per Definition tragen damit neben Piperin weitere Säureamide zum Scharf- und Tinglingeindruck des Pfeffers bei. Analog zu dem sensorischen Eingangsexperiment aus 4.2 konnte auch mit Hilfe der kalkulierten DoT-Werte gezeigt werden, dass der Piperingehalt in schwarzem Pfeffer zwar eine sensorische Schlüsselrolle übernimmt, jedoch nicht allein für die Schärfe des Gewürzes verantwortlich ist. Damit konnten zum einen Literaturpassagen, in denen den Säureamiden die Schärfe des Pfeffers zugeschrieben wird, bestätigt werden (Parmar et al., 1997) und zum anderen Aussagen, dass Piperin allein für die Schärfe des Pfeffers verantwortlich sei, widerlegt werden (Franke, 1997; Freist, 1991). Darüber hinaus konnte erstmals die sensorische Bedeutung der Fettsäureamide **33a/b–39a/b** in Bezug auf die Schärfe ebenso wie auf den Tinglingeindruck herausgearbeitet werden.

Bei den vergleichenden Untersuchungen von unterschiedlichen Handelsproben, wie schwarzem, weißem, langem und grünem Pfeffer zeigte sich, dass Piperin (**21**) in allen Proben unter allen analysierten Säureamiden mit Abstand den höchsten DoT-Faktor aufwies. Analog zum ganzen schwarzen Pfeffer, spielen aber weitere Piperinanaloga sowie die Alkylamide ebenfalls eine Rolle für den psychophysikalischen Gesamteindruck der Pfeffersorten.

Um genauere Aussagen treffen zu können, inwieweit Erntezeitpunkte, Verarbeitungsprozesse, Umweltstress, verschiedene Züchtungen oder Sorten einen Einfluss auf das Sensorikprofil, beziehungsweise auf die Mengenverteilung der Säureamide haben, wäre es sinnvoll, in der Zukunft gezielt Proben aus einer definierten Pflanzenreihe zu analysieren. Genauere Untersuchungen zu den Veränderungen der Säureamidzusammensetzung der ganzen im Vergleich zu den gemahlten Körnern könnten aufschlussreiche Erkenntnisse über die Scharfqualität der beiden Handelsformen erbringen.



## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Untersuchungsmaterialien, Reagenzien und Materialien

#### 5.1.1 Untersuchungsmaterialien

##### 5.1.1.1 Spargelproben

Um die geschmacksaktiven Substanzen aus Spargel (*Asparagus officinalis* L.) isolieren zu können, wurde die niederländische Spargelsorte Grolim als Untersuchungsmaterial gewählt, die zum einen vom deutschen Züchtungsforschungsinstitut in Quedlinburg (Julius Kühn-Institut, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, 2005) zur Verfügung gestellt und zum anderen bei den Spargelhöfen Lütke-Laxen in Münster (2007) und Paintner in Schrobenhausen (2008/2009/2010) käuflich erworben wurden.

Spargeljungpflanzen der Sorte Grolim wurden von Maatschap Landers, Kessel aus den Niederlanden bezogen. Saatgut der Sorte Rapsody aus der Ernte 2005 wurde freundlicherweise von der Südwestdeutschen Saatzucht GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Für die quantitativen Analysen wurde grüner ebenso wie weißer Spargel (18–22 cm) im deutschen Einzelhandel oder direkt auf Spargelhöfen in Schrobenhausen käuflich erworben.

##### 5.1.1.2 Pfefferproben

Um die sensorisch aktiven Substanzen aus dem Pfeffer (*Piper nigrum* L.) isolieren zu können, wurden schwarze, ganze Pfefferkörner der Firma Ostmann als Untersuchungsmaterial gewählt, die im Handel käuflich erworben wurden.

Für weitere quantitative Studien wurden verschiedene Pfeffersorten im Handel oder auf dem heimischen Markt erworben.

### 5.1.2 Reagenzien

Die eingesetzten Reagenzien haben, soweit nicht anders erwähnt, p.a.-Qualität. Wasser für die HPLC wird von einem Milli-Q-Wasser Advantage A 10 Reinigungssystem (Millipore, Molsheim, Frankreich) erhalten. Bei den sensorischen Untersuchungen des Spargels wird mineralstoffarmes Evian<sup>®</sup>-Wasser verwendet, das mit verdünnter Salzsäure (0,1%) auf pH 5,9 eingestellt wird. Für alle weiteren Verwendungszwecke wird destilliertes Wasser verwendet. Folgende Reagenzien, Materialien und Lösungsmittel werden kommerziell erworben:

Aceton (LiChrosolv), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Acetonitril, HPLC grade, J.T.Baker, Deventer, Niederlande  
Aliquat 336, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ameisensäure, Merck, Darmstadt, Deutschland  
D(-)-Arabinose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Capsaicin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Chloroform, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Coffein, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Deuteriumoxid, Euriso-top, Giv-sur-Yvette, Frankreich  
Dichlormethan, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Diethylamin, Fluka, Buchs, Schweiz  
Diethylether, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Dimethylsulfoxid-d<sub>6</sub>, Euriso-top, Giv-sur-Yvette, Frankreich  
Diosgenin, Extrasynthèse, Genay, Frankreich  
Eisen(III)chlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ethanol (LiChrosolv), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ethylacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ethylenglykol, Riedel-de-Haën AG, Seelze, Deutschland  
D(-)-Fructose, Merck, Darmstadt, Deutschland  
D(+)-Galactose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Ginsenosid Rg1, Extrasynthèse, Genay, Frankreich  
Ginsenosid Rg2, Extrasynthèse, Genay, Frankreich  
D(+)-Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Heptamethylenimin, 98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Hexadeuterodimethylsulfoxid, Euriso-Top, Giv-sur-Yvette, Frankreich  
Hexamethylenimin, 99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Hexan, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Inosin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland  
Kaliumcarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Kaliumiodid, VWR, Leuven, Belgien  
Magnesiumsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Methanol, HPLC grade, J.T.Baker, Deventer, Niederlande  
Methanol-d<sub>4</sub>, Euriso-top, Giv-sur-Yvette, Frankreich  
Methansulfonsäure, für die Ionenchromatographie, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
4-Methylbenzaldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland  
L-Milchsäure, Sigma-Aldrich (Fluka), Steinheim, Deutschland  
Natriumcarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumchlorid, Grüssing, Filsum, Deutschland  
Natriumhydrid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Natriumhydroxidlösung (1 M), Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland  
Natriumhydroxidlösung (0,1 M), Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland  
Natriumhydroxidlösung (0,4 M), Laborservice Onken, Gründau, Deutschland  
Natriumhydroxid, 50%, für die Ionenchromatographie, J.T.Baker, Deventer, Niederlande  
Natriumsulfat, wasserfrei, Merck, Darmstadt, Deutschland  
*n*-Pentan, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Phosphorpentoxid-Trockenmittel, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Piperidin, 99,5 +%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Piperin, 97%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Piperonal, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
2-Propanol, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Protodioscin, ChromaDex, LGC Promochem, Wesel, Deutschland  
Pyridin, wasserfrei, 99,8%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Pyridin-d<sub>5</sub>, Euriso-top, Giv-sur-Yvette, Frankreich  
Pyrrolidin, 99,5 +%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosid, Roth, Karlsruhe, Deutschland  
Rhamnose, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland  
Saccharose, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Salzsäure, 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland

Salzsäure (1 M), Grüssing, Filsum, Deutschland  
Sarsapogenin, Extrasynthese, Genay, Frankreich  
Schwefelsäure, 99%, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Siliconöl, Merck, Darmstadt, Deutschland  
 $\beta$ -Sitosterol-3-O-glucosid, ChromaDex, LGC Promochem, Wesel, Deutschland  
Stärke, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Sorbinsäure, Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland  
Tannin (Gallussäure), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
*tert.*-Butylmethylether (TBME), Merck, Darmstadt, Deutschland  
Tetrabutylammoniumhydroxid, Fluka, BioChemika, Seelze, Deutschland  
Tetrahydrofuran, 99 +%, Sigma, St. Louis, USA  
Tetramethylsilan (TMS), Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Thioessigsäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Thionylchlorid 99 +%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
Toluol, Merck, Darmstadt, Deutschland  
Triphenylphosphin, Merck, Darmstadt, Deutschland  
*cis*-Vaccensäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland  
D(+)-Xylose, Lancaster, Eastgate, England

### 5.1.3 Materialien

Faltenfilter (MN 615¼, 150 mm), Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

HPTLC-Platten (5 × 10 cm, Kieselgel 60 F<sub>254</sub> mit Konzentrierungszone 5 × 2,5 cm), Merck, Darmstadt, Deutschland

Kieselgel 60 (0,063–0,2 mm), Merck, Darmstadt, Deutschland

Kieselgelkartuschen (unmodifiziert), Chromabond® (45 µm) SiOH 6 ml/1000 mg, Machery-Nagel, Düren, Deutschland

LiChroprep® RP-18 (25–40 µm) für die Flüssigchromatographie, Merck, Darmstadt, Deutschland

Molekularsieb 4 Å, Merck, Darmstadt, Deutschland

RC-S Membranfilter (0,45 µm), Whatman, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Rundfilter classic, 94 mm, Melitta, Minden, Deutschland

Seesand, –50 +79 mesh, für chromatographische Zwecke, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Silanisierte Glasfaserwatte, Machery-Nagel, Düren, Deutschland

Solid Phase Extraktion C-18-E (55 µm, 70A) 1000 mg/6 ml, Strata™, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Solid Phase Extraktion C-18-E (55 µm, 70A) 10 g/60 ml, Strata™, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Spritzenvorsatzfilter, Minisart RC 15, 0,45 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland

## 5.2 Isolierung und Fraktionierung sensorisch aktiver Substanzen aus Spargel und Pfeffer

### 5.2.1 Isolierung und Fraktionierung geschmacksaktiver Substanzen aus Spargel

#### 5.2.1.1 Lösungsmittlextraktion von *Asparagus officinalis* L.

Zur Isolierung der Geschmacksstoffe aus weißem Spargel werden 1 kg rohe beziehungsweise gekochte Spargelstangen in ca. 2 cm große Stücke zerteilt und mit einer Retsch-Labormühle homogenisiert. Anschließend wird das Homogenat mit 1 l Methanol für 20 Minuten im Ultraschallbad behandelt und bei Unterdruck über eine Nutsche mit Filterpapier abfiltriert. Der Rückstand wird drei weitere Male mit je 1 l Methanol/Wasser-Gemisch (70/30, v/v, mit 1%-iger Ameisensäure auf pH 5,9 eingestellt) in gleicher Weise extrahiert. Den so gewonnenen, vereinigten Methanol/Wasserextrakten wird am Rotationsverdampfer bei 40 °C das Lösungsmittel entzogen. Aus dieser Lösung wird anschließend mittels Gefrier-trocknung ein Lyophilisat gewonnen, dessen Ausbeute gravimetrisch bestimmt wird.

#### 5.2.1.2 Lösungsmittlextraktion von Jungpflanzen

Für die Isolierung der Saponine aus den Jungpflanzen werden 500 g Spargeljungpflanzen mit Wasser sandfrei gewaschen und in ca. zwei cm große Stücke zerteilt. Das Pflanzenmaterial wird anschließend mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem Mixer homogenisiert und über Nacht in 2,5 l Methanol eingelegt. Nach 12 Stunden wird die Suspension über eine Nutsche mit Filterpapier abfiltriert und drei weitere Male mit je 1 l, mit 1% Ameisensäure auf pH 5,9 eingestelltem wässrigen Methanol (70/30, v/v) in gleicher Weise extrahiert. Das Lösungsmittel wird jeweils über eine Nutsche abgesaugt, am Rotationsverdampfer im Vakuum bei 40 °C und 120 mbar eingeeengt und abschließend gefriergetrocknet.

#### 5.2.1.3 Polaritätsorientierte Extraktion

Das Lyophilisat aus der Lösungsmittlextraktion (5.2.1.1 beziehungsweise 5.2.1.2) wird mit 1 l Wasser aufgenommen, 10 min im Ultraschallbad gelöst und sukzessiv, nach ansteigender Polarität, mit Pentan (4 × 500 ml), Dichlormethan (4 × 500 ml) und Ethylacetat (4 × 500 ml)

im Scheidetrichter extrahiert (vgl. Abbildung 87). Die häufig auftretenden Emulsionen werden mit wenigen Tropfen Ethanol verringert, sodass sich eine weiße Emulsionsschicht an der Phasengrenze absetzt. Die verbleibende weiße Emulsionsschicht verbleibt stets in der wässrigen Phase. Die so gewonnenen vier Extrakte werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, in Wasser suspendiert, lyophilisiert und ausgewogen.

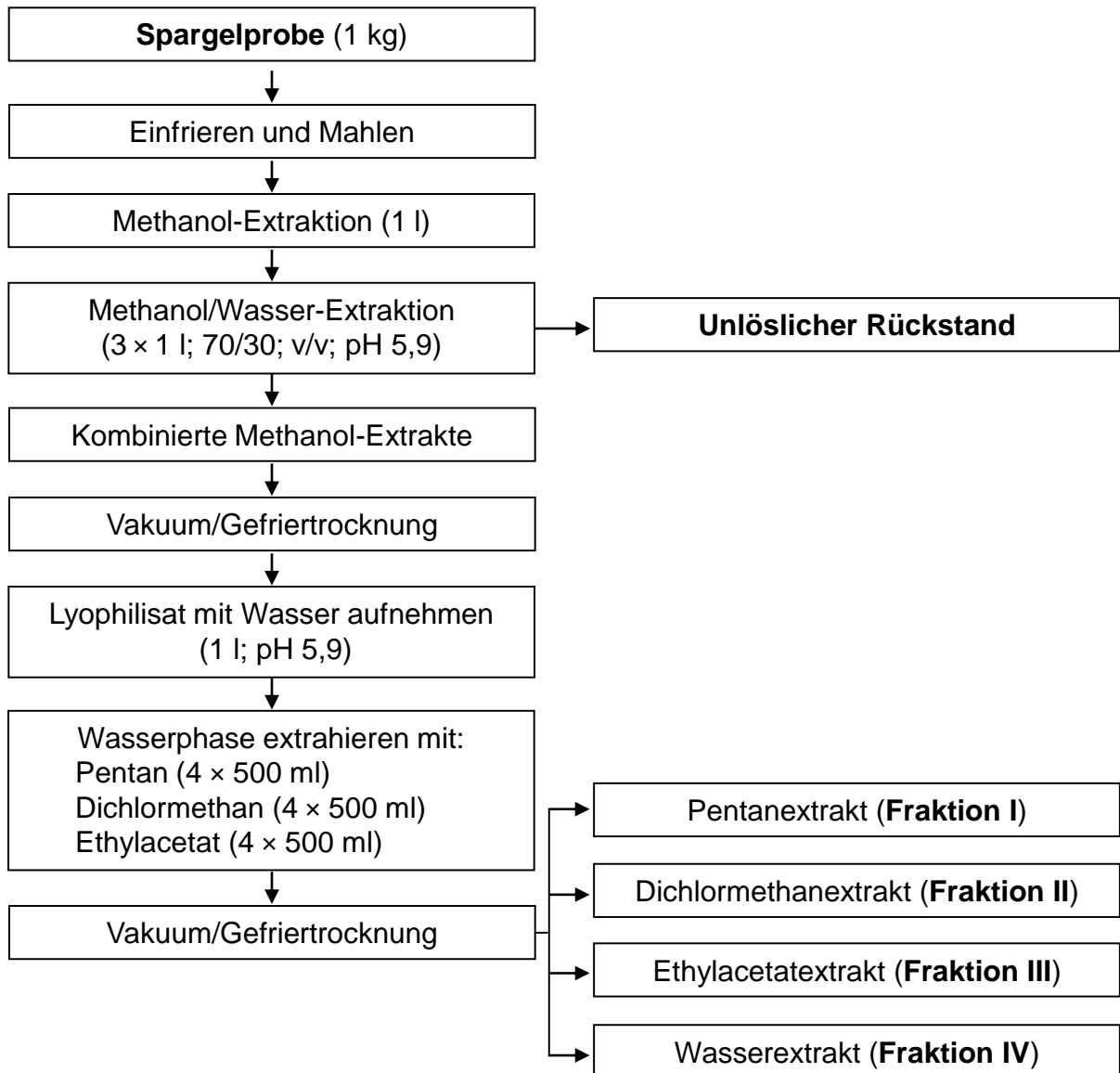


Abbildung 87: Schema zur Lösungsmittelfraktionierung.

#### 5.2.1.4 Fraktionierung des Ethylacetatextraktes (Fraktion III) Solid Phase Extraction (SPE)

Zur polaritätsorientierten Vorfraktionierung der Ethylacetatextrakte aus 5.2.1.3 des rohen frischen Spargels sowie der Spargeljungpflanzen an RP-18-Material, werden 60 ml-Kartuschen (Phenomenex, Aschaffenburg), gefüllt mit 10 g RP-18-Material (Strata C18-E, 55 µm, 70 Å), verwendet. Da bei hohen Wassergehalten Bestandteile aus der Probe präzipitieren und die Kartusche verstopfen, wird die Oberfläche der Kartuschen mit Seesand vergrößert. Dazu wird die Oberfläche der Stationären Phase der Kartusche mit 3 mm Seesand (mit Methanol gewaschen und 24 h bei 220 °C ausgeheizt) überschichtet. Das Füllmaterial wird mit Methanol (100 ml) vorkonditioniert und anschließend in 20% Schritten (Wasser/Methanol, v/v) mit jeweils 60 ml Elutionsgemisch auf die benötigte Anfangsbedingung für die Chromatographie umkonditioniert. Ein Aliquot der jeweiligen Ethylacetatfraktion (800 mg) wird in Milliporewasser (50 ml) suspendiert und auf die Kartusche aufgegeben. Die Elution des Extraktes erfolgt schrittweise mit 100 ml Methanol/Wasser (0/100, v/v, pH 3,5; Spargelstangen: Fraktion III-A; JP: Fraktion JP-III-A), 100 ml Methanol/Wasser (30/70, v/v, pH 3,5; Spargelstangen: Fraktion III-B; JP: Fraktion JP-III-B), 100 ml Methanol/Wasser (70/30, v/v, pH 3,5; Spargelstangen: Fraktion III-C; JP: Fraktion JP-III-C) und zuletzt mit 100 ml Methanol (Spargelstangen: Fraktion III-D; JP: Fraktion JP-III-D). Die Eluate werden getrennt aufgefangen, am Rotationsverdampfer von Lösungsmitteln befreit, gefriergetrocknet und ausgewogen. Die Fraktionen der Spargelstangen (III-A bis III-D) werden sensorisch beurteilt (s. 5.6.1.2). Alle gewonnenen Subfraktionen werden via HPLC-ELSD analysiert (s. 5.2.1.5).

#### 5.2.1.5 HPLC-Überprüfung der Spargelfraktionen

Der Gesamtmethanolextrakt der Spargelstangen, die einzelnen Lösungsmittelfraktionen, die über RP-18-Material fraktionierten Extrakte sowie diverse Reinsubstanzen werden mittels HPLC-System 1 unter den folgenden Bedingungen getrennt. Ein Aliquot des jeweiligen Extraktes wird in einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (20/80, v/v) gelöst, im Ultraschallbad behandelt und membranfiltriert.



---

Stationäre Phase:	HyperClone ODS 120 (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Flussrate:	1 ml/min
Detektion:	ELSD
Gain:	12
Verdampfertemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	30 µl
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril
Gradient:	5% B, innerhalb von 50 min auf 50% B, in weiteren 10 min auf 100% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 10 min auf 5% B, isokratisch (10 min)

## 5.2.2 Isolierung und Fraktionierung sensorisch aktiver Substanzen aus Pfeffer

### 5.2.2.1 Herstellung eines Pfefferextraktes

Bei der Extraktion und auch bei allen weiteren Aufreinigungsschritten wird unter Lichtabschluss gearbeitet, da sonst die Isomerisierung des Piperins zu Isopiperin, Chavicin und Isochavicin erfolgt (Kozukue et al., 2007).

Zur Herstellung eines Pfefferextraktes werden ganze Pfefferkörner in einer Schlagkreuzmühle fein gemahlen (Analysenmühle A10, IKA Labortechnik, Staufen). Nachdem von dem Pulver exakt 200 g in ein 800 ml Becherglas eingewogen sind, wird der gemahlene Pfeffer dreimal mit je 250 ml Ethanol und zweimal mit je 300 ml Ethanol im Ultraschallbad für 10 Minuten extrahiert. Die überstehende Lösung wird jeweils abdekantiert und zur Aufreinigung durch einen Faltenfilter filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrates wird mittels Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 35 °C entfernt, der Extrakt wird mittels Gefrier Trocknung lyophilisiert und zur weiteren Analyse eingesetzt. Der unlösliche Rückstand wird ebenfalls gefriergetrocknet und das Lyophilisat wird für die sensorische Analyse eingesetzt.

### 5.2.2.2 Fraktionierung des Ethanolextraktes mittels RP-18 Material

Die Fraktionierung des Pfefferextraktes aus 5.2.2.1 erfolgt mittels Säulenchromatographie an RP-18 Material (25–40 µm; Merck, Darmstadt). Für die Trennung an RP-18 Material wird eine wassergekühlte Glassäule (20 × 4 cm) verwendet, deren unteres Ende mit silanisierter Glasfaserwatte verschlossen wird. Nach Verdichten der Watte mit einem Glasstab wird diese mit 5 mm Seesand (24 h bei 220 °C ausgeheizt) überschichtet. Das RP-18 Material wird in Methanol aufgeschlämmt und 20 Minuten gerührt, bevor es in die Glassäule eingebracht wird. Vor dem Gebrauch wird die Säule mit Methanol (500 ml) gewaschen und das Eluat wird verworfen. Anschließend wird das Füllmaterial in 20% Schritten (Wasser/Methanol, v/v, pH 3,5) mit jeweils 400 ml Elutionsgemisch auf Methanol/Wasser (60/40, v/v) umkonditioniert. Ein Aliquot (4 g) des Ethanolextraktes aus 5.2.2.1 wird in Methanol/Wasser (100 ml, 60/40, v/v, pH 3,5) gelöst und auf die Säule aufgegeben. Die Elution des Extraktes erfolgt bei einem konstanten Fluss von 1,5 ml/min in 10% Schritten (jeweils 400 ml) von Methanol/Wasser (60/40, v/v) zu 100% Methanol. Analog zum angewendeten Methanol/Wasser-Gradienten werden die gewonnenen Fraktionen wie folgt bezeichnet: Fraktion A (70/30, v/v; Ausbeute: 11,6%), Fraktion A2 (80/20; Ausbeute: 71,6%), Fraktion B (90/10, v/v; Ausbeute: 10,1%) und Fraktion C (100/0, v/v; Ausbeute: 6,7%). Die Eluate werden getrennt aufgefangen, am Rotationsverdampfer von Lösungsmitteln befreit, gefriergetrocknet und ausgewogen.

## 5.3 Isolierung und Identifizierung von sensorisch aktiven Inhaltsstoffen

### 5.3.1 Isolierung und Identifizierung von sensorisch aktiven Inhaltsstoffen in Spargel

#### 5.3.1.1 Isolierung und Identifizierung der geschmacksaktiven Substanzen aus SPE-Fraktion III-B

Aliquote der SPE-Fraktion III-B aus 5.2.1.4 werden in ACN/H<sub>2</sub>O (1/9, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels der folgenden Parameter per HPLC-System 1 subfraktioniert.

---

Stationäre Phase:	Analytisch: Microsorb-MV; 100-5 C18 (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm; Varian, Darmstadt) Präparativ: Microsorb-MV; 100-5 C18 (250 × 21,2 mm i.d., 5 µm; Varian, Darmstadt)
Flussrate:	Analytisch: 1 ml/min Präparativ: 18 ml/min
Split:	Präparativ: 1 ml (in den ELSD) : 19 ml (in den Kolben)
Detektion:	ELSD
Gain:	Analytisch: 12 Präparativ: 10
Verdampfertemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	Analytisch: 30 µl Präparativ: 1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril
Gradient:	0% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 10% B, isokratisch (17 min), in weiteren 13 min auf 100% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 5 min auf 0% B, isokratisch (15 min)

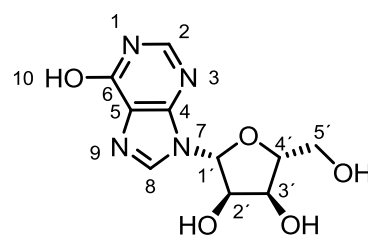
### ***Semipräparative Aufarbeitung der Fraktion III-B***

Stationäre Phase:	HyperClone ODS C18 (250 × 10 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Flussrate:	3 ml/min
Split:	0,8 ml (in den ELSD) : 2,2 ml (in den Kolben)
Gain:	11
Verdampfertemperatur:	40 °C
Detektion:	ELSD
Injektionsvolumen:	500 µl
Mobile Phase:	A: 1% Ameisensäure aq B: 1% Ameisensäure in Acetonitril
Gradient:	0% B, 5 min isokratisch, innerhalb von 5 min auf 10% B, isokratisch (10 min), in weiteren 10 min auf 100% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 5 min auf 0% B, isokratisch (5 min)

Um den Puffer aus den einzelnen Subfraktionen zu entfernen, werden diese im Vakuum auf 10 ml eingengt, mit Wasser (5 ml) gestreckt, auf C-18 Festphasenkartuschen (55  $\mu\text{m}$ , 70A, 1 g/60 ml, Strata™, Phenomenex, Aschaffenburg) aufgebracht, mit 10 ml Wasser gewaschen und mit 6 ml Methanol von der Kartusche eluiert. Die Eluate werden getrennt voneinander aufgefangen, einrotiert und gefriergetrocknet. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden für die GVA eingesetzt und mittels Massenspektrometrie, UV- und Kernresonanzspektroskopie beziehungsweise durch Synthese oder Cochromatographie käuflicher Reinsubstanzen identifiziert.

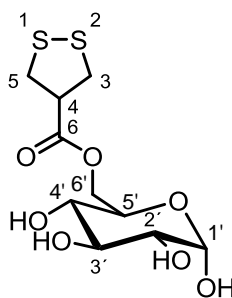
**Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindungen 1 bis 3 aus SPE-Fraktion III-B** (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

*Inosin (1)*: UV/VIS (Acetonitril, pH 7):  $\lambda_{\text{max}} = 234,7 \text{ nm}$ ; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) 269 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 291 (37, [M+Na]<sup>+</sup>), 307 (24, [M+K]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 60 V):  $m/z$  (%) 269 (19), 137 (100); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  291.0699 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> theoretisch:  $m/z$  291.0729.

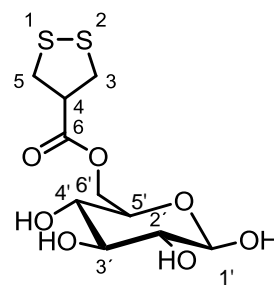


*1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6- $\beta$ -D-glucoopyranosseester (2) und 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6- $\alpha$ -D-glucoopyranoseester*

*(3)*: LC-MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  (%) 357 (100, [M+HCOO]<sup>-</sup>), 311 (21, [M-H]<sup>-</sup>), 347 (15, [M+Cl]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -60 V):  $m/z$  (%) 311 (6), 144 (5), 131 (100), 112 (22), 104 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  311.0273 und  $m/z$  311.0254 ([M-H]<sup>-</sup>), berechnet für [C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup> theoretisch:  $m/z$  311.0259. Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Daten sind der Tabelle 20 zu entnehmen.



**(2)**



**(3)**

### 5.3.1.2 Isolierung und Identifizierung der geschmacksaktiven Substanzen aus SPE-Fraktion III-C

Aliquote der SPE-Fraktion III-C aus 5.2.1.4 werden in ACN/H<sub>2</sub>O (1/9, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels der folgenden Parameter und HPLC-System 1 subfraktioniert. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden für die sensorischen Analysen eingesetzt und mittels Massenspektrometrie, UV- und Kernresonanzspektroskopie identifiziert.

Stationäre Phase:	Analytisch: HyperClone ODS 120 (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg) Semipräparativ: HyperClone ODS 120 (250 × 10,0 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg) Präparativ: HyperClone ODS 120 (250 × 21,2 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Flussrate:	Analytisch: 1 ml/min (analytisch) Präparativ: 20 ml/min Semipräparativ: 3,5 ml/min
Split:	Präparativ: 1 ml (in den ELSD), 19 ml (in den Kolben) Semipräparativ: 0,8 ml (in den ELSD), 2,7 ml (in den Kolben)
Detektion:	ELSD
Gain:	Analytisch: 12 Semipräparativ: 12 Präparativ: 10
Verdampfertemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	Analytisch: 30 µl Präparativ: 1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril
Gradient:	5% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 30% B, isokratisch (15 min), in weiteren 5 min auf 35% B, innerhalb von 5 min auf 40% B, isokratisch (5 min), in 5 min auf 100% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 5% B, isokratisch (5 min)

**Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindungen 5a/b bis 13a/b aus SPE-Fraktion III-C** (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 91):

*3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R/S)-22-hydroxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol (5a/b):* LC-MS (ESI<sup>-</sup>): *m/z* 1047 (100, [M-H]<sup>-</sup>), 1083 (26, [M+Cl]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -175 V): *m/z* (%) 1047 (26), 902 (33), 755 (26), 575 (20), 413 (14), 402 (20), 260 (20), 204 (20), 163 (20), 143 (26), 130 (26), 119 (52), 113 (54), 101 (85), 88 (75), 85 (42), 71 (66), 59 (100); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 1071.5360 ([M+Na]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>51</sub>H<sub>84</sub>O<sub>22</sub>+Na]<sup>+</sup>, theoretisch: *m/z* 1071.5352. Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Daten sind der Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24 zu entnehmen.

*Diosgenin (6):* LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 415 [100, M+H]<sup>+</sup>, 437 [7, M+Na]<sup>+</sup>, MS/MS (DP = -130 V): *m/z* (%) 413 (100), 243 (2), 57 (4); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 415.3204 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch: *m/z* 415.3207. Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Daten sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

*(25R/S)-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (10a/b):* LC-MS (ESI<sup>-</sup>): *m/z* 901 (100, [M-H]<sup>-</sup>), 1047 (68, [M+Cl]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -185 V): *m/z* (%) 901 (100), 755 (6), 205 (1), 161 (1), 143 (1), 131 (1), 119 (2), 115 (1), 112 (3), 103 (2), 101 (8), 89 (8), 87 (2), 85 (5), 73 (4), 71 (6), 59 (18); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 901.4805 ([M-H]<sup>-</sup>), berechnet für [C<sub>45</sub>H<sub>74</sub>O<sub>18</sub>-H]<sup>-</sup>, theoretisch: *m/z* 901.4797; Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Daten sind der Tabelle 25, Tabelle 26 und Tabelle 27 zu entnehmen.

*Sarsapogenin (9):* LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 417 [100, M+H]<sup>+</sup>, 439 [8, M+Na]<sup>+</sup>, MS/MS (DP = -135 V): *m/z* (%) 415 (30), 413 (100), 395 (2), 68 (6); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 417.3361 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch: *m/z* 417.3363. Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Daten sind der Tabelle 21 zu entnehmen.

*(25R/S)-Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (13a/b):* LC-MS (ESI<sup>-</sup>): *m/z* 903 (100, [M-H]<sup>-</sup>), 939 (21, [M+Cl]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -195 V): *m/z* (%) 903 (100), 757 (10), 739 (2), 595 (3), 433 (3), 119 (1), 113

(3), 103 (1), 101 (8), 89 (1), 87 (1), 85 (5), 83 (2), 73 (3), 71 (5), 59 (16), 55 (1); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  903.4929 ( $[M-H]^-$ ), berechnet für  $[C_{45}H_{76}O_{18}-H]^-$ , theoretisch:  $m/z$  903.4953. Die  $^1H$  und  $^{13}C$  NMR Daten sind der Tabelle 25, Tabelle 26 und Tabelle 27 zu entnehmen.

### 5.3.1.3 Isolierung und Identifizierung der geschmacksaktiven Substanzen aus SPE-Fraktion III-D

Aliquote der SPE-Fraktion III-D aus 5.2.1.4 werden in ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels der folgenden Parameter und HPLC-System 1 subfraktioniert. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden für die sensorischen Analysen eingesetzt und mittels Massenspektrometrie, UV- und Kernresonanzspektroskopie identifiziert.

Stationäre Phase:	Analytisch: HyperClone ODS 120 (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg) Präparativ: HyperClone ODS 120 (250 × 21,2 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Flussrate:	Analytisch: 1 ml/min Präparativ: 20 ml/min
Split:	Präparativ: 1 ml (in den ELSD): 19 ml (in den Kolben)
Detektion:	ELSD
Gain:	Analytisch: 12 Präparativ: 10
Verdampfertemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	Analytisch: 30 µl Präparativ: 1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril
Gradient:	20% B, innerhalb von 5 min auf 50% B, isokratisch (5 min), in weiteren 10 min auf 65% B, anschließend innerhalb von 5 min auf 100% B, isokratisch (5 min), abschließend in 5 min auf 20% B, isokratisch (10 min)

### Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindungen 14a/b aus SPE-Fraktion III-D (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die Struktur in Abbildung 91):

3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnosyryanosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnosyryanosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R/S)-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol (**14a/b**): LC-MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  867 [100, M-H]<sup>-</sup>, 903 [49, M+Cl]<sup>-</sup>, 913 (22, [M+HCOO]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -200 V):  $m/z$  (%) 867 (100), 721 (29), 575 (3), 509 (3), 289 (3), 265 (2), 246 (14), 205 (25), 179 (3), 163 (20), 161 (7); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  867.4711 ([M-H]<sup>-</sup>), berechnet für [C<sub>45</sub>H<sub>72</sub>O<sub>16</sub>-H]<sup>-</sup>, theoretisch:  $m/z$  867.4742. Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR-Daten sind der Tabelle 28, Tabelle 29 und Tabelle 30 zu entnehmen.

#### 5.3.1.4 Isolierung und Identifizierung der geschmacksaktiven Substanzen aus der Ethylacetatfraktion der Jungpflanzen

Aliquote der SPE-Fraktion III-D aus 5.2.1.4 werden in ACN/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels den folgenden Parametern und HPLC-System 1 analytisch und unter HPLC System 4 präparativ analysiert und subfraktioniert. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden für die sensorischen Analysen eingesetzt und mittels Massenspektrometrie, UV- und Kernresonanzspektroskopie identifiziert.

Stationäre Phase:	Analytisch: HyperClone ODS 120 (250 × 4,6 mm i.d., 5 $\mu$ m; Phenomenex, Aschaffenburg) Präparativ: HyperClone ODS 120 (250 × 21,2 mm i.d., 5 $\mu$ m; Phenomenex, Aschaffenburg)
Flussrate:	Analytisch: 1 ml/min Präparativ: 20 ml/min
Split:	Präparativ: 1 ml (in den ELSD), 19 ml (in den Kolben)
Gain:	Analytisch: 12 Präparativ: 10
Verdampfertemperatur:	40 °C
Detektion:	ELSD
Injektionsvolumen:	Analytisch: 30 $\mu$ l Präparativ: 1 ml
Mobile Phase:	A: 1% Ameisensäure in Acetonitril B: 1% Ameisensäure aq



Gradient: 5% B, innerhalb von 50 min auf 50% B, in weiteren 10 min auf 100% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 10 min auf 5% B, isokratisch (10 min)

**Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindung 15 aus der Ethylacetatfraktion der Jungpflanzen** (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die Struktur in Abbildung 91):

*3-O-[[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25S)-5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -ol (AS-1) (15)*: LC-MS (ESI<sup>-</sup>): *m/z* (%) 871 (100, [M-H]<sup>-</sup>), 917 (34, [M+HCOO]<sup>-</sup>), 907 (27, [M+Cl]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -195 V): *m/z* (%) 871 (100), 739 (26), 709 (6), 577 (10), 541 (2), 457 (2), 305 (5), 221 (4), 184 (2), 179 (4), 161 (33), 158 (15), 155 (2); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 871.4733 ([M-H]<sup>-</sup>), berechnet für [C<sub>44</sub>H<sub>72</sub>O<sub>17</sub>-H]<sup>-</sup>, theoretisch: *m/z* 871.4691. Die <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Daten sind der Tabelle 28, Tabelle 29 und Tabelle 30 zu entnehmen.

### 5.3.2 Isolierung und Identifizierung von sensorisch aktiven Inhaltsstoffen in Pfeffer

#### 5.3.2.1 Geschmacksverdünnungsanalyse des Pfefferextraktes

Ein Aliquot des Ethanolextraktes (5.2.2.1) wird in einer Mischung aus Methanol/Wasser (70/30, v/v, pH 3,5) gelöst, im Ultraschallbad behandelt und membranfiltriert. Jeweils 2 ml der Lösung werden mittels des HPLC-Systems 3 in 41 Fraktionen aufgetrennt, die in eisgekühlten Braunglaskolben aufgefangen werden. Durch Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Gefriertrocknung werden die Fraktionen als Feststoffe oder Öle erhalten, die sensorisch analysiert werden (5.6.2.4).

Stationäre Phase: Microsorb-MV; 100-5 C18 (250 × 21,2 mm i.d., 5 µm; Varian, Darmstadt)

Flussrate: 18 ml/min

Detektion: UV

Wellenlänge: 260 nm

Injektionsvolumen: 1 ml

Mobile Phase: A: 0,1% Ameisensäure (pH 3,5)  
B: Methanol

Gradient: 70% B, 5 min isokratisch, innerhalb von 17 min auf 80% B, isokratisch (28 min), in weiteren 10 min auf 100% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 70% B, isokratisch (10 min)

Sämtliche folgenden Fraktionen und Reinsubstanzen des schwarzen Pfefferextraktes werden mit Hilfe des HPLC-Systems 2 unter den folgenden Bedingungen, zur Zuordnung der Peaks zur GVA, überprüft. Dazu wird jeweils 1 mg der Fraktion in 1 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (9/1, v/v) gelöst und membranfiltriert.

Stationäre Phase: Microsorb-MV; 100-5 C18 (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm; Varian, Darmstadt)

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektion: DAD

Wellenlänge: 260 nm

Injektionsvolumen: 25 µl

Mobile Phase: A: 0,1% Ameisensäure aq (pH 3,5)  
B: Methanol

Gradient: 70% B, 5 min isokratisch, innerhalb von 17 min auf 80% B, isokratisch (28 min), in weiteren 10 min auf 100% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 70% B, isokratisch (10 min)

### 5.3.2.2 Identifizierung der Piperinderivate aus Fraktion A

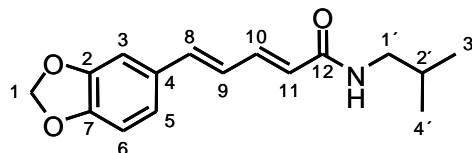
Aliquote der Fraktion A aus 5.2.2.2 werden in MeOH/H<sub>2</sub>O (7/3, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels den folgenden Parametern per HPLC-System 2 subfraktioniert. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden mittels Massenspektrometrie, UV- und Kernreso-

nanzspektroskopie beziehungsweise durch Synthese oder Cochromatographie käuflicher Reinsubstanzen identifiziert.

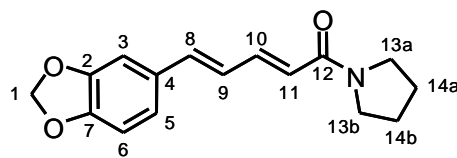
Stationäre Phase:	Microsorb-MV; 100-5 C18 (250 × 21,2 mm, 5 µm; Varian, Darmstadt)
Flussrate:	20 ml/min
Detektion:	UV
Wellenlänge:	260 nm
Injektionsvolumen:	1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq (pH 3,5) B: Methanol
Gradient:	50% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 10 min auf 70% B, in weiteren 10 min auf 80% B, in weiteren 5 min auf 100% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 50% B, isokratisch (5 min)

**Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindungen 21 bis 23** (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

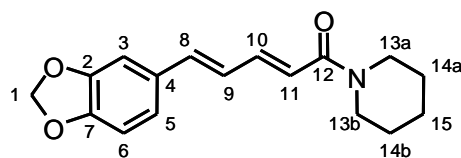
*Piperlonguminin (22)*: UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max}$  = 318 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  274 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 296 (76, [M+Na]<sup>+</sup>), 569 (63, [2M+Na]<sup>+</sup>), 547 (43, [2M+H]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 46 V):  $m/z$  (%) 274 (95), 201 (58), 171 (14), 143 (19), 135 (41), 115 (100); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  274.1450 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  274.1443; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.85 [d, 6H,  $J=7.0$  Hz, H-C(3', 4')], 1.61–1.76 [m, 1H, H-C(2')], 2.96 [t, 2H,  $J=6.4$  Hz, H-C(1')], 6.04 [s, 2H, H-C(1)], 6.11 [d, 1H,  $J=15.0$  Hz, H-C(11)], 6.82–6.94 [m, 3H,  $J=8.0$  Hz,  $J=14.8$  Hz, H-C(6, 8, 9)], 6.98 [dd, 1H,  $J=1.2$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(5)], 7.13 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.0$  Hz, H-C(10)], 7.25 [d, 1H,  $J=1.7$  Hz, H-C(3)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  20.6 [C(3')], 20.6 [C(4')], 28.6 [C(2')], 46.6 [C(1')], 101.7 [C(1)], 106.0 [C(3)], 108.9 [C(6)], 123.1 [C(5)], 125.1 [C(11)], 125.7 [C(9)], 131.9 [C(4)], 138.1 [C(8)], 139.6 [C(10)], 148.1 [C(7)], 148.4 [C(2)], 165.6 [C(12)].



**Piperylin (23):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 348 \text{ nm}$ ; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  272 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 543 (71, [2M+H]<sup>+</sup>), 565 (60, [2M+Na]<sup>+</sup>), 294 (46, [M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 56 V):  $m/z$  (%) 272 (75), 201 (62), 173 (8), 171 (12), 159 (7), 143 (24), 135 (31), 114 (100); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  272.1294 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  274.1287; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.71–1.76 [m, 2H, H-C(14b)], 1.82–1.88 [m, 2H, H-C(14a)], 3.39 [t, 2H,  $J=7.1 \text{ Hz}$ , H-C(13b)], 3.48 [t, 2H,  $J=7.1 \text{ Hz}$ , H-C(13a)], 6.08 [s, 2H, H-C(1)], 6.42 [d, 1H,  $J=14.7 \text{ Hz}$ , H-C(11)], 6.86–6.98 [m, 3H, H-C(6, 8, 9)], 6.96 [dd, 1H,  $J=1.5 \text{ Hz}$ ,  $J=8.0 \text{ Hz}$ , H-C(5)], 7.20 [d, 1H,  $J=1.5 \text{ Hz}$ , H-C(3)], 7.21 [dd, 1H,  $J=10.5 \text{ Hz}$ ,  $J=14.7 \text{ Hz}$ , H-C(10)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.9 [C(14b)], 25.9 [C(14a)], 46.2 [C(13b)], 46.5 [C(13a)], 102.0 [C(1)], 106.3 [C(3)], 107.9 [C(6)], 123.2 [C(11)], 123.3 [C(5)], 125.9 [C(9)], 132.4 [C(4)], 138.5 [C(8)], 141.2 [C(10)], 148.3 [C(7)], 148.5 [C(2)], 165.1 [C(12)].



**Piperin (21):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 348 \text{ nm}$ ; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  286 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 571 (77, [2M+H]<sup>+</sup>), 593 (37, [2M+Na]<sup>+</sup>), 308 (34, [M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 46 V):  $m/z$  (%) 286 (100), 201 (54), 173 (6), 171 (13), 159 (6), 143 (22), 135 (34), 115 (96); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  286.1467 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  286.1443; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.42–1.48 [m, 4H, H-C(14a, b)], 1.54–1.61 [m, 2H, H-C(15)], 3.50 [t, 4H,  $J=5.6 \text{ Hz}$ , H-C(13a, b)], 6.03 [s, 2H, H-C(1)], 6.66 [d, 1H,  $J=14.8 \text{ Hz}$ , H-C(11)], 6.87–6.98 [m, 3H,  $J=8.5 \text{ Hz}$ ,  $J=14.6 \text{ Hz}$ , H-C(6, 8, 9)], 6.95 [dd, 1H,  $J=1.5 \text{ Hz}$ ,  $J=8.0 \text{ Hz}$ , H-C(5)], 7.15 [d, 1H,  $J=1.5 \text{ Hz}$ , H-C(3)], 7.21 [dd, 1H,  $J=10.9 \text{ Hz}$ ,  $J=14.6 \text{ Hz}$ , H-C(10)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.7 [C(15)], 25.6 [C(14a)], 25.6 [C(14b)], 44.8 [C(13b)], 47.2 [C(13a)], 101.9 [C(1)], 105.7 [C(3)], 108.7 [C(6)], 121.4 [C(11)], 122.7 [C(5)], 126.0 [C(9)], 131.0 [C(4)], 137.7 [C(8)], 142.4 [C(10)], 148.3 [C(7)], 148.4 [C(2)], 165.4 [C(12)].



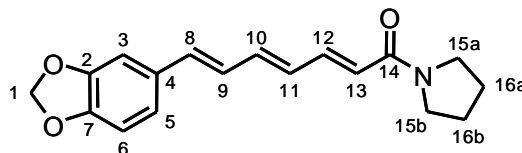
## 5.3.2.3 Identifizierung der Piperinderivate aus Fraktion B

Aliquote der Fraktion B aus 5.2.2.2 werden in MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels der folgenden Parameter und HPLC-System 5 subfraktioniert. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden mittels UV-, Massen- und Kernresonanzspektroskopie beziehungsweise durch Synthese oder Cochromatographie käuflicher Reinsubstanzen identifiziert.

Stationäre Phase:	Microsorb 100-5 C18 (250 × 21,2 mm i.d., 5 µm; Varian, Darmstadt)
Flussrate:	20 ml/min
Detektion:	UV
Wellenlänge:	260 nm
Injektionsvolumen:	1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq (pH 3,5) B: Methanol
Gradient:	60% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 5 min auf 70% B, isokratisch (15 min), in 10 min auf 80% B, in weiteren 5 min auf 100% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 60% B, isokratisch (5 min)

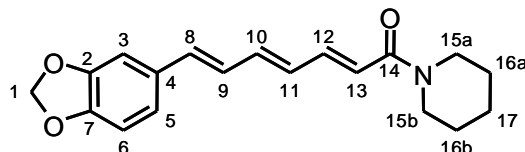
**Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindungen 24 bis 30** (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

*Piperolein (24)*: UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 354 \text{ nm}$ ; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  298 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 320 (82, [M+Na]<sup>+</sup>), 595 (31, [2M+H]<sup>+</sup>), 617 (41, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 166 V):  $m/z$  (%) 298 (100), 227 (9), 213 (74), 185 (26), 183 (44), 169 (10), 155 (34), 141 (16), 127 (51), 115 (24), 112 (13); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  298.1449 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  298.1443; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.75–1.82 [m, 2H, H-C(16b)], 1.84–1.93 [m, 2H, H-C(16 a)], 3.36 [t, 2H,  $J=7.5 \text{ Hz}$ , H-C(15 b)], 3.52 [t, 2H,  $J=7.5 \text{ Hz}$ , H-C(15 a)], 6.04 [s, 2H, H-C(1)], 6.38 [d, 1H,  $J=14.6 \text{ Hz}$ , H-C(13)], 6.52 [dd, 1H,  $J=12.1 \text{ Hz}$ ,  $J=14.6 \text{ Hz}$ , H-C(11)], 6.70 [dd, 1H,  $J=15.9 \text{ Hz}$ , H-C(8)], 6.76 [dd, 1H,  $J=9.3 \text{ Hz}$ ,  $J=14.6 \text{ Hz}$ , H-C(10)], 6.88–6.93 [m, 2H, H-C(6, 9)], 6.97 [dd, 1H,  $J=1.5 \text{ Hz}$ ,

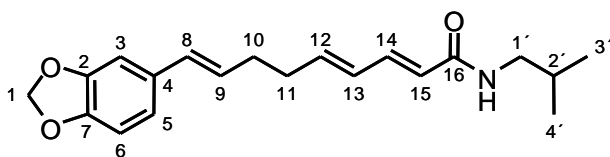


$J=8.5$  Hz, H-C(5)], 7.17 [dd, 1H,  $J=11.3$  Hz,  $J=14.6$  Hz, H-C(12)], 7.21 [d, 1H,  $J=1.5$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.1 [C(16b)], 26.1 [C(16a)], 45.8 [C(15b)], 46.5 [C(15a)], 101.5 [C(1)], 105.9 [C(3)], 108.7 [C(6)], 122.3 [C(13)], 122.6 [C(5)], 127.9 [C(9)], 131.1 [C(11)], 131.6 [C(4)], 135.4 [C(8)], 139.7 [C(10)], 140.4 [C(12)], 147.6 [C(7)], 148.3 [C(2)], 164.6 [C(14)].

**Piperettin (25):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}} = 366$  nm; LC-MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  312 (100, [M+H] $^+$ ), 623 (55, [2M+H] $^+$ ), 334 (28, [M+Na] $^+$ ), 645 (24, [2M+Na] $^+$ ); MS/MS (DP = 96 V):  $m/z$  (%) 312 (80), 227 (71), 197 (16), 169 (45), 161 (8), 141 (62), 131 (9), 115 (100), 112 (24), 103 (17); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  312.1615 ([M+H] $^+$ ), berechnet für [C $_{19}$ H $_{21}$ NO $_3$ +H] $^+$ , theoretisch:  $m/z$  312.1600;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.42–1.55 [m, 4H, H-C(16a, b)], 1.56–1.63 [m, 2H, H-C(17)], 3.47–3.55 [m, 4H, H-C(15a, b)], 6.04 [s, 2H, H-C(1)], 6.41 [d, 1H,  $J=14.5$  Hz, H-C(13)], 6.52 [dd, 1H,  $J=12.1$  Hz,  $J=14.6$  Hz, H-C(11)], 6.70 [dd, 1H,  $J=15.9$  Hz, H-C(8)], 6.76 [dd, 1H,  $J=9.3$  Hz,  $J=14.6$  Hz, H-C(10)], 6.88–6.93 [m, 2H, H-C(6, 9)], 6.96 [dd, 1H,  $J=1.7$  Hz,  $J=8.4$  Hz, H-C(5)], 7.17 [dd, 1H,  $J=11.3$  Hz,  $J=14.6$  Hz, H-C(12)], 7.22 [d, 1H,  $J=1.7$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.5 [C(17)], 25.2 [C(16a, b)], 45.3 [C(15b)], 46.4 [C(15a)], 101.2 [C(1)], 106.2 [C(3)], 108.9 [C(6)], 121.9 [C(13)], 122.8 [C(5)], 127.4 [C(9)], 130.8 [C(11)], 131.1 [C(4)], 135.6 [C(8)], 139.7 [C(10)], 141.2 [C(12)], 147.9 [C(7)], 148.6 [C(2)], 164.2 [C(14)].



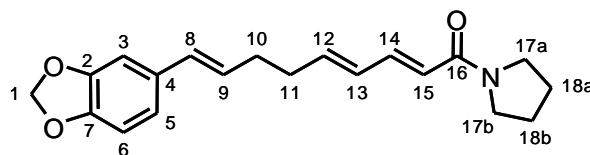
**Retrofractamid A (26):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}} = 264$  nm; LC-MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  328 (100, [M+H] $^+$ ), 655 (96, [2M+H] $^+$ ), 350 (84, [M+Na] $^+$ ), 677 (79, [2M+Na] $^+$ ); MS/MS (DP = 56 V):  $m/z$  (%) 328 (65), 255 (7), 167 (6), 161 (25), 131 (66), 103 (100); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  328.1914 ([M+H] $^+$ ), berechnet für [C $_{20}$ H $_{25}$ NO $_3$ +H] $^+$ , theoretisch:  $m/z$  328.1913;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.83 [d, 6H,  $J=7.2$  Hz, H-C(3', 4')], 1.66–1.70 [m, 1H, H-C(2')], 2.27 [m, 4H, H-C(10, 11)], 2.93 [t, 2H,  $J= 6.0$  Hz, H-C(1')], 5.92 [d, 1H,  $J=15.6$  Hz, H-C(15)], 5.98 [s, 2H, H-C(1)], 6.08–6.18 [m, 2H,  $J=15.4$  Hz,  $J=15.8$  Hz, H-C(9, 12)], 6.20 [dd, 1H,  $J=10.4$  Hz,  $J=15.4$  Hz, H-C(13)], 6.31 [d, 1H,  $J=15.6$  Hz, H-C(8)], 6.78 [dd, 1H,  $J=8.2$  Hz, H-C(6)], 6.82 [dd, 1H,  $J=1.2$  Hz,  $J=8.2$  Hz, H-C(5)], 6.98 [dd, 1H,  $J=10.4$  Hz,  $J=14.9$  Hz, H-



C(14)], 7.05 [d, 1H,  $J=1.2$  Hz, H-C(3)], 7.92 [t,  $J=5.7$  Hz, N-H];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  20.6 [(3', 4')], 28.6 [C(2')], 32.2 [C(11)], 32.6 [C(10)], 46.5 [C(1')], 101.3 [C(1)], 105.6 [C(3)], 108.8 [C(6)], 120.7 [C(5)], 124.1 [C(15)], 128.3 [C(9)], 129.4 [C(13)], 130.1 [C(8)], 132.2 [C(4)], 140.8 [C(12)], 141.1 [C(14)], 146.8 [C(7)], 148.1 [C(2)], 165.6 [C(16)].

1-[1-oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidin (**27**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}}$  = 264 nm; LC-

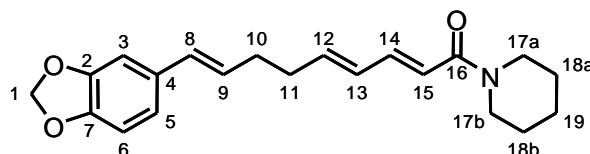
MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  326 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 348 (85, [M+Na]<sup>+</sup>), 673 (24, [2M+Na]<sup>+</sup>), 651 (15, [2M+H]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 56 V):  $m/z$  (%) 326 (80), 255 (7), 227 (15), 165 (100), 161 (34),



150 (26), 131 (73), 103 (95); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  326.1763 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  326.1756;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.73–1.91 [m, 4H, H-C(18a, b)], 2.28 [m, 4H, H-C(10, 11)], 3.22 [t, 2H,  $J=6.8$  Hz, H-C(17 b)], 3.47 [t, 2H,  $J=6.8$  Hz, H-C(17a)], 5.98 [s, 2H, H-C(1)], 6.09–6.16 [m,  $J=15.2$  Hz, H-C(9,12)], 6.25–6.35 [m, 3H,  $J=14.8$ ,  $J=15.8$  Hz, H-C(8, 13, 15)], 6.79 [dd, 1H,  $J=1.7$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(6)], 6.82 [dd, 1H,  $J=1.7$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(5)], 7.03 [d, 1H,  $J=1.7$  Hz, H-C(3)], 7.04 [dd, 1H,  $J=10.8$  Hz,  $J=14.8$  Hz, H-C(14)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.3 [(18b)], 26.1 [C(18a)], 32.2 [C(11)], 32.7 [C(10)], 45.9 [C(17b)], 46.5 [C(17a)], 101.3 [C(1)], 105.7 [C(3)], 108.7 [C(6)], 120.8 [C(5)], 121.8 [C(15)], 128.3 [C(9)], 129.7 [C(13)], 130.2 [C(8)], 132.2 [C(4)], 141.1 [C(12)], 141.7 [C(14)], 146.8 [C(7)], 148.1 [C(2)], 164.2 [C(16)].

Dehydropiperonalin (**28**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}}$  = 264 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  340 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 362 (69,

[M+Na]<sup>+</sup>), 679 (46, [2M+H]<sup>+</sup>), 701 (23, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 76 V):  $m/z$  (%) 340 (100), 255 (4), 227 (6), 179 (44), 164 (13), 161 (21), 138 (12), 131 (51), 112 (48), 103

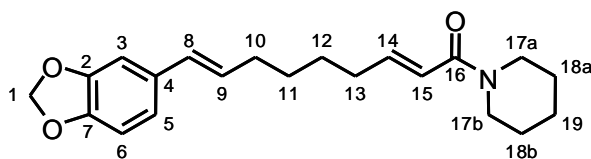


(57); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  340.1922 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  340.1913;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.35–1.68 [m, 2H, H-C(19)], 1.55–1.61 [m, 4H, H-C(18a, b)], 2.02–3.24 [m, 4H, H-C(10, 11)], 3.45–3.50 [m, 4H, H-C(17a, b)], 5.98 [s, 2H, H-C(1)], 6.06–6.21 [m, 2H,  $J=14.8$  Hz,  $J=15.4$  Hz, H-C(9, 12)], 6.30 [dd, 1H,  $J=11.6$  Hz,  $J=14.8$  Hz, H-C(13)], 6.33 [d, 1H,  $J=15.4$  Hz, H-C(8)], 6.54 [d, 1H,

$J=15.4$  Hz, H-C(15)], 6.79 [dd, 1H,  $J=1.7$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(6)], 6.83 [dd, 1H,  $J=1.7$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(5)], 7.03 [d, 1H,  $J=1.7$  Hz, H-C(3)], 7.04 [dd, 1H,  $J=10.0$  Hz,  $J=14.8$  Hz, H-C(14)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.6 [C(19)], 25.1 [C(18b)], 27.1 [C(18a)], 32.2 [C(11)], 32.7 [C(10)], 42.8 [C(17b)], 46.4 [C(17a)], 101.3 [C(1)], 105.6 [C(3)], 108.6 [C(6)], 120.2 [C(5)], 120.8 [C(15)], 128.3 [C(9)], 129.8 [C(13)], 130.1 [C(8)], 132.2 [C(4)], 141.1 [C(12)], 142.1 [C(14)], 146.8 [C(7)], 148.1 [C(2)], 164.7 [C(16)].

**Piperonalin (29):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}} = 208$  nm, 268 nm; LC-MS

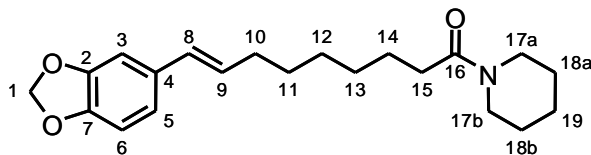
(ESI $^+$ ):  $m/z$  342 (100, [M+1] $^+$ ), 364 (78, [M+Na] $^+$ ), 683 (52, [2M+1] $^+$ ), 705 (44, [2M+Na] $^+$ ); MS/MS (DP = 66 V):  $m/z$  (%) 342 (85), 229 (35), 199 (12), 161 (17), 138 (22),



135 (100), 131 (16), 115 (9), 112 (15), 103 (25); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  342.2078 ([M+H] $^+$ ), berechnet für [C $_{21}$ H $_{27}$ NO $_3$ +H] $^+$ , theoretisch:  $m/z$  342.2069;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.35–1.49 [m, 4H, H-C(18a, b)], 1.49–1.68 [m, 6H, H-C(11, 12, 19)], 2.02–3.24 [m, 4H, H-C(10, 13)], 3.48 [br. t, 4H,  $J=5.6$  Hz, H-C(17a, b)], 5.98 [s, 2H, H-C(1)], 6.06–6.21 [m, 1H,  $J=15.9$  Hz, H-C(9)], 6.30 [d, 1H,  $J=15.8$  Hz, H-C(8)], 6.60 [d, 1H,  $J=14.8$  Hz, H-C(15)], 6.76 [dd, 1H,  $J=1.6$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(6)], 6.80 [dd, 1H,  $J=1.6$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(5)], 7.01–7.08 [m, 1H, H-C(14)], 7.03 [d, 1H,  $J=1.6$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.6 [C(19)], 25.8 [C(18b)], 26.9 [C(18a)], 28.3 [C(12)], 29.2 [C(11)], 29.9 [C(13)], 32.7 [C(10)], 42.8 [C(17b)], 46.4 [C(17a)], 101.3 [C(1)], 105.6 [C(3)], 108.6 [C(6)], 120.2 [C(15)], 120.8 [C(5)], 129.8 [C(9)], 130.1 [C(8)], 132.2 [C(4)], 145.1 [C(14)], 146.8 [C(7)], 148.1 [C(2)], 164.7 [C(16)].

**Piperolein B (30):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}} = 260$  nm, 304 nm; LC-MS

(ESI $^+$ ):  $m/z$  687 (100, [2M+H] $^+$ ), 344 (86, [M+H] $^+$ ), 366 (76, [M+Na] $^+$ ), 709 (55, [2M+Na] $^+$ ), 382 (41, [M+K] $^+$ ); MS/MS (DP = 91 V):  $m/z$  (%) 344 (62), 222 (7), 135 (100),



112 (10), 103 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  344.2236 ([M+H] $^+$ ), berechnet für [C $_{21}$ H $_{29}$ NO $_3$ +H] $^+$ , theoretisch:  $m/z$  344.2226;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.21–1.60 [m, 14H, H-C(11, 12, 13, 14, 18a, 18b, 19)], 2.10–2.15 [q, 2H, H-C(10)], 2.62 [t, 2H,  $J=7.5$  Hz, H-C(15)], 3.34–3.40 [m, 4H, H-C(17a, b)], 5.98 [s, 2H, H-C(1)], 6.08–6.18 [m, 1H, H-C(9)], 6.29 [d, 1H,  $J=15.2$  Hz, H-C(8)], 6.79 [dd, 1H,  $J=1.6$  Hz,  $J=7.8$  Hz, H-C(5)], 6.80-



6.83 [m, 1H, H-C(6)], 7.03 [d, 1H,  $J=1.6$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.6 [C(19)], 25.3 [C(14)], 28.9 [C(12)], 29.3 [C(18b)], 29.9 [C(18a)], 29.1 [C(13)], 30.3 [C(11)], 32.7 [C(10, 15)], 42.9 [C(17b)], 46.4 [C(17a)], 101.3 [C(1)], 105.6 [C(3)], 108.6 [C(6)], 120.8 [C(5)], 129.8 [C(9)], 130.2 [C(8)], 132.2 [C(4)], 146.1 [C(7)], 148.1 [C(2)], 170.5 [C(16)].

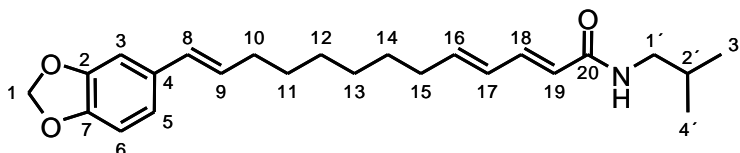
#### 5.3.2.4 Identifizierung der Piperinderivate aus Fraktion C

Aliquote der Fraktion C aus 5.2.2.2 werden in  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (8/2, v/v, 2 ml/50 mg) gelöst, membranfiltriert und mittels der folgenden Parameter per HPLC-System 2 subfraktioniert. Die so erhaltenen Reinsubstanzen werden mittels UV-, Massen- und Kernresonanzspektroskopie beziehungsweise durch Synthese oder Cochromatographie käuflicher Reinsubstanzen identifiziert.

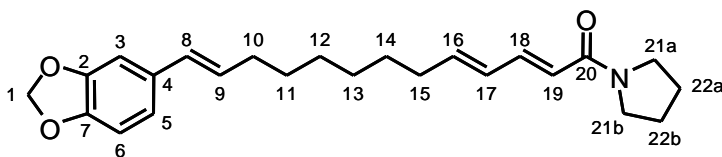
Stationäre Phase:	Microsorb 100-5 C18 (250 × 21,2 mm i.d., 5 $\mu\text{m}$ ; Varian, Darmstadt)
Flussrate:	18 ml/min
Detektion:	UV
Wellenlänge:	260 nm
Injektionsvolumen:	1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq (pH 3,5) B: Methanol
Gradient:	70% B, innerhalb von 30 min auf 100% B, isokratisch (10 min), in weiteren 2 min auf 70% B, isokratisch (8 min)

**Spektroskopische Daten der identifizierten Verbindungen 31 bis 39a/b** (die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die nebenstehenden Strukturen):

**Guineensin (31):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  384 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 406 (86, [M+Na]<sup>+</sup>), 767 (31, [2M+H]<sup>+</sup>), 789 (24, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 126 V):  $m/z$  (%) 384 (100), 311 (5), 283 (5), 187 (4), 175 (2), 161 (3), 135 (26), 103,2 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  384.2536 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  384.2539; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.86 [d, 6H,  $J=7.0 \text{ Hz}$ , H-C(3', 4')], 1.29–1.36 [m, 4H, H-C(12, 13)], 1.37–1.46 [m, 4H, H-C(11, 14)], 1.70–1.72 [m, 1H, H-C(2')], 2.10–2.18 [m, 4H, H-C(10, 15)], 2.96 [t, 2H,  $J=6.4 \text{ Hz}$ , H-C(1')], 5.96 [d, 1H,  $J=15.2 \text{ Hz}$ , H-C(19)], 6.00 [s, 2H, H-C(1)], 6.02–6.12 [m, 2H,  $J=15.9$ , H-C(9, 16)], 6.14–6.22 [m, 1H,  $J=10.8 \text{ Hz}$ ,  $J=15.4 \text{ Hz}$ , H-C(17)], 6.31 [d, 1H,  $J=16.1 \text{ Hz}$ , H-C(8)], 6.80 [dd, 1H,  $J=1.2 \text{ Hz}$ ,  $J=8.2 \text{ Hz}$ , H-C(5)], 6.87 [dd, 1H,  $J=1.2 \text{ Hz}$ ,  $J=8.2 \text{ Hz}$ , H-C(6)], 6.99 [dd, 1H,  $J=10.8 \text{ Hz}$ ,  $J=15.4 \text{ Hz}$ , H-C(18)], 7.05 [d, 1H,  $J=1.5 \text{ Hz}$ , H-C(3)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  20.6 [C(3', 4')], 28.6 [C(2')], 28.8 [C(13)], 28.9 [C(12)], 29.0 [C(14)], 29.3 [C(11)], 32.6 [C(15)], 32.7 [C(10)], 46.5 [C(1')], 101.3 [C(1)], 105.6 [C(3)], 108.6 [C(6)], 120.6 [C(5)], 123.8 [C(19)], 129.1 [C(17)], 129.3 [C(8)], 129.6 [C(16)], 132.4 [C(4)], 139.5 [C(18)], 141.9 [C(9)], 146.7 [C(7)], 148.1 [C(2)], 165.7 [C(20)].



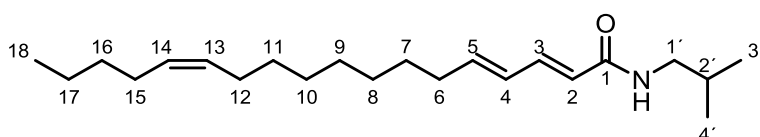
**Brachyamid A (32):** UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$ ; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  382 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 763 (90, [2M+H]<sup>+</sup>), 785 (74, [2M+Na]<sup>+</sup>), 404 (70, [M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 131 V):  $m/z$  (%) 382 (100), 282 (2), 187 (2), 161 (2), 135 (13), 131 (5), 103 (7); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  382.2382 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  382.2382; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.23–1.34 [m, 8H, H-C(12, 13, 22a, b)], 1.34–1.70 [m, 4H, H-C(11, 14)], 3.47 [t, 2H,  $J=7.1 \text{ Hz}$ , H-C(21a, b)], 2.09–2.16 [m, 4H, H-C(10, 15)], 5.97 [s, 2H, H-C(1)], 6.06–6.12 [m, 2H,  $J=15.8 \text{ Hz}$ , H-C(9, 16)], 6.21–6.28 [m, 2H,  $J=10.8 \text{ Hz}$ ,  $J=14.6 \text{ Hz}$ ,  $J=15.2 \text{ Hz}$ , H-C(17, 19)], 6.28 [d, 1H,  $J=16.0 \text{ Hz}$ , H-C(8)], 6.78 [dd, 1H,  $J=1.2 \text{ Hz}$ ,  $J=8.2 \text{ Hz}$ , H-C(5)], 6.82 [dd, 1H,  $J=1.2 \text{ Hz}$ ,



$J=8.2$  Hz, H-C(6)], 7.03 [dd, 1H,  $J=10.9$  Hz,  $J=14.6$  Hz, H-C(18)], 7.03 [d, 1H,  $J=1.5$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  24.3 [C(22b)], 26.1 [C(22a)], 28.7 [C(13)], 28.9 [C(12)], 29.2 [C(14)], 29.4 [C(11)], 32.7 [C(10)], 32.8 [C(15)], 45.9 [C(21b)], 46.5 [C(21a)], 101.3 [C(1)], 105.6 [C(3)], 108.6 [C(6)], 120.6 [C(5)], 121.5 [C(19)], 129.1 [C(17)], 129.3 [C(8)], 129.6 [C(16)], 132.3 [C(4)], 141.2 [C(18)], 142.5 [C(9)], 146.6 [C(7)], 148.1 [C(2)], 164.7 [C(20)].

(2*E*,4*E*,13*Z*)-*N*-Isobutyl-octadeca-2,4,13-trienamid (**33a**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}} = 260$  nm; LC-MS

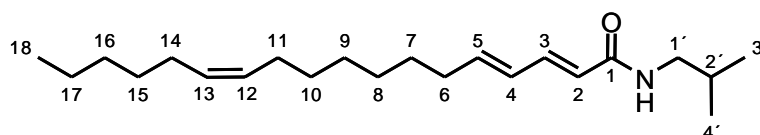
(ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  334 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 667 (96, [2M+H]<sup>+</sup>), 689 (91, [2M+Na]<sup>+</sup>), 356 (85, [M+Na]<sup>+</sup>),



372 (18, [M+K]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 71 V):  $m/z$  (%) 334 (100), 109 (5), 95 (8), 81 (15), 67 (16), 55 (20); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  334.3110 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  334.3110;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.83 [d, 6H,  $J=6.6$  Hz, H-C(3', 4')], 0.83–0.87 [m, 3H, H-C(18)], 1.18–1.31 [m, 12H, H-C(8, 9, 10, 11, 16, 17)], 1.31–1.40 [m, 2H, H-C(7)], 1.62–1.73 [m, 1H, H-C(2')], 1.90–2.03 [m, 4H, H-C(12, 15)], 2.11 [dt, 2H,  $J=7.3$  Hz, H-C(6)], 2.93 [t, 2H,  $J=6.6$  Hz, H-C(1')], 5.31 [pt, 2H,  $J=5.5$  Hz,  $J=11.1$  Hz, H-C(13, 14)], 5.92 [d, 1H,  $J=15.5$  Hz, H-C(2)], 6.00–6.07 [m, 1H, H-C(5)], 6.15 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.5$  Hz, H-C(4)], 6.96 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.5$  Hz, H-C(3)], 7.91 [t, 1H,  $J=5.6$  Hz, N-H];  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  13.8 [C(18)], 20.2 [C(3', 4')], 21.6 [C(17)], 26.3 [C(12)], 26.3 [C(15)], 28.1 [C(2')], 28.1 [C(7)], 28.3, 28.5, 28.6, 28.7 [C(8, 9, 10, 11)], 31.3 [C(16)], 32.1 [C(6)], 46.1 [C(1')], 123.4 [C(2)], 128.6 [C(4)], 129.6 [C(13)], 129.6 [C(14)], 139.0 [C(3)], 141.4 [C(5)], 165.2 [C(1)].

(2*E*,4*E*,12*Z*)-*N*-Isobutyl-octadeca-2,4,12-trienamid (**33b**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}} = 260$  nm; LC-MS

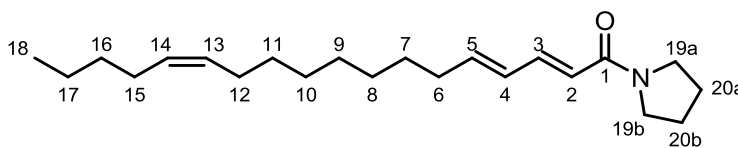
(ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  334 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 667 (96, [2M+H]<sup>+</sup>), 689 (91,



[2M+Na]<sup>+</sup>), 356 (85, [M+Na]<sup>+</sup>), 372 (18, [M+K]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 71 V):  $m/z$  (%) 334 (100), 109 (5), 95 (8), 81 (15), 67 (16), 55 (20); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  334.3110 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  334.3110;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.83 [d, 6H,  $J=6.6$  Hz, H-C(3', 4')], 0.83–0.87 [m, 3H, H-C(18)], 1.18–1.31 [m, 12H,

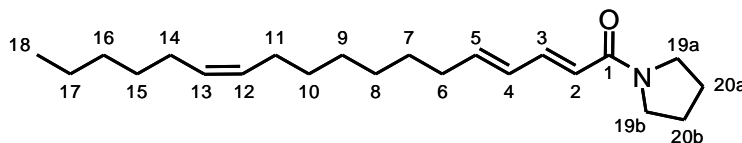
H-C(8, 9, 10, 15, 16, 17)], 1.31–1.40 [m, 2H, H-C(7)], 1.62–1.73 [m, 1H, H-C(2')], 1.90–2.03 [m, 4H, H-C(11, 14)], 2.11 [dt, 2H,  $J=7.3$  Hz, H-C(6)], 2.93 [t, 2H,  $J=6.6$  Hz, H-C(1')], 5.32 [pt, 2H,  $J=5.5$  Hz,  $J=11.1$  Hz, H-C(12, 13)], 5.92 [d, 1H,  $J=15.5$  Hz, H-C(2)], 6.00–6.07 [m, 1H, H-C(5)], 6.15 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.5$  Hz, H-C(4)], 6.96 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.5$  Hz, H-C(3)], 7.91 [t, 1H,  $J=5.6$  Hz, N-H];  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  13.8 [C(18)], 20.2 [C(3', 4')], 22.1 [C(17)], 26.3 [C(11)], 26.3 [C(14)], 28.1 [C(2')], 28.1 [C(7)], 28.3, 28.5, 28.6, 28.7 [C(8, 9, 10, 15)], 31.1 [C(16)], 32.1 [C(6)], 46.1 [C(1')], 123.4 [C(2)], 128.6 [C(4)], 129.6 [C(12)], 129.6 [C(13)], 139.0 [C(3)], 141.4 [C(5)], 165.2 [C(1)].

1-(Octadeca-2E,4E,13Z-trienyl)pyrrolidin (**34a**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  332 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 663 (87, [2M+H]<sup>+</sup>), 685 (78, [2M+Na]<sup>+</sup>), 354 (72, [M+Na]<sup>+</sup>), 370 (28, [M+K]<sup>+</sup>);



MS/MS (DP = 96 V):  $m/z$  (%) 332 (100), 164 (3), 150 (4), 136 (3), 124 (5), 107 (3), 98 (11), 67 (9), 55 (24); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  332.2983 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  332.2953;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.83–0.87 [m, 3H, H-C(18)], 1.18–1.32 [m, 12H, H-C(8, 9, 10, 11, 16, 17)], 1.33–1.45 [m, 2H, H-C(7)], 1.73–1.78 [m, 2H, H-C(20b)], 1.82–1.90 [m, 2H, H-C(20a)], 1.93–2.02 [m, 4H, H-C(12, 15)], 2.16 [dt, 2H,  $J=7.4$  Hz, H-C(6)], 3.27–3.40 [m, 2H, H-C(19b)], 3.47 [t, 2H,  $J=7.1$  Hz, H-C(19a)], 5.28–5.34 [m, 2H,  $J=5.5$  Hz,  $J=11.0$  Hz, H-C(13, 14)], 6.01–6.14 [m, 1H, H-C(5)], 6.16–6.29 [m, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.3$  Hz, H-C(4)], 6.25 [d, 1H,  $J=15.3$  Hz, H-C(2)], 7.02 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.3$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  14.0 [C(18)], 22.1 [C(17)], 23.9 [C(20b)], 25.7 [C(20a)], 26.6 [C(12)], 26.6 [C(15)], 28.5, 28.6, 28.7, 28.9 [C(8, 9, 10, 11)], 29.1 [C(7)], 31.3 [C(16)], 33.8 [C(6)], 45.5 [C(19b)], 46.0 [C(19a)], 121.1 [C(2)], 128.9 [C(4)], 129.7 [C(13)], 129.7 [C(14)], 140.8 [C(3)], 142.3 [C(5)], 163.8 [C(1)].

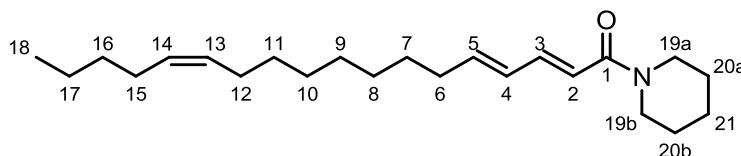
1-(Octadeca-2E,4E,12Z-trienyl)pyrrolidin (**34b**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  332 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 663 (87, [2M+H]<sup>+</sup>), 685 (78, [2M+Na]<sup>+</sup>), 354 (72, [M+Na]<sup>+</sup>), 370 (28, [M+K]<sup>+</sup>);



MS/MS (DP = 96 V):  $m/z$  (%) 332 (100), 164 (3), 150 (4), 136 (3), 124 (5), 107 (3), 98 (11),

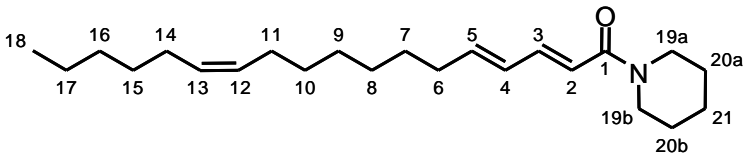
67 (9), 55 (24); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  332.2983 ( $[M+H]^+$ ), berechnet für  $[C_{22}H_{37}NO+H]^+$ , theoretisch:  $m/z$  332.2953;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.83–0.87 [m, 3H, H-C(18)], 1.18–1.32 [m, 12H, H-C(8, 9, 10, 15, 16, 17)], 1.33–1.49 [m, 2H, H-C(7)], 1.73–1.78 [m, 2H, H-C(20b)], 1.82–1.90 [m, 2H, H-C(20a)], 1.93–2.02 [m, 4H, H-C(11, 14)], 2.16 [dt, 2H,  $J=7.4$  Hz, H-C(6)], 3.27–3.40 [m, 2H, H-C(19b)], 3.47 [t, 2H,  $J=7.1$  Hz, H-C(19a)], 5.28–5.34 [m, 2H,  $J=5.5$  Hz,  $J=11.0$  Hz, H-C(12, 13)], 6.01–6.14 [m, 1H, H-C(5)], 6.16–6.29 [m, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.3$  Hz, H-C(4)], 6.25 [d, 1H,  $J=15.3$  Hz, H-C(2)], 7.02 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.3$  Hz, H-C(3)];  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  14.0 [C(18)], 22.9 [C(17)], 23.9 [C(20b)], 25.7 [C(20a)], 26.6 [C(11)], 26.6 [C(14)], 28.5, 28.6, 28.7, 28.9 [C(8, 9, 10, 15)], 29.1 [C(7)], 31.2 [C(16)], 33.8 [C(6)], 45.5 [C(19b)], 46.0 [C(19a)], 121.1 [C(2)], 128.9 [C(4)], 129.7 [C(12)], 129.7 [C(13)], 140.8 [C(3)], 142.3 [C(5)], 163.8 [C(1)].

1-(Octadeca-2E,4E,13Z-trienyl)piperidin (**35a**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{max}$  = 260 nm; LC-MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  346 (100,  $[M+H]^+$ ), 691 (86,  $[2M+H]^+$ ), 713 (81,  $[2M+Na]^+$ ), 368 (62,  $[M+Na]^+$ ), 384 (12,  $[M+K]^+$ );

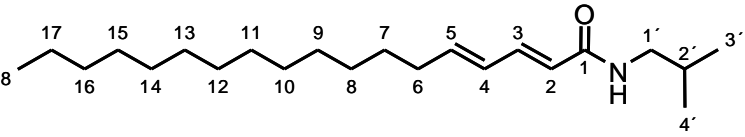


MS/MS (DP = 116 V):  $m/z$  (%) 346 (100), 138 (3), 112 (6), 95 (4), 86 (5), 81 (11), 69 (7), 67 (7), 55 (11), 53 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  346.3139 ( $[M+H]^+$ ), berechnet für  $[C_{23}H_{39}NO+H]^+$ , theoretisch:  $m/z$  346.3110;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.81–0.87 [m, 3H, H-C(18)], 1.20–1.31 [m, 12H, H-C(8, 9, 10, 11, 16, 17)], 1.33–1.41 [m, 2H, H-C(7)], 1.40–1.51 [m, 4H, H-C(20a, b)], 1.55–1.60 [m, 2H, H-C(21)], 1.90–2.04 [m, 4H, H-C(12, 15)], 2.15 [dt, 2H,  $J=7.3$  Hz, H-C(6)], 3.44–3.51 [m, 4H, H-C(19a, b)], 5.30–5.34 [m, 2H,  $J=5.6$  Hz,  $J=11.2$  Hz, H-C(13, 14)], 6.00–6.14 [m, 1H, H-C(5)], 6.13–6.29 [m, 1H,  $J=10.7$  Hz,  $J=15.4$  Hz, H-C(4)], 6.50 [d, 1H,  $J=15.4$  Hz, H-C(2)], 6.98–7.05 [m, 1H,  $J=10.7$  Hz,  $J=15.4$  Hz, H-C(3)];  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  13.8 [C(18)], 21.6 [C(17)], 23.8 [C(21)], 24.8 [C(20b)], 26.3 [C(12)], 26.3 [C(15)], 26.8 [C(20a)], 28.5 [C(7)], 28.6, 28.7, 28.8, 28.9 [C(8, 9, 10, 11)], 31.1 [C(16)], 33.7 [C(6)], 42.0 [C(19b)], 45.8 [C(19a)], 119.3 [C(2)], 128.9 [C(4)], 129.3 [C(13)], 129.3 [C(14)], 141.1 [C(3)], 141.4 [C(5)], 164.3 [C(1)].

*1-(Octadeca-2E,4E,12Z-trienyl)piperidin (35b)*: UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 260$  nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  346 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 691 (86, [2M+H]<sup>+</sup>), 713 (81, [2M+Na]<sup>+</sup>), 368 (62, [M+Na]<sup>+</sup>), 384 (12, [M+K]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 116 V):  $m/z$  (%) 346 (100), 138 (3), 112 (6), 95 (4), 86 (5), 81 (11), 69 (7), 67 (7), 55 (11), 53 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  346.3139 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  346.3110; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.81–0.87 [m, 3H, H-C(18)], 1.20–1.31 [m, 12H, H-C(8, 9, 10, 15, 16, 17)], 1.33–1.41 [m, 2H, H-C(7)], 1.40–1.51 [m, 4H, H-C(20a, b)], 1.55–1.60 [m, 2H, H-C(21)], 1.90–2.04 [m, 4H, H-C(11, 14)], 2.15 [dt, 2H,  $J=7.3$  Hz, H-C(6)], 3.44–3.51 [m, 4H, H-C(19a, b)], 5.30–5.34 [m, 2H,  $J=5.6$  Hz,  $J=11.2$  Hz, H-C(12, 13)], 6.00–6.14 [m, 1H, H-C(5)], 6.13–6.29 [m, 1H,  $J=10.7$  Hz,  $J=15.4$  Hz, H-C(4)], 6.50 [d, 1H,  $J=15.4$  Hz, H-C(2)], 6.98–7.05 [m, 1H,  $J=10.7$  Hz,  $J=15.4$  Hz, H-C(3)]; <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  13.8 [C(18)], 21.9 [C(17)], 23.8 [C(21)], 24.8 [C(20b)], 26.3 [C(11)], 26.3 [C(14)], 26.8 [C(20a)], 28.5 [C(7)], 28.6, 28.7, 28.8, 28.9 [C(8, 9, 10, 15)], 31.0 [C(16)], 33.7 [C(6)], 42.0 [C(19b)], 45.8 [C(19a)], 119.3 [C(2)], 128.9 [C(4)], 129.3 [C(12)], 129.3 [C(13)], 141.1 [C(3)], 141.4 [C(5)], 164.3 [C(1)].



*(2E,4E)-N-Isobutyloctadeca-2,4-dienamid (36)*: UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max} = 260$  nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  336 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 358 (29, [M+Na]<sup>+</sup>), 671 (18, [2M+H]<sup>+</sup>), 693 (11, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 136 V):  $m/z$  (%) 336 (100), 280,0 (3), 94,8 (6), 81,0 (12), 67,2 (11), 57,1 (16); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  336.3292 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>22</sub>H<sub>41</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  336.3266; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.86 [d, 6H,  $J=6.6$  Hz, H-C(3', 4')], 0.81–0.89 [m, 3H, H-C(18)], 1.23–1.34 [m, 22H, H-C(7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17)], 1.68–1.72 [m, 1H, H-C(2')], 2.17 [dt, 2H,  $J=7.1$  Hz, H-C(6)], 2.95 [t, 2H,  $J=6.6$  Hz, H-C(1')], 5.95 [d, 1H,  $J=15.3$  Hz, H-C(2)], 6.09–6.11 [m, 1H, H-C(5)], 6.15–6.23 [m, 1H, H-C(4)], 6.97 [dd, 1H,  $J=10.5$  Hz,  $J=15.3$  Hz, H-C(3)], 7.97 [t, 1H,  $J=6.0$  Hz, N-H]; <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  14.4 [C(18)], 20,6 [C(3', 4')], 22.3 [C(17)], 24.5 [C(7)], 28.4 [C(2')], 29.0, 29.1, 29.1, 29.2, 29.2, 29.4, 29.4, 29.5 [C(8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)], 31.5 [C(16)], 31.8 [C(6)], 46.5 [C(1')], 123.7 [C(2)], 129.2 [C(4)], 139.4 [C(3)], 141.8 [C(5)], 165.4 [C(1)].



(2*E*,4*E*,15*Z*)-*N*-Isobutyl-eicosa-2,4,15-trienamid (**37a**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):

$\lambda_{\max}$  = 260 nm; LC-MS

(ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  362 (100,

[M+H]<sup>+</sup>, 384 (56,

[M+Na]<sup>+</sup>, 723 (12, [2M+H]<sup>+</sup>, 745 (10, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 106 V):  $m/z$  (%) 362 (100),

276 (5), 220 (5), 138,0 (11), 112 (6), 95 (5), 86 (28), 69 (12), 67 (10), 55 (22); LC-TOF-MS:

gefunden  $m/z$  362.3456 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  362.3423;

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.81 [d, 6H,  $J=6.6$  Hz, H-C(3', 4')], 0.81–0.84

[m, 3H, C(20)], 1.17–1.29 [m, 16H, H-C(8, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 19)], 1.30–1.38 [m, 2H, H-

C(7)], 1.62–1.70 [m, 1H, H-C(2')], 1.91–2.00 [m, 4H, H-C(14, 17)], 2.05–2.15 [m, 2H,

$J=7.1$  Hz, H-C(6)], 2.91 [t, 2H,  $J=6.4$  Hz, H-C(1')], 5.26–5.33 [m, 2H,  $J=5.5$  Hz,  $J=11.0$  Hz, H-

C(15, 16)], 5.91 [d, 1H,  $J=15.2$ , H-C(2)], 5.99–6.06 [m, 1H, H-C(5)], 6.08–6.18 [m, 1H,

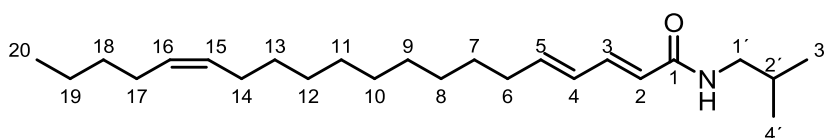
$J=10.2$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(4)], 6.94 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(3)], 7.96 [t, 1H,

$J=5.7$  Hz, N-H]; <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  14.2 [C(20)], 20.4

[C(3')], 20.4 [C(4')], 22.0 [C(19)], 26.6 [C(14)], 26.6 [C(17)], 28.4 [C(2')], 28.4 [C(7)], 28.5,

28.6, 28.8, 28.9, 29.0, 29.2 [C(8, 9, 10, 11, 12, 13)], 31.2 [C(18)], 32.5 [C(6)], 46.5 [C(1')],

123.4 [C(2)], 128.8 [C(4)], 129.9 [C(15, 16)], 139.6 [C(3)], 142.1 [C(5)], 165.9 [C(1)].



(2*E*,4*E*,14*Z*)-*N*-Isobutyl-eicosa-2,4,14-trienamid (**37b**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):

$\lambda_{\max}$  = 260 nm; LC-MS

(ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  362 (100,

[M+H]<sup>+</sup>, 384 (56,

[M+Na]<sup>+</sup>, 723 (12,

[2M+H]<sup>+</sup>, 745 (10, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 106 V):  $m/z$  (%) 362 (100), 276 (5), 220 (5),

138,0 (11), 112 (6), 95 (5), 86 (28), 69 (12), 67 (10), 55 (22); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$

362.3456 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>43</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch:  $m/z$  362.3423; <sup>1</sup>H NMR

(500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.81 [d, 6H,  $J=6.6$  Hz, H-C(3', 4')], 0.81–0.84 [m, 3H,

C(20)], 1.17–1.29 [m, 16H, H-C(8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19)], 1.30–1.38 [m, 2H, H-C(7)],

1.62–1.70 [m, 1H, H-C(2')], 1.91–2.00 [m, 4H, H-C(13, 16)], 2.05–2.15 [m, 2H,  $J=7.1$  Hz, H-

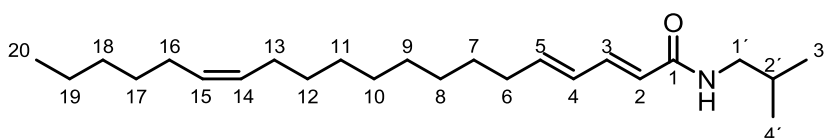
C(6)], 2.91 [t, 2H,  $J=6.4$  Hz, H-C(1')], 5.26–5.33 [m, 2H,  $J=5.5$  Hz,  $J=11.0$  Hz, H-C(14, 15)],

5.91 [d, 1H,  $J=15.2$  Hz, H-C(2)], 5.99–6.06 [m, 1H, H-C(5)], 6.08–6.18 [m, 1H,  $J=10.2$  Hz,

$J=15.2$  Hz, H-C(4)], 6.94 [dd, 1H,  $J=10.2$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(3)], 7.96 [t, 1H,  $J=5.7$  Hz, N-H];

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  14.2 [C(20)], 20.4 [C(3')], 20.4

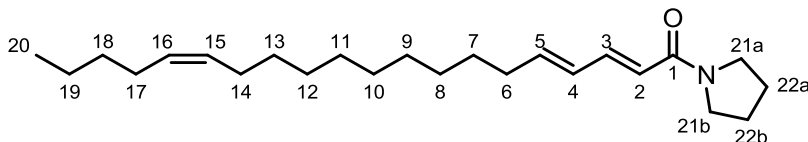
[C(4')], 22.3 [C(19)], 26.6 [C(13)], 26.6 [C(16)], 28.4 [C(2')], 28.4 [C(7)], 28.5, 28.6, 28.8,



28.9, 29.0, 29.2 [C(8, 9, 10, 11, 12, 17)], 31.4 [C(18)], 32.5 [C(6)], 46.5 [C(1')], 123.4 [C(2)], 128.8 [C(4)], 129.9 [C(14, 15)], 139.6 [C(3)], 142.1 [C(5)], 165.9 [C(1)].

1-(*Eicos*a-2*E*,4*E*,15*Z*-trienoyl)pyrrolidin (**38a**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max}$  = 260 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z*

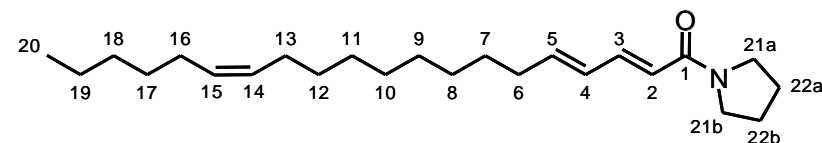
360 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 382 (32, [M+Na]<sup>+</sup>), 719 (18, [2M+H]<sup>+</sup>), 731 (12,



[2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS (DP = 101 V): *m/z* (%) 360 (100), 138 (2), 85 (4), 69 (3), 67 (3), 55 (2); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 360.3272 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch: *m/z* 360.3266; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.81–0.88 [m, 3H, H-C(20)], 1.16–1.33 [m, 16H, H-C(8, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 19)], 1.33–1.42 [m, 2H, H-C(7)], 1.72–1.80 [m, 2H, H-C(22b)], 1.82–1.91 [m, 2H, H-C(22a)], 1.92–2.04 [m, 4H, H-C(14, 17)], 2.06–2.19 [m, 2H, H-C(6)], 3.27–3.39 [m, 2H, H-C(21b)], 3.43–3.51 [m, 2H, H-C(21a)], 5.31 [pt, 2H, *J*=4.9 Hz, *J*=10.0 Hz, H-C(15, 16)], 6.04–6.15 [m, 1H, H-C(5)], 6.12–6.26 [m, 1H, *J*=10.6 Hz, *J*=15.2 Hz, H-C(4)], 6.25 [d, 1H, *J*=15.2 Hz, H-C(2)], 7.02 [dd, 1H, *J*=10.6 Hz, *J*=15.2 Hz, H-C(3)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  13.7 [C(20)], 22.8 [C(19)], 23.6 [C(22b)], 25.4 [C(22a)], 26.3 [C(14)], 26.3 [C(17)], 28.7 [C(7)], 28.0, 28.3, 28.4, 28.5, 28.7, 28.7 [C(8, 9, 10, 11, 12, 13)], 31.0 [C(18)], 33.0 [C(6)], 45.2 [C(21b)], 45.6 [C(21a)], 120.8 [C(2)], 128.6 [C(4)], 129.4 [C(15)], 129.4 [C(16)], 140.5 [C(3)], 141.8 [C(5)], 163.6 [C(1)].

1-(*Eicos*a-2*E*,4*E*,14*Z*-trienoyl)pyrrolidin (**38b**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max}$  = 260 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z*

360 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 382 (32, [M+Na]<sup>+</sup>), 719 (18, [2M+H]<sup>+</sup>), 731 (12, [2M+Na]<sup>+</sup>); MS/MS



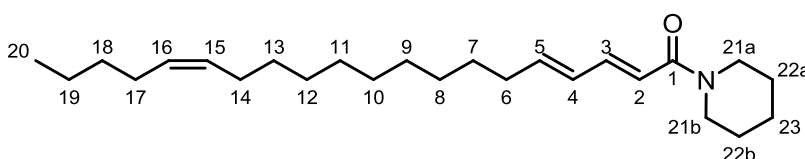
(DP = 101 V): *m/z* (%) 360 (100), 138 (2), 85 (4), 69 (3), 67 (3), 55 (2); LC-TOF-MS: gefunden *m/z* 360.3272 ([M+H]<sup>+</sup>), berechnet für [C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>NO+H]<sup>+</sup>, theoretisch: *m/z* 360.3266; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.81–0.88 [m, 3H, H-C(20)], 1.16–1.33 [m, 18H, H-C(8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19)], 1.33–1.42 [m, 2H, H-C(7)], 1.72–1.80 [m, 2H, H-C(22b)], 1.82–1.91 [m, 2H, H-C(22a)], 1.92–2.04 [m, 4H, H-C(13, 16)], 2.06–2.19 [m, 2H, H-C(6)], 3.27–3.39 [m, 2H, H-C(21b)], 3.43–3.51 [m, 2H, H-C(21a)], 5.31 [pt, 2H, *J*=4.9 Hz, *J*=10.0 Hz, H-C(14, 15)], 6.04–6.15 [m, 1H, H-C(5)], 6.12–6.26 [m, 1H, *J*=10.6 Hz,



$J=15.2$  Hz, H-C(4)], 6.25 [d, 1H,  $J=15.2$  Hz, H-C(2)], 7.02 [dd, 1H,  $J=10.6$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  13.7 [C(20)], 22.8 [C(19)], 23.6 [C(22b)], 25.4 [C(22a)], 26.3 [C(13)], 26.3 [C(16)], 28.7 [C(7)], 28.0, 28.3, 28.4, 28.5, 28.7, 28.7 [C(8, 9, 10, 11, 12, 17)], 31.1 [C(18)], 33.0 [C(6)], 45.2 [C(21b)], 45.6 [C(21a)], 120.8 [C(2)], 128.6 [C(4)], 129.4 [C(14)], 129.4 [C(15)], 140.5 [C(3)], 141.8 [C(5)], 163.6 [C(1)].

1-(Eicosa-2E,4E,15Z-trienoyl)piperidin (**39a**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm; LC-MS (ESI $^+$ ):  $m/z$

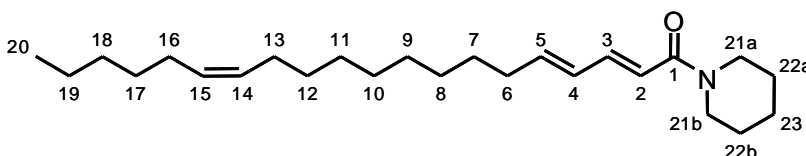
374 (100, [M+H] $^+$ ), 396 (75, [M+Na] $^+$ ), 747 (55, [2M+H] $^+$ ), 769 (12, [2M+Na] $^+$ ); MS/MS (DP =



141 V):  $m/z$  (%) 374 (100), 138 (4), 112 (4), 95 (4), 86 (6), 81 (9), 69 (7), 67 (7), 55 (9), 53 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  374.3427 ([M+H] $^+$ ), berechnet für [C $_{25}$ H $_{43}$ NO+H] $^+$ , theoretisch:  $m/z$  374.3423;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  0.80–0.88 [m, 3H, H-C(20)], 1.14–1.32 [m, 16H, H-C(8, 9, 10, 11, 12, 13, 18, 19)], 1.32–1.39 [m, 4H, H-C(7)], 1.39–1.50 [m, 4H, H-C(22a, b)], 1.54–1.61 [m, 2H, H-C(23)], 1.90–2.03 [m, 4H, H-C(14, 17)], 2.16 [dt, 2H,  $J=7.3$  Hz, H-C(6)], 3.42–3.52 [m, 4H, H-C(21a, b)], 5.31 [pt, 2H,  $J=5.0$  Hz,  $J=10.2$  Hz, H-C(15, 16)], 6.00–6.12 [m, 1H, H-C(5)], 6.09–6.28 [m, 1H,  $J=10.8$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(4)], 6.51 [d, 1H,  $J=15.0$  Hz, H-C(2)], 7.02 [dd, 1H,  $J=10.8$  Hz,  $J=15.0$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  14.0 [C(20)], 22.1 [C(19)], 24.0 [C(23)], 24.2 [C(22b)], 26.6 [C(22a)], 26.7 [C(14)], 26.7 [C(17)], 29.0 [C(7)], 28.3, 28.5, 28.6, 28.8, 28.9, 28.9 [C(8, 9, 10, 11, 12, 13)], 31.1 [C(18)], 32.3 [C(6)], 42.4 [C(21b)], 45.7 [C(21a)], 119.5 [C(2)], 129.0 [C(4)], 129.7 [C(15)], 129.7 [C(16)], 141.4 [C(3)], 141.8 [C(5)], 164.5 [C(1)].

1-(Eicosa-2E,4E,14Z-trienoyl)piperidin (**39b**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\text{max}}$  = 260 nm; LC-MS (ESI $^+$ ):  $m/z$

374 (100, [M+H] $^+$ ), 396 (75, [M+Na] $^+$ ), 747 (55, [2M+H] $^+$ ), 769 (12, [2M+Na] $^+$ ); MS/MS



(DP = 141 V):  $m/z$  (%) 374 (100), 138 (4), 112 (4), 95 (4), 86 (6), 81 (9), 69 (7), 67 (7), 55 (9), 53 (10); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  374.3427 ([M+H] $^+$ ), berechnet für [C $_{25}$ H $_{43}$ NO+H] $^+$ , theo-

retisch:  $m/z$  374.3423;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; COSY):  $\delta/\text{ppm}$ :  $\delta$  0.80–0.88 [m, 3H, H-C(20)], 1.14–1.32 [m, 16H, H-C(8, 9, 10, 11, 12, 17, 18, 19)], 1.32–1.39 [m, 4H, H-C(7)], 1.39–1.50 [m, 4H, H-C(22a, b)], 1.54–1.61 [m, 2H, H-C(23)], 1.90–2.03 [m, 4H, H-C(13, 16)], 2.16 [dt, 2H,  $J=7.3$  Hz, H-C(6)], 3.42–3.52 [m, 4H, H-C(21a, b)], 5.31 [pt, 2H,  $J=5.0$  Hz,  $J=10.2$  Hz, H-C(14, 15)], 6.00–6.12 [m, 1H, H-C(5)], 6.09–6.28 [m, 1H,  $J=10.8$  Hz,  $J=15.2$  Hz, H-C(4)], 6.51 [d, 1H,  $J=15.0$  Hz, H-C(2)], 7.02 [dd, 1H,  $J=10.8$  Hz,  $J=15.0$  Hz, H-C(3)];  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; HMQC, HMBC):  $\delta/\text{ppm}$ :  $\delta$  14.0 [C(20)], 22.1 [C(19)], 24.0 [C(23)], 24.2 [C(22b)], 26.6 [C(22a)], 26.7 [C(13)], 26.7 [C(16)], 29.0 [C(7)], 28.3, 28.5, 28.6, 28.8, 28.9, 28.9 [C(8, 9, 10, 11, 12, 17)], 31.4 [C(18)], 32.3 [C(6)], 42.4 [C(21b)], 45.7 [C(21a)], 119.5 [C(2)], 129.0 [C(4)], 129.7 [C(14)], 129.7 [C(15)], 141.4 [C(3)], 141.8 [C(5)], 164.5 [C(1)].

## 5.4 Synthese von Referenzsubstanzen

Soweit erforderlich, werden alle Arbeiten unter Ausschluss von Licht, Luft und Feuchtigkeit in einer  $\text{N}_2$ -Inertgasatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Braunglasapparaturen werden vor Gebrauch mehrere Stunden im Trockenschrank bei 220 °C ausgeheizt und mit Inertgas gespült. Sämtliche Lösungsmittel werden nach gängigen Verfahren destilliert und über Molekularsieb (4 Å) getrocknet.

Die Zuordnung der NMR-spektroskopischen Signale wird mit Hilfe von COSY-, DEPT-,  $J$ -Resolved-, NOESY-, ROESY-, TOCSY-, HMQC- und HMBC-Spektren vorgenommen und bezieht sich auf die gewählte Nummerierung der C-Atome der jeweiligen nebenstehenden Strukturen.

### 5.4.1 Synthesen von Referenzsubstanzen aus Spargel

#### 5.4.1.1 Methylierung des Protodioscins zu Methylprotodioscin

In Anlehnung an Hu et al. (1997) wird Protodioscin (10 mg, 9,6  $\mu\text{mol}$ ) in Pyridin (0,1 ml) gelöst, in Methanol überführt und 24 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die abschließende Strukturaufklärung wird mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR Messungen sowie durch Auswertung von 1D- und 2D-NMR-Experimenten erbracht, deren Daten im Anhang in Tabelle 31, Tabelle

32 und Tabelle 33 dargestellt sind. Die Bezifferung der C-Atome entspricht der Struktur aus Abbildung 91.

### Massenspektrometrische Daten der Verbindung 16 :

3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-{ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)}- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-26-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(25R)-22-methoxyfurost-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol (Methylprotodioscin) (**16**): LC-MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  1107 (100, [M+HCOO]<sup>-</sup>), 1061 (49, [M-H]<sup>-</sup>), 1097 (35, [M+Cl]<sup>-</sup>), 1047 (15, [M-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -170 V):  $m/z$  (%) 1061 (100), 915 (47), 897 (9), 769 (7), 607 (3), 289 (6), 247 (41), 205 (53), 179 (13), 163 (32), 161 (21); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  1061.5551 ([M-H]<sup>-</sup>), berechnet für [C<sub>52</sub>H<sub>85</sub>O<sub>22</sub>-H]<sup>-</sup>, theoretisch:  $m/z$  1061.5538.

#### 5.4.1.2 Synthese der Asparagussäure

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der TUM in Garching wurde in Anlehnung an Singh und Whitesides (1990) sowie an Bretthauer (2007) Asparagussäure (**4**) synthetisch generiert (Abbildung 88).

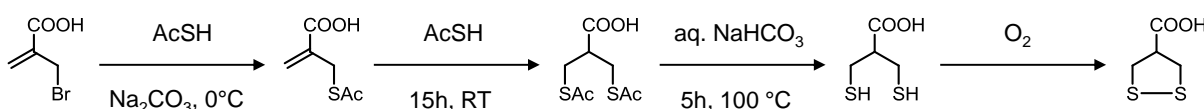


Abbildung 88: Syntheseweg zur Darstellung von Asparagussäure.

Dazu wird 2-Brommethylpropionsäure (4,95 g, 30 mmol) in 100 ml Wasser gelöst und auf 0 °C gekühlt (Kryostat mit Eintauchkühler, Huber, Offenburg). Unter Rühren werden nacheinander eine Natriumcarbonatlösung (5,5 g in 20 ml Wasser, 52 mmol) und eine Thioessigsäurelösung (2,2 ml, 30,5 mmol, gelöst in Wasser) langsam zutropft. Nach 15 Minuten Rühren wird die Lösung mit Salzsäure (10%-ig) auf pH 1 angesäuert und mit Ethylacetat (2 × 50 ml) extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über wasserfreiem

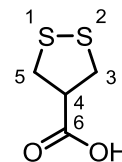
Magnesiumsulfat und Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird 3-(Acetylthio)-2-methenyl-1-propionsäure als kristalliner weißer Rückstand erhalten.

Anschließend werden 3,6 g (22,5 mmol) 3-(Acetylthio)-2-methenyl-1-propionsäure in Thioessigsäure (2,4 ml, 33,8 mmol) gelöst und 15 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Rotavapor werden die leicht flüchtigen Bestandteile entfernt und die gelbe Lösung eingeeengt. Dieser Ansatz wird mit entgaster Natriumhydrogencarbonatlösung (200 ml, 10 Gew.-%) 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Raumtemperatur wird eine Spatelspitze Eisen(III)chlorid als Katalysator und Indikator hinzugesetzt. Anschließend wird sehr langsam bei Raumtemperatur so lange Sauerstoff mit Hilfe einer Glaskapillare eingeleitet, bis die dunkelviolette Farbe nicht mehr zu erkennen ist. Die Rohsynthese wird mit Schwefelsäure auf pH 1 gebracht und mit Diethylether (3 × 50 ml) extrahiert. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird das gelbe Öl an RP18-Kartuschen (Solid Phase Extraktion C-18-E, 55 µm, 70A, 10 g/60 ml, Strata™, Phenomenex, Aschaffenburg) aufgereinigt. Dazu wird das Rohprodukt in einem MeOH/H<sub>2</sub>O-Gemisch (20/80, v/v, 5 ml) gelöst und auf die mit MeOH (60 ml) und Wasser (100 ml) vorkonditionierte Kartusche gegeben. Die Elution der Rohsynthese erfolgt schrittweise mit 60 ml Methanol/Wasser (0/100, v/v, Fraktion 1), 60 ml Methanol/Wasser (60/40, v/v, Fraktion 2) und zuletzt mit 60 ml Methanol (Fraktion 3). Das Produkt befindet sich in Fraktion 2, dessen Lösungsmittelanteil am Rotationsverdampfer von Lösungsmitteln befreit wird. Nach Ausschütteln der wässrigen Phase mit Ethylacetat (3 × 50 ml) werden die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingeeengt und mittels präparativer RP-HPLC-ELSD (System 4) aufgereinigt.

Stationäre Phase:	HyperClone ODS 120 (250 × 21,2 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Flussrate:	20 ml/min
Detektion:	ELSD
Gain:	8
Split:	Präparativ: 1 ml (in den ELSD) : 19 ml (in den Kolben)
Verdampfertemperatur:	40 °C
Injektionsvolumen:	1 ml
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure aq B: 0,1% Ameisensäure in Methanol
Gradient:	0% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 10% B, isokratisch (5 min), in 15 min auf 50% B, in weiteren 13 min auf 100% B, isokratisch (10 min), innerhalb von 5 min auf 0% B, isokratisch (5 min)

Das Syntheseprodukt wird mittels Massenspektroskopie (ESI<sup>-</sup>) und Kernresonanzspektroskopie überprüft und stimmt mit den Daten der nach alkalischer Hydrolyse isolierten Asparagussäure (vgl. 3.2.2.3 und 5.8.6.2) überein.

*Asparagussäure (4)*: LC-MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  149 (100, [M-H]<sup>-</sup>), 299 (87, [2M-H]<sup>-</sup>), 195 (80, [M+HCOO]<sup>-</sup>), 185 (14, [M+Cl]<sup>-</sup>); MS/MS (DP = -60 V):  $m/z$  (%) 104 (20), 63 (100); LC-TOF-MS: gefunden  $m/z$  148.9744 ([M-H]<sup>-</sup>), berechnet für [C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>, theoretisch:  $m/z$  148.9731; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  3.30 [dd, 2H,  $J=4.2$  Hz,  $J=11.4$  Hz, H-C(3a, 5a)], 3.40 [dd, 2H,  $J=6.1$  Hz, 11.4 Hz, H-C(3b, 5b)], 3.49-3.54 [m, 1H, H-C(4)], 12.8 [s, 1H, COOH]; <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC): 41.5 [C(3, 5)], 50.7 [C(4)], 173.4 [C(6)].



#### 5.4.2 Synthesen von Referenzsubstanzen aus Pfeffer

Natürliche und synthetische Piperinderivate werden nach dem folgenden Schema dargestellt (Abbildung 89): In einem ersten Schritt wird Piperin in einer alkalischen Ethylenglycollösung gespalten, sodass die freie Säure anschließend mit Thionylchlorid zu Piperinsäurechlorid aktiviert und mit den in Tabelle 13 aufgeführten Basen zu den jeweiligen Zielsäureamiden umgesetzt werden kann.

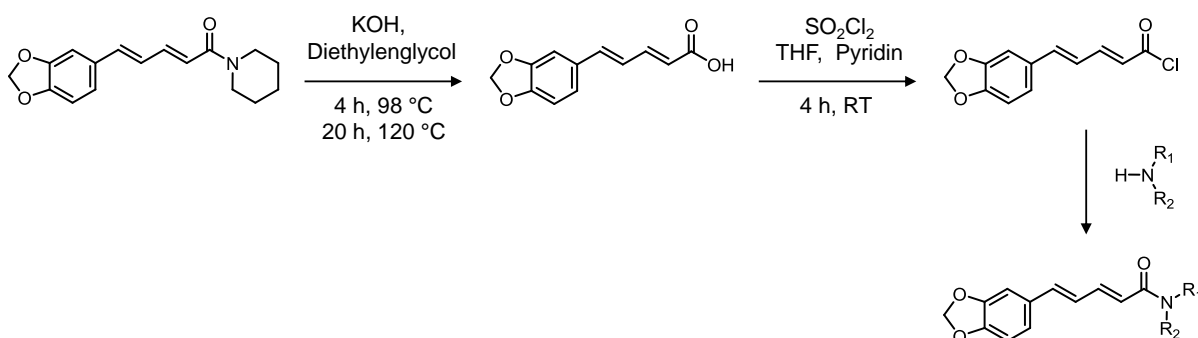
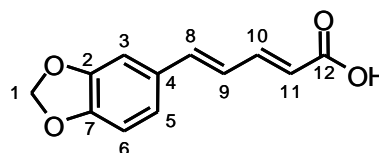


Abbildung 89: Syntheschema zur Darstellung von Säureamiden

## 5.4.2.1 Synthesen von Piperinsäurechlorid

Zunächst erfolgt die alkalische Spaltung von Piperin in Anlehnung an das Verfahren von Venkatasamy et al. (2004) und Becker et al. (2009). Piperin (2,0042 g, 7,1 mmol) wird in einer alkalischen Ethylenglykollösung (5,6 g KOH in 20 ml Diethylenglykol) gelöst und 4 Stunden bei 98 °C in einem Sovirel-Glas erhitzt. Anschließend wird die dunkel gefärbte Reaktionsmischung für weitere 20 Stunden bei 110 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstehende Niederschlag in Methanol (140 ml) aufgenommen und mit Wasser (250 ml) versetzt. Der pH-Wert der Lösung wird auf pH 11 mit Salzsäure (1 M) eingestellt und die wässrige Lösung wird mit Ethylacetat (4 × 200 ml) gewaschen. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase mit Salzsäure (1 M) auf pH 3 eingestellt und die entstandene Piperinsäure wird mit Ethylacetat (4 × 200 ml) extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat und Einengen am Rotationsverdampfer auf 5 ml fällt die Säure aus. Die Piperinsäure wird abfiltriert, im Stickstoffstrom getrocknet und mit Methanol einer Umkristallisation unterworfen, wobei die gelben Kristalle bei einer Lagerung bei -18 °C aus der methanolischen Lösung ausfallen. Die Säure wird im Stickstoffstrom und mittels Gefriertrocknung getrocknet.

*Piperinsäure*: UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max}$  = 244 nm, 340 nm; LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 241 (100, [M+Na]<sup>+</sup>), 219 (98, [M+H]<sup>+</sup>), 459 (89, [2M+Na]<sup>+</sup>), 437 (21, [2M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  5.93 [d, 1H, *J*=15.5 Hz, H-C(11)], 6.05 [s, 2H, H-C(1)], 6.91–6.98 [m, 3H, H-C(6,8,9)], 7.01 [dd, 1H, *J*=1.5 Hz, *J*=8.0 Hz, H-C(3)], 7.23 [d, 1H, *J*=1.5 Hz, H-C(3)], 7.27–7.34 [m, 1H, H-C(10)]; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC):  $\delta$  101.8 [C(1)], 106.2 [C(3)], 108.9 [C(6)], 121.6 [C(11)], 123.5 [C(9)], 125.3 [C(8)], 130.9 [C(4)], 140.1 [C(8)], 145.1 [C(10)], 148.4 [C(7)], 148.5 [C(2)], 167.2 [C(12)].

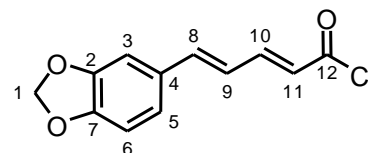


(4,7 mmol; Ausbeute: 66%)

651 mg (2,98 mmol) der synthetisierten Piperinsäure werden in Anlehnung an de Paula et al. (2000) und Venkatasamy (2003) in Tetrahydrofuran (THF) (4 ml) gelöst. Unter Argonatmosphäre wird tropfenweise die doppelte Stoffmenge an Thionylchlorid (0,709 g; 0,45 ml) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird mit zwei Tropfen Pyridin versetzt, wobei eine klare, gelbe Lösung entsteht und eine Gasentwicklung auftritt. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Argonzufuhr, werden das überschüssige Thionylchlorid und

das THF mit Stickstoff abgeblasen. Es verbleibt ein roter, kristalliner Rückstand, mit dem weiter gearbeitet wird. Zur Überprüfung des hergestellten Piperinsäurechlorides wird die Dünnschichtchromatographie (DC) herangezogen, die in einer mit einem Glasdeckel verschließbaren Chromatographiekammer durchgeführt wird. Vor Beginn der Trennung wird die Trennkammer mit 100 ml der mobilen Phase (Ethylacetat/Diethylether (50/50; v/v)) befüllt und bis zur Kammersättigung konditioniert. Das synthetisierte Piperinsäurechlorid und Piperinsäure (Referenz) werden in THF gelöst, auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F254, 5 × 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm) aufgetragen und getrocknet. Die Platte wird in die DC-Kammer gestellt und bis zu einer Laufstrecke von ca. 10 cm entwickelt.

*Piperinsäurechlorid*:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ; COSY):  $\delta/\text{ppm}$ :  $\delta$  5.93 [d, 1H,  $J=15.5$  Hz, H-C(11)], 6.05 [s, 2H, H-C(1)], 6.91–6.98 [m, 3H, H-C(6,8,9)], 7.01 [dd, 1H,  $J=2.0$  Hz,  $J=8.0$  Hz, H-C(3)], 7.23 [d, 1H,  $J=2.0$  Hz, H-C(3)], 7.27–7.34 [m, 1H, H-C(10)].



(2,5 mmol; Ausbeute: 83%)

#### 5.4.2.2 Synthese von Säureamiden

Die Synthese der Säureamide basiert auf der modifizierten Methode nach de Paula et al. (2000). Im ersten Schritt wird Piperinsäurechlorid (2 mmol, 472 mg) in THF (10 ml) gelöst. Nach langsamer Zugabe (innerhalb von 30 min.) der jeweiligen, in Tabelle 13 aufgeführten Basen (6 mmol; gelöst in 1 ml THF), wird der Reaktionsansatz 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung quantitativ in tert.-Butylmethylether (TBME) (200 ml) aufgenommen, mit Wasser (3 × 200 ml), HCl (0,5 N; 200 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (200 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum auf 5 ml eingeeengt. Um das Produkt auskristallisieren zu lassen, werden 5 ml Hexan zugegeben. Die Umkristallisation bei  $-18$  °C liefert weiße Nadeln, die abfiltriert und unter Stickstoffstrom getrocknet werden.

Die Syntheseprodukte werden mittels Massenspektrometrie ( $\text{ESI}^+$ ) und Kernresonanzspektroskopie überprüft.

Tabelle 13: Übersicht der synthetisierten Säureamide

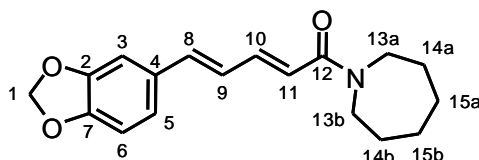
Acylchloride	Base	Zielverbindung <sup>a</sup> (Nr.)	Ausbeute [%]
Piperinsäurechlorid	Isobutylamin	Piperlonguminin <sup>b</sup> ( <b>22</b> )	72
Piperinsäurechlorid	Pyrrolidin	Piperylin <sup>b</sup> ( <b>23</b> )	92
Piperinsäurechlorid	Heptamethylenamin	5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienylhexamethylenimin ( <b>40</b> )	94
Piperinsäurechlorid	Heptamethylenimin	5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienylheptamethylenimin ( <b>41</b> )	97
Piperinsäurechlorid	2-Propanol	5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienylsäurepropylester ( <b>42</b> )	19

<sup>a</sup> Die chemischen Strukturen der Zielverbindungen sind bei den spektroskopischen Daten angegeben.

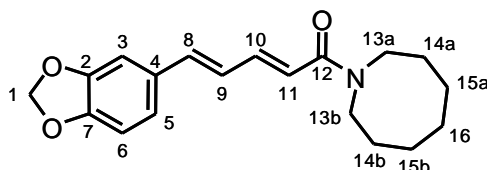
<sup>b</sup> Die Spektrensätze stimmen mit den unter 5.3.2.2 zu findenden Daten der aus Pfeffer isolierten Säureamide überein.

**Spektroskopische Daten der Verbindungen 40, 41, 42 und 43 (die Bezifferung der C-Atome entspricht den nebenstehenden Strukturen):**

5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienylhexamethylenimin (**40**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max}$  = 362; LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 300 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 322 (82, [M+Na]<sup>+</sup>), 611 (78, [2M+Na]<sup>+</sup>), 599 (69, [2M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.48 [m, 4H, H-C(15a, 15b)], 1.64 [m, 4H, H-C(14a, 14b)], 3.49 [m, 4H, H-C(13a, 13b)], 6.03 [s, 2H, H-C(1)], 6.58 [d, 1H, *J*=14.5 Hz, H-C(11)], 6.88-6.79 [m, 3H, H-C(6, 8, 9)], 6.99 [m, 1H, *J*=1.4 Hz, H-C(5)], 7.17 [d, 1H, *J*=1.4 Hz, H-C(3)], 7.22 [dd, 1H, *J*=14.5 Hz, H-C(10)].



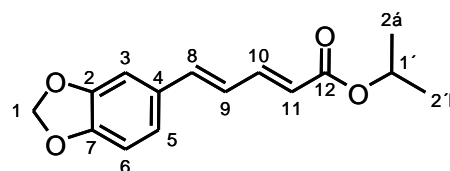
5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienylheptamethylenimin (**41**): UV/Vis (MeOH/Wasser; pH 3,5):  $\lambda_{\max}$  = 378; LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 314 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 336 (92, [M+Na]<sup>+</sup>), 649 (31, [2M+Na]<sup>+</sup>), 627 (22, [2M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.47 [m, 6H, H-C(16, 15a, 15b)], 1.65 [m, 4H, H-C(14a, 14b)], 3.48 [m, 4H,





H-C(13a, 13b)], 6.03 [s, 2H, H-C(1)], 6.56 [d, 1H,  $J=14.6$  Hz, H-C(11)], 6.87–7.03 [m, 3H, H-C(6, 8, 9)], 9.96 [m, 1H,  $J=1.6$  Hz, H-C(5)], 7.19 [d, 1H,  $J=1.6$  Hz, H-C(3)], 7.23 [dd, 1H,  $J=14,6$  Hz, H-C(10)].

*5-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2,4-pentadienoylsäurepropylester (42)*: LC-MS (ESI):  $m/z$  259 (100, [M-H]<sup>-</sup>), 291 (61, [M+Cl]<sup>-</sup>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY):  $\delta$ /ppm:  $\delta$  1.21 [d, 6H,  $J=6.2$  Hz, H-C(2'a, 2'b)], 4.96 [m, 1H, H-C(1')], 5.95 [d, 1H, H-C(11)], 6.03 [s, 2H, H-C(1)], 6.87–7.01 [m, 3H, H-C(6, 8, 9)], 7.00 [m, 1H, H-C(3)], 7.18 [d, 1H,  $J=1.5$  Hz, H-C(5)], 7.33 [m, 1H,  $J=15.3$  Hz, H-C(10)].



### 5.4.3 Synthese von Piperettin und Piperolein

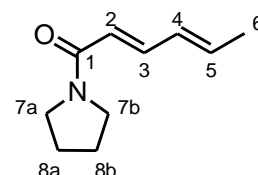
Die Synthese von Piperettin (**25**) und Piperolein (**26**) erfolgt analog in Anlehnung an ein von Venkatasamy et al. (2004) beschriebenes Verfahren über eine Aldolkondensation von Piperonal an 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin beziehungsweise 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin (vgl. Abbildung 61).

Dazu werden 700 mg (6,25 mmol) Sorbinsäure in Tetrahydrofuran (THF) (7 ml) gelöst. Unter Argonatmosphäre wird tropfenweise die doppelte Stoffmenge an Thionylchlorid (1,487 g; 0,906 ml) zugegeben. Der Reaktionsansatz wird mit zwei Tropfen Pyridin versetzt, wobei eine klare, gelbe Lösung entsteht und eine Gasentwicklung auftritt. Die Umsetzung zu Sorbinsäurechlorid wird während der Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt. Vor Beginn der Trennung wird eine mit Glasdeckel verschließbare Trennkammer mit 100 ml der mobilen Phase (Ethylacetat/Diethylether (50/50; v/v)) befüllt und bis zur Kammersättigung konditioniert. Das synthetisierte Sorbinsäurechlorid und Sorbinsäure (Referenz) werden in THF gelöst, auf eine DC-Platte (Kieselgel 60 F254, 5 × 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm) aufgetragen und getrocknet. Die Platte wird in die DC-Kammer gestellt und bis zu einer Laufstrecke von ca. 10 cm entwickelt.

Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Argonzufuhr ist die Sorbinsäure vollständig zu ihrem Säurechlorid umgesetzt, sodass das überschüssige Thionylchlorid und das THF mit Stickstoff abgeblasen werden können. Es verbleibt ein orangefarbenes Öl, mit dem weiter gearbeitet wird.

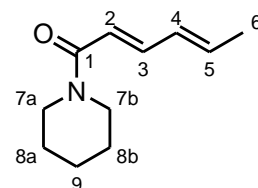
Synthetisiertes Sorbinsäurechlorid (4 mmol; 520 mg) wird in 5 ml THF gelöst und nach langsamer Zugabe (innerhalb von 30 Minuten) von Piperidin (4,5 mmol; gelöst in 1 ml THF) oder Pyrrolidin (4,5 mmol; gelöst in 1 ml THF) 2 Stunden bei 61 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz quantitativ in Dichlormethan (200 ml) aufgenommen, mit Wasser (3 × 200 ml), HCl (0,5 N; 200 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (200 ml) gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und im Vakuum aufkonzentriert (5 ml). Nach dem Einengen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wird der gelbe Rückstand in Ethylacetat/Ether (5 ml; 50/50; v/v) gelöst und bei -18 °C umkristallisiert. Dabei bilden sich die Zwischenprodukte 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin beziehungsweise 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin als weiße Kristallnadeln, die abfiltriert und unter Stickstoffstrom getrocknet werden.

1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin: LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 353 (100, [2*M*+Na]<sup>+</sup>), 188 (82, [M+Na]<sup>+</sup>), 166 (60, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY): δ/ppm: δ 1.72–1.80 [m, 4H, H-C(8a, 8b)]; 1.83–1.92 [m, 2H, H-C(6)]; 3.45–3.49 [t, 4H, H-C(7)]; 6.08–6.15 [m, 1H, *J*=14.5 Hz, H-C(5)]; 6.21–6.29 [m, 1H, *J*=14.5 Hz, H-C(2, 4)]; 6.99–7.06 [dd, 1H, H-C(3)].



(Ausbeute: 73%; 2,92 mmol)

1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin: LC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 381 (100, [2*M*+Na]<sup>+</sup>), 359 (85, [2*M*+H]<sup>+</sup>), 202 (73, [M+Na]<sup>+</sup>), 180 (44, [M+H]<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY): δ/ppm: δ 1.45–1.46 [m, 2H, H-C(9)]; 1.56–1.58 [m, 4H, H-C(8a, 8b)]; 1.78 [d, 3H, H-C(6)]; 3.30 [t, 4H, H-C(7)]; 6.05–6.11 [m, 1H, *J*=14.3 Hz, H-C(5)]; 6.23–6.29 [m, 1H, H-C(4)]; 6.47–6.51 [d, 1H, *J*=14.3 Hz, H-C(2)]; 6.99–7.06 [dd, 1H, H-C(3)].



(Ausbeute: 69%; 2,76 mmol)

1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-piperidin (232,13 mg, 1,29 mmol) beziehungsweise 1-[(2*E*,4*E*)-Hexadienoyl]-pyrrolidin (277 mg, 1,7 mmol), Piperonal (212 mg, 1,5 mmol) und Kaliumcarbonat (55,4 mg) werden in Toluol (35 ml) suspendiert. Unter Argonatmosphäre wird tropfenweise der Katalysator Aliquat 336 (2 ml) und Natriumhydrid (11,08 mg) zugegeben und die Suspension wird 6 Stunden unter Rückfluss und Argonstrom auf 90 °C erhitzt. Anschließend wird die Reaktionsmischung in Eiswasser überführt und mit Dichlormethan (3 × 200 ml) extrahiert.

Die Vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und säulenchromatographisch aufgereinigt, indem er auf eine mit Hexan/Ethylacetat (1/9, v/v) konditionierte Kieselgelsäule aufgegeben und mit dem gleichen Fließmittel eluiert wird. Die Elution erfolgt isokratisch mit dem gleichen Fließmittel. Zur Lokalisierung der Zielverbindung werden Aliquote der Eluate im Stickstoffstrom eingeengt und mit Methanol wieder aufgenommen. Diese Lösungen werden mittels RP-HPLC/DAD, wie in 5.7.1.2 (HPLC-System 2) beschrieben, untersucht. Das orangefarbene Produkt wird über eine RP18-Kartusche (1000 mg/6 ml) rechromatographiert. Das Rohprodukt wird in einem MeOH/H<sub>2</sub>O-Gemisch (70/30, v/v, 5 ml) gelöst und auf die mit MeOH (20 ml) und MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30, v/v, 30 ml) vorkonditionierte Kartusche gegeben. Die Elution erfolgt isokratisch in 8 Elutionsschritten (20 ml) mit dem gleichen Fließmittel. Das Produkt wird mit den Fraktionen 4 und 5 eluiert. Durch Vereinigung dieser Fraktionen und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das jeweilige hellgelbe Produkt (Piperolein oder Piperettin) als Feststoff erhalten.

*Piperolein*: (Spektroskopische Daten vgl. 5.3.2.3) (Ausbeute: 89%; 1,52 mmol)

*Piperettin*: (Spektroskopische Daten vgl. 5.3.2.3) (Ausbeute: 59%; 0,76 mmol)

## **5.5 Qualitative und quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe des Spargels und Pfeffers**

### **5.5.1 Quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe des Spargels**

#### **5.5.1.1.1 Quantitative Bestimmung der Kationen im Spargel**

Für die quantitative Bestimmung von bitter schmeckendem Kalium in rohem und gekochtem weißen Spargel sowie im Kochwasser wird die Leitfähigkeitsdetektion mit regenerierender Supressortechnik (s. 5.7.1.3) unter den folgenden chromatographischen Bedingungen verwendet:

Stationäre Phase:	Dionex IonPac CS18 (250 × 2 mm; Dionex, Idstein)
Vorsäule:	Dionex IonPac CG18 (50 × 2 mm; Dionex, Idstein)
Flussrate:	0,25 ml/min
Detektion:	Leitfähigkeitsdetektor mit selbstregenerierender Suppressorzelle (Dionex CSRS 300, 2 mm, AutoSuppression Recycle Mode), Suppressorstrom 4 mA, Data Collection Rate 5,0 Hz
Injektionsvolumen:	2 µl
Temperatur:	30 °C
Mobile Phase:	Methansulfonsäure (5 mM)
Laufzeit:	30 min
Gradient:	isokratisch

*Probenaufarbeitung für die ionenchromatographischen Bestimmungen:*

10 g homogener roher oder gekochter weißer Spargel werden mit Methanol (50 ml), Methanol/Wasser (70/30, v/v, 3 × 50 ml) und abschließend mit Wasser (50 ml) extrahiert. Der Extrakt wird durch einen Faltenfilter filtriert und das Lösungsmittel wird mittels Vakuumrotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml verdünnt. Zur Quantifizierung wird jeweils ein Aliquot der Stammlösungen membranfiltriert in Vials abgefüllt und gegen externe Standards vermessen. Frisch hergestelltes Spargelkochwasser wird membranfiltriert und direkt zur Analyse eingesetzt. Für die externen 6-Punkt-Kalibrationen werden Standardlösungen in Konzentrationsbereichen von 0,5 bis 100 mg/l verwendet.

#### 5.5.1.1.2 Qualitative und quantitative Bestimmung der Saponine im Spargel

Die Qualifizierung und Quantifizierung der Spargelsaponine erfolgt mit dem LC-MS-System 1 im negativen MRM-Modus (ESI<sup>-</sup>) und bei der quantitativen Analytik mit interner Standardkalibration (vgl. 5.8.2). Als interne Standards dienen die Ginsengsaponine Ginsenosid R<sub>c</sub>, Ginsenosid R<sub>g1</sub> und Ginsenosid R<sub>g2</sub>.

*Interne Standards / Kalibration:* Es werden 11,18 mg/50 ml Ginsenosid R<sub>g1</sub> (**18**), 14,4 mg/50 ml Ginsenosid R<sub>g2</sub> (**19**) und 12,42 mg/50 ml Ginsenosid R<sub>c</sub> (**20**) als interne Standards in Methanol hergestellt. Zur Kalibration werden die internen Standards mit den Analyten in Konzentrationsverhältnissen von 0,2 bis 5 gemischt und mittels HPLC-MS/MS

analysiert. Kalibrationsgeraden werden durch Auftragen der Flächenverhältnisse (Area Analyt/Area interner Standard) gegen die Konzentrationsverhältnisse ( $c$  Analyt/ $c$  interner Standard) erhalten.

*Probenvorbereitung:* Rohe und gekochte Spargelstangen (längs halbiert und getrennt voneinander aufgearbeitet) sowie Jungpflanzen werden in ca. 2 cm große Stücke zerteilt und mit einer Retsch-Labormühle homogenisiert (3 min; 5000 rpm). 10 g des Homogenates werden eingewogen, mit 500  $\mu$ l der internen Standards und mit 100 ml Methanol versetzt und anschließend 30 Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur equilibriert. Das jeweilige dotierte Homogenat wird filtriert, der Rückstand wird drei weitere Male mit je 100 ml Methanol in gleicher Weise extrahiert. Die so gewonnenen, vereinigten Methanolextrakte werden am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt und auf 100 ml aufgefüllt, sodass 5  $\mu$ l davon unverzüglich in die Masse injiziert werden.

Das Kochwasser von 500 g rohem Spargel wird mit Milliporewasser auf 1,5 l aufgefüllt. Davon werden 100 ml Kochwasser mit 500  $\mu$ l internem Standard dotiert und nach einer Equilibrierungszeit von 30 Minuten werden davon 5  $\mu$ l in das LC-MS/MS-System injiziert.

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Probenvorbereitung zu untersuchen, wird analog zu der beschriebenen Probenvorbereitung, roher Spargel einmal nach der Equilibrierungszeit, anstelle von reinem Methanol, dreimal mit einem Gemisch aus Methanol/Wasser (100 ml, 70/30, v/v) extrahiert.

Zur Analyse des Saatgutes werden 1 g Samen in einer Schlagkreuzmühle fein gemahlen (Analysenmühle A10, IKA Labortechnik, Staufen) und sowohl mit 100  $\mu$ l der internen Standards als auch mit 50 ml Methanol versetzt und 30 Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur equilibriert. Das jeweilige dotierte Homogenat wird filtriert, der Rückstand wird drei weitere Male mit je 50 ml Methanol in gleicher Weise extrahiert. Die so gewonnenen, vereinigten Methanolextrakte werden am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt und auf 20 ml aufgefüllt. Davon werden 5  $\mu$ l unverzüglich in die Masse injiziert.

Zur Analyse der vertikalen Saponinverteilung des weißen ungeschälten Spargels, werden rohe Stangen mit einem Messer in vier Abschnitte (Teilstück A–D) geteilt. Teilstück A stellt die Spargelspitze (1 cm) dar, während die Teilstücke B bis D (je 6 cm) alphabetisch bis zum Spargelende gekennzeichnet sind (vgl. Abbildung 49). Alle vier Segmente werden getrennt voneinander analog zu den oben aufgeführten ganzen Spargelstangen aufgearbeitet.

Zur Analyse der horizontalen Saponinverteilung des weißen ungeschälten Spargels, werden rohe Stangen von außen nach innen mit einem Spargelschäler zerteilt (vgl. Abbildung 50),

sodass alle drei Segmente getrennt voneinander analog zu den oben aufgeführten ganzen Spargelstangen aufgearbeitet werden können.

Um die Anwesenheit der identifizierten Saponine in weißen Spargelstangen, Samen und Jungpflanzen zu überprüfen werden die einzelnen Matrices, wie oben aufgeführt aufgearbeitet. Einzig der Gebrauch von Methanol wird gegen Acetonitril ausgetauscht.

Chromatographische Bedingungen:

Stationäre Phase:	Zorbax Eclipse XDB-C 18 (150 × 2,1 mm i.d, 5 µ; Agilent, Waldbronn)
Flussrate:	0,25 ml/min
Detektion:	MRM
Ionisierung:	ESI <sup>-</sup>
Injektionsvolumen:	5 µl
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril B: 0,1% Ameisensäure aq
Gradient:	95% B, isokratisch (5 min), innerhalb von 5 min auf 75% B, in 15 min auf 70% B, in weiteren 5 min auf 0% B, isokratisch (8 min), innerhalb von 4 min auf 95% B, isokratisch (8 min)

**Tabelle 14: Zur Massenchromatographie ausgewählte Ionen (*m/z*) der internen Standards und Analyten sowie deren ermittelte Responsefaktoren (*R<sub>f</sub>*) und Retentionszeiten (*R<sub>t</sub>*) für die quantitative Analyse der Spargelsaponine.**

Analyt bzw. Standard (Nr.)	Massenübergang	<i>R<sub>t</sub></i> / <i>R<sub>f</sub></i> [Standard] <sup>a</sup>	DP [V] <sup>b</sup>	CE [V] <sup>c</sup>	CXP [V] <sup>d</sup>
3-O-[α-L-Rhamnosypyranosyl-(1→2)-{α-L-rhamno-pyranosyl-(1→4)}-β-D-glucopyranosyl]-26-O-[β-D-glucopyranosyl]-(25 <i>R/S</i> )-22-hydroxyfurost-5-ene-3β,26-diol ( <b>5a/b</b> )	1047,5 → 901,6 <sup>ql/qn</sup>	18,04/2,59 <sup>e</sup> [ <b>19</b> ]	-180	-60	-25
3-O-[α-L-Rhamnosypyranosyl-(1→2)-{α-L-rhamno-pyranosyl-(1→4)}-β-D-glucopyranosyl]-26-O-[β-D-glucopyranosyl]-(25 <i>R</i> )-22-methoxyxyfurost-5-ene-3β,26-diol ( <b>16</b> )	1061,6 → 915,4 <sup>ql</sup> 1061,6 → 59,0 <sup>qn</sup>	23,33 23,33/2,59 <sup>e</sup> [ <b>19</b> ]	-170 -165	-60 -130	-15 -1

(25 <i>R/S</i> )-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid ( <b>10a/b</b> )	901,6 $\rightarrow$ 755,5 <sup>ql</sup> 901,6 $\rightarrow$ 59,0 <sup>qn</sup>	19,58 19,58/2,59 <sup>e</sup> [ <b>19</b> ]	-190 -185	-52 -130	-21 -7
(25 <i>R/S</i> )-Furostan-3 $\beta$ ,22,26-triol-3- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosid ( <b>13a/b</b> )	903,5 $\rightarrow$ 757,4 <sup>ql</sup> 903,5 $\rightarrow$ 59,0 <sup>qn</sup>	20,65 20,65/2,59 <sup>e</sup> [ <b>19</b> ]	-170 -180	-62 -26	-51 -3
3- <i>O</i> -[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (25 <i>S</i> )-spirost-5-en-3 $\beta$ -ol ( <b>14a/b</b> )	867,5 $\rightarrow$ 721,4 <sup>ql</sup> 867,5 $\rightarrow$ 59,0 <sup>qn</sup>	31,18 31,18/0,57 <sup>f</sup> [ <b>20</b> ]	-200 -160	-46 -110	-43 -1
3- <i>O</i> -[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- (25 <i>S</i> )-5 $\beta$ -spirostan-3 $\beta$ -ol ( <b>15</b> )	871,5 $\rightarrow$ 739,6 <sup>ql/qn</sup>	30,93/0,56 <sup>g</sup> [ <b>21</b> ]	-195	-52	-11
$\beta$ -Sitosterol-3- <i>O</i> -glucosid ( <b>17</b> )	575,3 $\rightarrow$ 59,0 <sup>ql/qn</sup>	32,5/0,56 <sup>g</sup> [ <b>21</b> ]	-105	-74	-1
Ginsenosid Rg1 ( <b>18</b> )	799,6 $\rightarrow$ 637,5 <sup>ql</sup> 799,6 $\rightarrow$ 89,0 <sup>qn</sup>	17,47 17,47	-180 -200	-36 -50	-31 -5
Ginsenosid Rg2 ( <b>19</b> )	783,5 $\rightarrow$ 475,4 <sup>ql/qn</sup>	28,96	-195	-52	-15
Ginsenosid Rc ( <b>20</b> )	1077,6 $\rightarrow$ 783,6 <sup>ql/qn</sup>	29,23	-175	-64	-39

<sup>a</sup> quantifiziert über den [Standard]; <sup>b</sup> Declustering Potential; <sup>c</sup> Collision Energy; <sup>d</sup> Cell Exit Potential; <sup>e</sup> quantifiziert über den Rf von **5a/b**; <sup>f</sup> quantifiziert über den Rf von **12a/b**; <sup>g</sup> quantifiziert über den Rf von **13**; <sup>ql</sup> Qualifier; <sup>qn</sup> Quantifier.

### 5.5.2 Quantitative Bestimmung der sensorisch aktiven Inhaltsstoffe des Pfeffers

Zur Quantifizierung der scharf und tingling wirkenden Säureamide in diversen Pfefferdrogen wird das LC-MS-System 2 (5.8.2) und eine externe Kalibration verwendet. Das Massenspektrometer wird dabei im positiven MRM-Mode unter Verwendung der ESI-Quelle betrieben.

*Externe Standards / Kalibration:* Zur Kalibration werden die Säureamide **21**, **22**, **23**, **26**, **27**, **29**, **30**, **31**, **33a/b**, **36** und **38a/b** als externer Standard in Konzentrationen von 0,5 mg/ml bis 0,5 µg/ml mittels HPLC-MS/MS analysiert.

*Probenvorbereitung:* Ganze Pfefferkörner werden zunächst in der Schlagkreuzmühle fein gemahlen (Analysenmühle A10, IKA Labortechnik, Staufen). Nachdem von den jeweiligen Pulvern exakt 1 g eingewogen sind, wird der gemahlene Pfeffer einmal mit 100 ml und siebenmal mit 50 ml Ethanol im Ultraschallbad für 10 Minuten extrahiert. Die überstehenden Lösungen werden jeweils abdekantiert und zur Aufreinigung durch einen Faltenfilter filtriert. Das Lösungsmittel des vereinigten Filtrates wird mittels Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 35 °C eingengt, auf 100 ml aufgefüllt und unverzüglich in die Masse injiziert.

**Tabelle 15.** Zur Massenchromatographie ausgewählte Ionen ( $m/z$ ) und deren optimierte Bedingungen für die quantitative Analyse der Pfefferinhaltsstoffe.

Geschmacksstoff (Nr.)	Massenübergang [Standard] <sup>a</sup>	Retentionszeit [min]	DP [V] <sup>b</sup>	CE [V] <sup>c</sup>	CXP [V] <sup>d</sup>
Piperlonguminin ( <b>22</b> )	274,1 → 135,2 [22]	2,60	46	31	32
Piperylin ( <b>23</b> )	272,1 → 114,9 [23]	2,34	56	55	26
Piperin ( <b>21</b> )	286,1 → 114,8 [21]	2,92	46	30 <sup>e</sup>	26
Piperolein <sup>f</sup> ( <b>24</b> )	298,2 → 226,8 [21]	3,20	96	23	20
Piperettin ( <b>25</b> )	312,2 → 226,8 [26]	3,99	96	23	20
Retrofractamid A ( <b>26</b> )	328,2 → 102,9 [26]	3,98	56	57	18
1-[1-oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2E,4E,8E-nonatrienyl]-pyrrolidine ( <b>27</b> )	326,2 → 131,0 [27]	3,70	56	39	22
Dehydropiperonalin ( <b>28</b> )	340,2 → 112,1 [29]	4,90	76	37	28
Piperonalin ( <b>29</b> )	342,2 → 135,0 [29]	5,77	66	39	22



Piperolein B ( <b>30</b> )	344,2 → 135,1 [ <b>30</b> ]	5,66	91	43	22
Guineensin ( <b>31</b> )	384,3 → 135,1 [ <b>31</b> ]	11,22	126	43	26
Brachyamid A ( <b>32</b> )	382,2 → 135,1 [ <b>31</b> ]	10,43	71	41	26
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> )- <i>N</i> -Isobutyloctadeca-2,4,12/13-trienamid ( <b>33a/b</b> )	334,4 → 55,1 [ <b>33</b> ]	18,78	131	55	30
1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> -trienoyl)-pyrrolidin ( <b>34a/b</b> )	332,4 → 55,0 [ <b>33</b> ]	18,97	96	59	22
1-(Octadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12/13 <i>Z</i> -trienoyl)-piperidin ( <b>35a/b</b> )	346,3 → 81,0 [ <b>33</b> ]	20,70	116	47	26
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- <i>N</i> -Isobutyloctadeca-2,4-dienamid ( <b>36</b> )	336,3 → 57,1 [ <b>36</b> ]	21,26	136	47	30
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> )- <i>N</i> -Isobutyleicosa-2,4,14/15-trienamid ( <b>37a/b</b> )	362,4 → 55,1 [ <b>38</b> ]	21,56	106	63	24
1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> -trienoyl)-pyrrolidin ( <b>38a/b</b> )	360,4 → 69,1 [ <b>38</b> ]	22,59	101	47	24
1-(Eicosa-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14/15 <i>Z</i> -trienoyl)-piperidin ( <b>39a/b</b> )	374,4 → 69,2 [ <b>38</b> ]	24,32	141	53	36

<sup>a</sup> quantifiziert über den [Standard]; <sup>b</sup> Declustering Potential; <sup>c</sup> Collision Energy; <sup>d</sup> Cell Exit Potential; <sup>e</sup> wurde von 61 auf 30 manuell verändert; <sup>f</sup> die Parameter wurden manuell denen von Piperettin angeglichen.

#### Chromatographische Bedingungen:

Stationäre Phase:	Luna C18 (150 × 2,0 mm i.d., 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule:	RP-18 (4 × 4 mm, 5 µm i.d., Phenomenex, Aschaffenburg)
Ionisierung:	ESI
Polarität:	Positiv
Flussrate:	0,25 ml/min
Detektion:	MRM
Injektionsvolumen:	5 µl
Mobile Phase:	A: 0,1% Ameisensäure in Methanol B: 0,1% Ameisensäure aq
Gradient:	70% A, 5 min isokratisch, innerhalb von 10 min auf 100% A, isokratisch (7 min), in weiteren 3 min auf 70% A, isokratisch (5 min)

## 5.6 Psychophysikalische Studien

Die humansensorischen Analysen werden von acht bis zwölf sensorisch trainierten Mitgliedern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der TUM verrichtet. Die Sensoriken werden dazu jeweils in einem Sensorikraum bei 20 bis 25 °C in drei verschiedenen Durchgängen durchgeführt. Um nasale und retronasale Aromaeindrücke zu verhindern, werden alle sensorischen Untersuchungen mit handelsüblichen Nasenklammern durchgeführt. Um die Beeinflussung durch gefärbte Lösungen bei der sensorischen Bewertung von grünem oder schwarzem Pfeffer zu verhindern, werden die Sensoriken bei Grünlicht durchgeführt. Das Wasser für die sensorischen Überprüfungen ist kommerziell erhältliches Mineralwasser (Evian®), welches mit 0,1% Ameisensäure auf einen pH-Wert von 5,9 eingestellt wird. Zur Schärfeneutralisation werden dem Panel Brötchen und eine Saccharoselösung (3% Saccharose in Evian®) zur Verfügung gestellt. Vor der sensorischen Analyse wird die Reinheit aller isolierten Verbindungen mittels HPLC/MS sowie durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie überprüft. Alle Tests werden in Reihenfolge steigender Konzentrationen verkostet. Die adstringierenden und buttrig-belegenden Geschmacksstoffe werden mittels „Half-Mouth“-Methode, die scharf und tingling Substanzen werden mittels „Half-Mouth“-Filterpapiermethode charakterisiert, alle anderen Geschmacksrichtungen werden im Triangeltest evaluiert.

Die Panelisten wurden regelmäßig mit den folgenden Referenzsubstanzen und Fraktionen geschult:

**Tabelle 16: Eingesetzte Matrices, Verbindungen und Konzentrationen zur Schulung des Sensorik-Panels.**

Geschmacksqualität	Verbindung/Extrakt	Matrix	Konzentration
süß	Saccharose	Evian®	20 mmol/l
sauer	Milchsäure	Evian®	20 mmol/l
salzig	Natriumchlorid	Evian®	12 mmol/l
bitter	Coffein	Evian®	1 mmol/l
umami	Natriumglutamat	Evian® (pH 5,7)	6 mmol/l
samtig-adstringierend	Quercetin-3-O-β-D-glucopyranosid	Evian®	0,001 mmol/l
rauh-adstringierend	Tannin	Evian®	0,05%
buttrig-belegend	Asparagussäureglucosid	Evian®	2 mmol/l
scharf	Piperin	Filterpapier	20 µg

		(1 × 2 cm)	
scharf	Capsaicin	Filterpapier	3 µg
		(1 × 2 cm)	
tingling	Szechuanpfeffer (CO <sub>2</sub> -Extrakt)	Filterpapier	40 µg
		(1 × 2 cm)	

## 5.6.1 Sensorische Analysen des Spargels

### 5.6.1.1 Profilsensorik

*Presssaft:* Zur Bestimmung der Geschmacksprofile des rohen und gekochten weißen Spargels werden 1 kg geschälte Grolim-Spargelstangen (22 cm) längs halbiert und roh beziehungsweise gekocht (s. 5.8.6.4) weiterverarbeitet. Dazu werden je 500 g Spargelstangen mit einem Hackbeil in ca. 2 cm große Stücke zerteilt und mit einer Retsch-Labormühle homogenisiert (3 Minuten; 5000 rpm). Die Flüssigkeit der Spargelmasse wird über eine Nutsche abgesaugt, der erhaltene Presssaft wird direkt zur sensorischen Analyse eingesetzt. Anschließend werden die Proben einem geschulten Panel von zwölf Personen zur sensorischen Beurteilung bereitgestellt. Die Intensität der jeweiligen Geschmacksrichtungen wird von dem Sensorikpanel auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet.

*Methanolextraktlyophilisat:* Die Methanolextrakte aus 5.2.1.1 des rohen und gekochten Spargels werden mit mineralstoffarmem Wasser (Evian<sup>®</sup>, pH 5,9) auf ihre natürlichen Ausgangskonzentrationen im Spargel rückverdünnt. Anschließend werden die Extrakte einem geschulten Sensorikpanel bereitgestellt, das die Geschmacksrichtungen s. Tabelle 16 auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) vergleichend zu den Profilen der Presssäfte bewertet. Die Bewertungen der einzelnen Prüfer werden gemittelt und als Ergebnis angegeben.

### 5.6.1.2 Sensorische Analyse von Lösungsmittelextrakten

Zur Erstellung der Geschmacksprofile der einzelnen Extrakte (Fraktionen I–IV) wird das jeweilige Extraktlyophilisat (s. 5.2.1.3) des rohen wie auch des gekochten Spargels mit mineralstoffarmem Wasser (Evian<sup>®</sup>, pH 5,9) auf die natürlichen Konzentrationen im Spargel rückverdünnt. Anschließend werden die Proben einem geschulten Panel von zwölf Personen zur

sensorischen Beurteilung bereitgestellt. Die Intensitäten der jeweiligen Geschmacksrichtungen werden vergleichend zueinander von dem Sensorikpanel auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet. Die Methanol/Wasser-Extrakte des rohen und gekochten Bleichspargels dienen als Referenz. Die Bewertungen der einzelnen Prüfer werden gemittelt und das Ergebnis wird durch Errechnen des Konfidenzintervalles ( $p = 95\%$ ) charakterisiert.

#### 5.6.1.3 Vertikale Bitterverteilung der Spargelstangen

Der weiße, frische und gewaschene Spargel der Sorte Grolim wird mit einer HSM-U-Schälmaschine der Firma HEPRO automatisiert geschält. Anschließend werden die Spargelstangen mit einem Messer in vier Abschnitte (Teilstück A–D) geteilt. Teilstück A stellt die Spargelspitze (1 cm) dar, während die Teilstücke B bis D (je 6 cm) alphabetisch bis zum Spargelende gekennzeichnet sind (vgl. Abbildung 49). Die Bewertung der Bittere der Teilstücke erfolgt vergleichend zueinander auf einer Skala von 0–5 (0 = nicht wahrnehmbar, 5 = stark wahrnehmbar). Die Bewertungen der einzelnen Prüfer werden gemittelt und das Ergebnis wird durch Berechnung des Konfidenzintervalles ( $P = 95\%$ ) charakterisiert.

#### 5.6.1.4 Horizontale Bitterverteilung der Spargelstangen

In einem weiteren sensorischen Experiment werden die vier Teilstücke des ungeschälten rohen Spargels von außen nach innen mit einem Spargelschäler zerteilt (vgl. Abbildung 50) und sensorisch von einem geschulten Sensorikpanel beurteilt. Die Bewertung der Bittere der Teilstücke erfolgt vergleichend zueinander auf einer Skala von 0–5 (0 = nicht wahrnehmbar, 5 = stark wahrnehmbar). Die Bewertungen der einzelnen Prüfer werden gemittelt und das Ergebnis wird durch Berechnung des Konfidenzintervalles ( $P = 95\%$ ) charakterisiert.

#### 5.6.1.5 Schwellenwertbestimmung

Zur Bestimmung des Detektionsschwellenwertes einzelner Komponenten wird in Anlehnung an die in der Literatur beschriebene Vorgehensweise entweder ein Duotest, ein Triangeltest (Wieser und Belitz, 1975; ASU: L 00.90-7, 1996; Schlichterle-Cerny und Grosch, 1998) oder ein „Half-Mouth“-Test (Scharbert und Hofmann, 2004) herangezogen. Als Detektionsschwellenwert wird die Verdünnung bezeichnet, bei der gerade noch ein Unterschied zu einem Blindwert wahrnehmbar ist. Insbesondere für adstringierende Substanzen hat sich der „Half-

Mouth“-Test als geeignet erwiesen, da der Geschmackseindruck adstringierender Komponenten im Triangeltest oftmals lange anhält und teilweise durch Nachspülen mit Wasser verstärkt wird.

#### 5.6.1.6 Triangeltest

Die Lösung eines Geschmacksstoffes mit bekannter Konzentration wird sukzessiv in einer Verdünnungsreihe in 1:1 Schritten mit 10 ml Evian® (pH 5,9) in Reagenzgläsern verdünnt. Die Verdünnungen werden zwölf sensorisch geschulten Personen in der Reihenfolge aufsteigender Konzentration zur Verkostung bereitgestellt. Dabei wird der Geschmack in einem vergleichenden Test gegen zwei Blindwerte (Evian®; pH 5,9) beurteilt. Die Verdünnungsstufe, bei der ein Unterschied zu dem Blindwert feststellbar ist, wird als Geschmacksschwellenwert bezeichnet. Der Schwellenwert berechnet sich wie folgt über das geometrische Mittel (ASU: L 00.90-9, 1999):

##### Für eine Prüfperson

$$E = \sqrt{C_e \times C_{e-1}}$$

$C_e$  : Geometrischer Mittelwert der Konzentration der ersten richtig erkannten Verdünnungsstufe

$C_{e-1}$  : geometrischer Mittelwert der Konzentration der vorangegangenen Probenlösung

##### Für das Sensorikpanel

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

$n$  : Anzahl der Prüfpersonen

$E_i$  : Erkennungsschwelle der einzelnen Prüfpersonen

#### 5.6.1.7 „Half-Mouth“-Test

Im „Half-Mouth“-Test (Scharbert et al., 2004) werden die in einem Duotest ermittelten Verdünnungsstufen in Reihenfolge ansteigender Konzentration gegen einen entsprechend verdünnten Blindwert beurteilt. Die zu beurteilenden Substanzen werden in 10 ml Evian® gelöst, sukzessiv 1:1 verdünnt und in Reihenfolge steigender Konzentration dem Panel zur Beurteilung dargereicht. Hierbei wird die Zunge zur Hälfte mit der zu bewertenden Lösung und zur Hälfte mit dem Blindwert benetzt und dann 10 Sekunden am Gaumen gerieben. Die geschmacklichen Empfindungen auf den jeweiligen Seiten des Mundraumes werden dann hin-

sichtlich der Adstringenz oder buttrigen Mundfülle beurteilt. Nach jedem Probenpaar wird der Mund gründlich mit Evian® gespült und 10 Minuten gewartet, bis sich der Geschmackseindruck abgebaut hat, um dann die nächst höhere Verdünnungsstufe zu beurteilen. Die gleiche Konzentration wird in fünffacher Wiederholung verkostet. Wird kein geschmacklicher Unterschied festgestellt, wird mit der nächst höheren Konzentration fortgefahren, bis eine Wahrnehmung erfolgt. Der „Half-Mouth“-Test wird von jedem Panelisten an drei verschiedenen Tagen wiederholt.

#### 5.6.1.8 Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA)

Zur Abtrennung der geschmacksaktiven Substanzen von den weniger oder nicht geschmacksaktiven Verbindungen wird die von Frank et al. (2001) entwickelte Geschmacksverdünnungsanalyse verwendet. Die aus den HPLC-Auftrennungen erhaltenen, lyophilisierten Fraktionen werden jeweils mit dem gleichen Volumen Evian® (pH 5,9) gelöst und anschließend sukzessiv 1:1 verdünnt. Die Verdünnungen werden zwölf sensorisch geschulten Personen in der Reihenfolge aufsteigender Konzentration zur Verkostung bereitgestellt. Dabei wird jede Fraktion in einem vergleichenden Duotest gegen einen Blindwert beurteilt. Die Verdünnungsstufe, bei der ein Geschmacksunterschied zwischen der verdünnten Fraktion und einem Blindwert gerade noch wahrnehmbar ist, wird definitionsgemäß als Geschmacksverdünnungs-(GV) Faktor bezeichnet. Der GV-Faktor wird bei der Verdünnung angesetzt, bei der eine Differenzierung von den Blindwerten von allen Probanden festgestellt wird. Damit mit dieser Methode auch die adstringierenden Substanzen lokalisiert werden können, wird die „Half-Mouth“-Methode (s. 5.6.1.7) verwendet.

### 5.6.2 Sensorische Analyse des Pfeffers

#### 5.6.2.1 Filterpapiersensorik

Die zu untersuchenden scharfen oder tingelnden Verbindungen beziehungsweise Extrakte werden in Ethanol gelöst und vollständig mit Hilfe einer Pipette auf ein Filterpapier definierter Größe aufgebracht. Dabei ist zu beachten, dass die Lösungen nur auf eine Seite des Filterpapierstreifens nacheinander (je 50 µl) aufgebracht und getrocknet werden, sodass sich die Scharf/Tinglingstoffe direkt und vollständig auf der Oberfläche des Papiers befinden. Die

beträufelten Papierstreifen werden anschließend bei 38 °C im Trockenschrank getrocknet, bis nach ca. 4 Minuten der Ethanol vollständig verdampft ist. Dann werden sie einem geschulten Sensorikpanel bereitgestellt.

#### 5.6.2.2 Sensorische Untersuchungen verschiedener Pfeffersorten

Die Geschmacksprofile von Cubebenpfeffer (*Piper cubeba* L.), weißem Pfeffer (*Piper nigrum* L.), grünem Pfeffer (*Piper nigrum* L.) und langem Pfeffer (*Piper longum* L.) werden vergleichend zu dem des schwarzen Pfeffers (*Piper nigrum* L.) auf Filterpapierstreifen aufgenommen. Dazu wird jeweils der Ethanolextrakt einer Pfeffersorte (umgerechnet auf 15 mg Pfefferpulver) in 250 µl Ethanol gelöst und auf einen Filterpapierstreifen aufgebracht. Die Filterpapiere werden zwölf sensorisch geschulten Personen zur Verkostung bereitgestellt. Jede sensorische Empfindung (scharf, tingling, bitter) wird von dem Panel auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) gegen den schwarzen Pfeffer als Referenz (scharf = 5 und tingling = 0,4) bewertet. Die Bewertungen der einzelnen Prüfer werden gemittelt, angegeben und das Ergebnis wird durch Berechnung des Konfidenzintervalles (P = 95%) charakterisiert.

#### 5.6.2.3 Sensorischer Vergleich von Piperin mit dem schwarzen Pfefferextrakt

Um die Schärfe von Piperin mit der des schwarzen Pfefferextraktes vergleichen zu können, werden 30,4 mg des schwarzen Pfefferextraktes (aus 5.2.2.1) in 100 ml Ethanol gelöst. Hier von wird ein 10 ml Aliquot entnommen und in einem Messkolben mit Ethanol auf 100 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wird jeweils 1 ml (30,4 µg Pfefferextrakt), wie in 5.6.2.1 beschrieben, auf einen Filterpapierstreifen aufgetragen und getrocknet. Auf die gleiche Weise wird auf ein weiteres Filterpapier 14,85 µg reines Piperin aufgetragen. Dabei entsprechen 14,85 µg Piperin dem Gehalt an Piperin in 30,4 µg schwarzem Pfefferextrakt. Als Blindwert werden Filterpapiere mit 1 ml Ethanol beträufelt und ebenfalls im Trockenschrank getrocknet.

Die Filterpapiere werden zwölf sensorisch geschulten Personen zur Verkostung bereitgestellt, die die Schärfe auf einer numerischen Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) gegeneinander ranken. Die Bewertungen der einzelnen Prüfer werden gemittelt und das Ergebnis wird durch Berechnung des Konfidenzintervalles (P = 95%) charakterisiert.

#### 5.6.2.4 Geschmacksverdünnungsanalyse des Pfeffers

Zur Abtrennung der geschmacksaktiven Substanzen von den weniger oder nicht geschmacksaktiven Verbindungen wird die von Frank et al. (2001) entwickelte GVA verwendet. Die aus der HPLC-Auftrennung erhaltenen, lyophilisierten Fraktionen aus 5.3.2.1 werden jeweils mit dem gleichen Volumen Ethanol gelöst und anschließend sukzessiv 1:1 verdünnt. Von den Verdünnungsschritten werden jeweils 50 µl auf ein Filterpapier (1 × 2 cm) pipettiert und die Filterpapiere werden bei 38 °C im Trockenschrank getrocknet (ca. 4 min) (s. 5.6.2.1). Als Blindwert werden Filterpapiere mit 50 µl Ethanol beträufelt und ebenfalls im Trockenschrank getrocknet.

Die Verdünnungen werden zwölf sensorisch geschulten Personen in der Reihenfolge aufsteigender Konzentration zur Verkostung bereitgestellt. Dabei wird jede Fraktion in einem vergleichenden Duotest gegen einen Blindwert beurteilt. Die Verdünnungsstufe, bei der ein Geschmacksunterschied zwischen der verdünnten Fraktion und einem Blindwert gerade noch wahrnehmbar ist, wird definitionsgemäß als GV-Faktor bezeichnet. Der GV-Faktor wird bei der Verdünnung angesetzt, bei der eine Differenzierung von den Blindwerten von allen Probanden festgestellt wird.

#### 5.6.2.5 Schwellenwertbestimmung

Von den isolierten und synthetisierten Säureamiden werden zur Bestimmung der Detektionsschwellenwerte ethanolische Lösungen bekannter Konzentration hergestellt. Diese werden schrittweise 1:1 mit Ethanol verdünnt und auf Filterpapiere (1 × 2 cm) aufgeträufelt und im Trockenschrank bei 38 °C getrocknet (ca. 4 min). Die einzelnen Verdünnungsstufen werden zufällig angeordnet einem geschulten Panel in Reihenfolge aufsteigender Konzentration gegen einen Blindwert (Filterpapiere, auf die die adäquate Menge an Ethanol aufgezogen wird) dargereicht. Alle Sensorikteilnehmer werden gebeten, einen Filterpapierstreifen auf den linken Teil der Zunge zu legen und einen auf den rechten Teil der Zunge zu geben. Nach jedem Probenpaar wird der Mund gründlich mit Saccharoselösung und Wasser gespült und 5 Minuten gewartet, bis sich der sensorische Eindruck abgebaut hat, um dann die nächst höhere Verdünnungsstufe zu beurteilen. Als Detektionsschwellenwert wird diejenige Konzentration bezeichnet, bei der das Sensorikpanel gerade noch die Probe von der Blindprobe unterscheiden kann. Nach einer jeweiligen Pause von 5 Minuten wird die gleiche Konzentration in zweifacher Wiederholung getestet. Die Schwelle berechnet sich abschließend aus dem Mittelwert der Werte, bei denen die einzelnen Prüfer erstmals einen sensorischen Stimuli erkannt haben (vgl. 5.6.1.6).



#### 5.6.2.6 Aufnahme von Dose/Response-Kurven

Zur Evaluierung der Dose/Response-Kurven werden die Reinsubstanzen in Ethanol gelöst und solange sukzessiv 1+1 mit Ethanol verdünnt, bis sie zwei Stufen unterhalb der Schwellenwertkonzentration liegen. Sämtliche Verdünnungsstufen werden auf Filterpapiere (1 × 2 cm) aufgeträufelt und im Trockenschrank bei 38 °C getrocknet (ca. 4 min). Die sensorische Bewertung erfolgt mit Hilfe einer Intensitätsskala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar). In einem ersten sensorischen Experiment werden die Maximalkonzentrationen der jeweiligen Verbindungen mit Hilfe des modifizierten „Half-Mouth“-Tests gegeneinander bewerten. Nach der Verkostung jedes Probenpaares wird der Mund gründlich mit Saccharoselösung und Wasser gespült und 5 Minuten gewartet, bis sich der sensorische Eindruck abgebaut hat, um dann die nächste Verdünnungsstufe zu beurteilen. Damit reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, wird in einem Vorexperiment die Verdünnungsreihe von Piperin evaluiert und als sensorische Referenz verwendet. Die psychophysikalische Wahrnehmung und deren Intensitäten werden für jede Verdünnungsstufe der Stimuli in Reihenfolge steigender Konzentrationen und im Vergleich zur Piperin-Referenzreihe bewertet. Die Bewertungen der einzelnen Prüfer aus drei Sitzungen werden gemittelt und das Ergebnis wird durch Berechnung des Konfidenzintervalles (P = 95%) charakterisiert.

#### 5.6.2.7 Bestimmung der Schwellenwerte auf unterschiedlichen Filterpapiergrößen

Um den Einfluss der Filterpapierdimension auf den Schwellenwert einer Verbindung zu charakterisieren, werden die Schwellenwerte von Piperin auf den Filterpapierstreifen (wie unter 5.6.2.5 beschrieben) der folgenden Größen bestimmt: 0,5 × 0,5 cm, 1 × 1 cm, 1 × 2 cm, 1 × 3 cm, 1 × 4 cm.

#### 5.6.2.8 Dose/Response-Kurven unterschiedlicher Filterpapiergrößen

Zur weiteren Charakterisierung der Filterpapierdimension werden Dose/Response-Kurven von Piperin bei gleichen Konzentrationen pro cm<sup>2</sup> vergleichend zueinander auf den folgenden Filterpapierstreifen aufgenommen: 0,5 × 0,5 cm, 1 × 1 cm, 1 × 2 cm, 1 × 3 cm, 1 × 4 cm.

## 5.7 Chromatographische Methoden

### 5.7.1.1 Saponin-Dünnschichtchromatographie

Saponine können mit Hilfe von dünnschichtchromatographischen Methoden isoliert und detektiert werden. Da Saponine kaum UV-aktiv sind (Hostettmann und Marston, 1995) wird eine postchromatographische Derivatisierung angewendet:

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wird nach Schwarzbach (2004) in einer mit einem Glasdeckel verschließbaren Chromatographiekammer durchgeführt. Vor Beginn der Trennung wird die Trennkammer mit 100 ml der mobilen Phase (Chloroform/Methanol/Wasser; 8/4/1; v/v/v) befüllt und bis zur Kammersättigung konditioniert. Auf die DC-Platten (HPTLC-Platten, Kieselgel 60, 10 × 10 cm) werden sowohl der Gesamtextrakt, einzelne Fraktionen als auch bereits präparativ getrennte Peaks aufgetragen und getrocknet. Die Platten werden in die DC-Kammer gestellt und bis zu einer Laufstrecke von 7–8 cm entwickelt. Zur Detektion wird die getrocknete Platte zunächst mit Anisaldehyd-Reagens besprüht (Methanol / Essigsäure / Schwefelsäure / 4-Methylbenzaldehyd (85/10/5/0,8) (v/v/v/v)) und anschließend bei 110 °C für 10 Minuten im Trockenschrank getrocknet. Saponine erscheinen als grüne Spots, wohingegen polare Substanzen als graue Spots nahe der Startbande und apolare Substanzen blau-violett oberhalb der Saponine erscheinen.

### 5.7.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### HPLC-System 1: HPLC-ELSD-Detektion

Pumpe:	PU-2087 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Degaser:	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Probenaufgabe:	
Autosampler:	AS-2055 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Loop-Injektion:	Rheodyne-Ventil mit Probenschleife (0,1–2 ml)
Detektor:	Sedex LT-ELSD Model 85 (Sedere, Alfortville, Frankreich)
Software:	Chrompass Software (V. 1.8.61, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

---

### HPLC-System 2: HPLC-Diodenarray-Detektion

Pumpe:	PU-2087 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Degaser:	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Probenaufgabe:	
Autosampler:	AS-2055 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Loop-Injektion:	Rheodyne-Ventil mit Probenschleife (0,1–2 ml)
Detektor:	MD 2010 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Software:	Chrompass Software (V. 1.8.61, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

### HPLC-System 3: HPLC-UV/VIS-Detektion

Pumpe:	PU-2087 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Degaser:	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Probenaufgabe:	
Autosampler:	AS-2055 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Loop-Injektion:	Rheodyne-Ventil mit Probenschleife (0,1–2 ml)
Detektor:	UV-2075 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Software:	Chrompass Software (V. 1.8.61, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

### HPLC-System 4: HPLC-UV/VIS-ELSD-Detektion

Pumpe:	322 Pump (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland)
Probenaufgabe und Fraktionssammler:	GX-281 Liquid Handler ausgestattet mit: GX Direct Injection Module, 1/16 Analyt Sample Loop 2 ml, VALCO, 1/16" Probe, Angled Tip, 301,3 × 1,5 × 4 mm Rinse Station Assy, 175 mm GX-281 Rinse Station, GX-281 175 mm FC GX-281 Low Mount Fraction Collection PKG (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland)
Interface:	506C System Interface Modul (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland)
Detektor:	
UV-Detektor:	UV/VIS-152 (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland)

ELSD-Detektor:	Sedex LT-ELSD Model 85 (Sedere, Alfortville, Frankreich)
Splitter:	Semi-Preparativer Splitter (Analytical Scientific Instruments, El Sobrante, USA)
Software:	Trilution LC Media, Version 2.0 (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland)

#### HPLC-System 5: HPLC-UV/VIS-Detektion

Pumpe:	ProStar M210 (Varian, Darmstadt, Deutschland)
Probenaufgabe:	
Loop-Injektion:	Rheodyne-Ventil mit Probenschleife (0,2–2 ml)
Detektor:	ProStar 325 UV/VIS-Detektor (Varian, Darmstadt, Deutschland)
Software:	Varian Star Chromatography Workstation® (V. 6.20, Varian, Darmstadt, Deutschland)

#### 5.7.1.3 Ionenchromatographie zur qualitativen und quantitativen Bestimmung freier Zucker und Kationen

Zur Analytik von Monosacchariden wird ein ICS-2500 Ionenchromatographie System (Dionex, Idstein, Deutschland) verwendet, das aus der Gradientenpumpe GS 50, dem Autosampler AS 50, dem Säulenofen AS 50 mit Säulenschaltventil und einem elektrochemischen Detektor ED 50 besteht. Für die gepulsten amperometrischen Bestimmungen wird an einer Goldelektrode mit der von Dionex applikationsmäßig vorgeschlagenen Wellenform gearbeitet. Sowohl die Gerätekontrolle als auch die Auswertung der Daten erfolgt mit der Chromeleon Software (Version 6.80, Dionex).

Für die ionenchromatographische Messung der Kationen wird dagegen das ICS-2000 Ionenchromatographie System (Dionex, Idstein, Deutschland) verwendet. Dieses System verfügt über einen Eluentengenerator mit Methansulfonsäurekartusche, einen Leitfähigkeitsdetektor, eine isokratische Pumpe und einen Säulenofen. Die Injektion erfolgt über einen Autosampler (Modell AS, Dionex) mit einer 10 µl Probenschleife. Sowohl die Gerätekontrolle als auch die Auswertung der Daten erfolgt mit der Chromeleon Software (Version 6.80, Dionex).

## 5.8 Spektroskopische Methoden

### 5.8.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren werden in dem angegebenen Lösungsmittel auf dem Diodenarraydetektor (DAD, MD 2010, Jasco, Groß-Umstadt) des in Abschnitt 5.7.1.2 aufgeführten HPLC-Systems aufgenommen.

### 5.8.2 HPLC/Massenspektrometrie (HPLC/MS)

Die Aufnahme von ESI- und APCI-Massenspektren zur Identifizierung und Quantifizierung von Geschmacksstoffen und zur Überprüfung von Syntheseprodukten erfolgt entweder auf einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle Q-Trap 4000 (Applied Biosystems, MDS SCIEX, Darmstadt) oder auf einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer Q-Trap 3200 (Applied Biosystems, MDS SCIEX, Darmstadt), mit den jeweilig folgenden Geräteparametern:

#### LC/MS System 1 (API 4000 QTrap):

HPLC-System:	Dionex UHPLC UltiMate <sup>®</sup> 3000 (Dionex, Idstein)
Pumpe:	HPG-3400SD
Degaser:	SRD-3400
Autosampler:	WPS-3000TSL
Säulenofen:	TCC-3000SD
Software:	DC MS Link 2.8.0.2633
Massenspektrometer:	API 4000 QTRAP, Linear Ion Trap Quadrupole Mass Spectrometer (Applied Biosystems, Darmstadt)
Ionisierung:	Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI) Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)
Software:	Analyst 1.5.1 Software (Applied Biosystems, Darmstadt)

#### LC/MS System 2 (API 3200):

Pumpe:	Agilent 1100 G1312A Binary Pump
Degaser:	Agilent 1100 G1379A

Autosampler:	Agilent 1200 G1329A
Software:	Analyst 1.5. software (Applied Biosystems, Darmstadt)
Massenspektrometer:	API 3200 (Applied Biosystems, Darmstadt)
Ionisierung:	Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI) Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)
Software:	Analyst 1.5.1 Software (Applied Biosystems, Darmstadt)

Die Massenkalkulierungen erfolgen mittels ESI-Tune-Mix-Standard (Agilent, Waldbronn). Angegeben sind die Masse/Ladungs-Verhältnisse  $m/z$  in amu und die relativen Intensitäten in %. Die Identifizierung der Moleküle erfolgt mittels Full-Scan-Experimenten, wobei der Massenbereich  $m/z$  50–1200 abgedeckt wird. Für die Aufnahme der Massenspektren von Reinstoffen wird die direkte Loop-Injektion gewählt, hingegen für die Aufnahmen der Massenspektren von Substanzmischungen wird eine chromatographische Trennung herangezogen. Die verwendeten HPLC-Trennprogramme und MS-Parameter sind unter den jeweiligen Quantifizierungsmethoden aufgeführt. Für die Quantifizierungen der Schlüsselgeschmacksstoffe werden beide Triple-Quadrupol-Geräte im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus, mit optimierten Parametern für das Declusteringpotential (DP), für die Collision Energy (CE) sowie für das Collision Cell Exit Potential (CXP) aus dem Spritzenpumpenexperiment, betrieben.

Um eine optimale Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion zu erzielen, werden bei quantitativen LC-MS/MS-Untersuchungen die MRM-Parameter jeder Substanz mittels Spritzenpumpe und mit Hilfe des Analyst-Programms „Compound Optimization“ (1.5.1. Analyst Software) optimiert. Für die unterschiedlichen Ionisierungstypen (ESI und APCI) werden folgende Einstellungen gewählt:

#### **Tuning-Bedingungen:**

Spritzenpumpe:	Harvard Syringe Pump 11 plus (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
Fluss:	ESI: 10 $\mu$ l/min APCI: 250 $\mu$ l ACN; 10 $\mu$ l Analyt
Ion Spray Voltage:	5500 V bzw. -4500 V
Curtain Gas:	20 psi
Quadrupol resolution:	Unit

---

Stoßgas:	Stickstoff, $p = 4,5 \times 10^{-5}$ Torr
CEM Voltage	2100 V
Datenauswertung	Analyst <sup>®</sup> 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)

**Bedingungen für die qualitative und quantitative Analytik mittels Elektrospray Ionisation (ESI):**

Fluss:	250 µl/min
Ion Spray Voltage:	5500 V oder -4500 V
Turbogastemperatur:	450 °C
Curtain Gas:	20 psi
Nebulizer Gas:	55 psi
Heater Gas:	45 psi
Quadrupol resolution:	Unit
Stoßgas:	Stickstoff, $p = 4,5 \times 10^{-5}$ Torr
CEM Voltage:	2100 V
Datenauswertung:	Analyst <sup>®</sup> 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)

Alle weiteren substanzspezifischen Parameter sind 5.5 zu entnehmen.

**Bedingungen für die qualitative Analytik mittels Chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)**

Fluss:	250 µl/min
Ion Spray Voltage:	5500 V
Needle current:	3 µA
Curtain Gas:	20 psi
Nebulizer Gas:	50 psi
Heatre Gas:	0 psi
Quadrupol resolution:	Unit
Stoßgas:	Stickstoff, $p = 4,5 \times 10^{-5}$ Torr
CEM Voltage:	2400 V
Datenauswertung:	Analyst <sup>®</sup> 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt)

Alle weiteren substanzspezifischen Parameter sind 5.5 zu entnehmen.

**Massenchromatographie und MS-Responsefaktoren**

Für die quantitative Analyse der Saponine im Spargel werden die relativen Intensitäten der für die Analyten und Standards ausgewählten Ionen, mit Hilfe des in Abschnitt 5.8.2 beschriebenen HPLC/MS/MS-System im MRM-Mode, verwendet. Die Auswertung und Gehaltsbestimmung der Geschmacksstoffe wird wie folgt berechnet:

$$R_f = \frac{c_A \cdot I_S}{c_S \cdot I_A}$$

$R_f$	=	Responsefaktor
$c_A$	=	Konzentration des Analyten
$c_S$	=	Konzentration des Standards
$I_A$	=	Intensität des Ions $m/z$ des Analyten
$I_S$	=	Intensität des Ions $m/z$ des Standards

Um möglichen Fehlern, die durch eine uneinheitliche Markierung des Standards entstehen, entgegenzuwirken, wird zusätzlich der MS-Responsewert ermittelt. Für die Bestimmung der Responsefaktoren werden die internen Standards mit bekannten Mengen an Analyten in Mischungsverhältnissen von 0,2 bis 5 hergestellt. Die Probe wird analysiert und aus den relativen Intensitäten der ausgewählten Ionen und den bekannten Konzentrationen wird der Responsefaktor ( $R_f$ ) wie folgt berechnet:

$$m_A = \frac{m_S \cdot I_A \cdot R_f}{I_S}$$

$m_A$		Masse des Analyten in der Probe
$m_S$	=	Masse des zupipettierten Standards
$I_A$	=	Intensität des Ions $m/z$ des Analyten
$I_S$	=	Intensität des Ions $m/z$ des Standards
$R_f$	=	Responsefaktor

Da für die Analyten keine isotoopenmarkierten Verbindungen zur Verfügung stehen, werden deren Responsefaktoren mit strukturverwandten Standards bestimmt. Die zur Massenspekt-



rometrie ausgewählten Ionen der Standards und Analyten sowie deren ermittelte Responsefaktoren sind in Tabelle 14 aufgeführt.

### 5.8.3 Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Identifizierung der Aldehyde nach Ozonierung und reduktiver Spaltung der Alkylamide erfolgt an einem GC/MS-System, ausgestattet mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer. Die Massenspektren werden im EI-Modus bei einer Ionisierungsenergie von 70 eV und im CI-Modus bei einer Ionisierungsenergie von 150 eV mit Isobutan als Reaktantgas aufgenommen.

#### GC/MS System:

GC-System:	5890 HP Serial 2 (Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland)
Massenspektrometer:	Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 S (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
Injektor:	Cold-On-Column
Trägergas:	Helium
Software:	ICIS (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
Quellentemperatur:	230 °C

#### GC-Bedingungen:

Kapillarsäule:	DB-5 (30 m × 0,25 mm i.d.; 0,25 µm Filmdicke) (J&W Scientific, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Temperaturprogramm:	40 °C, 2 min, (6 °C/min), 120 °C, (15 °C/min), 240 °C

### 5.8.4 Bestimmung der exakten Masse

Zur Bestimmung der exakten Massen der Verbindungen **2–4**, **6** und **9** wird ein Flugzeit-Massenspektrometer MicroTof<sup>®</sup> (Bruker Daltronics, Bremen) mit Schleifeneinlass verwendet. Die Massenkalisierung erfolgt unmittelbar vor jeder Probenmessung über Natriumformiat-Cluster. Bei hochaufgelösten Massen werden zusätzlich die Summenformeln angegeben.

Für die hochauflösenden Massenspektren der Verbindungen **1**, **5a/b**, **10a/b**, **13a/b-6**, **21-39a/b** und **17** wird ein SYNAPT G2 HDMS (Waters UK Ltd., Manchester, Großbritannien) im positiven und negativen ESI und Resolution Modus mit den folgenden Parametern verwendet: Kapillar-Spannung +2.5 kV oder -3.0 kV, Sampling Cone 30 V, Extraction Cone 4.0 V, Quelltemperatur 150 °C, Desolvation Temperatur 450 °C, Cone Gas 30 l/h and Desolvation Gas 850 l/h. Aliquote (1–5 µl) aller Analyten, gelöst in 1 ml Methanol, werden über ein Acquity UPLC core System (Waters UK Ltd., Manchester, Großbritannien) bestehend aus einer binären Pumpe, einem Autosampler und einem Säulenofen, in das TOF-MS-System geleitet. Die Massenkalisierung erfolgt unmittelbar vor jeder Probenmessung über Natriumformiat (0,5 mM) in einer 2-Propanol/Wasser Mischung (9/1, v/v), wobei der Massenbereich von  $m/z$  100 bis 1200 abgedeckt wird. Alle Daten werden auf die Referenz Leucin-Enkephalin als „lock mass“ ( $m/z$  556.2771,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  554.2615  $[M-H]^-$ ) korrigiert. Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch das Computerprogramm MassLynx (Version 4.1; Waters) und dem Hilfsprogramm „elemental composition“. Bei hochauflösten Massen werden zusätzlich die Summenformeln angegeben.

Stationäre Phase:	BEH C18; 2 × 150 mm; 1,7 µm (Waters UK Ltd., Manchester, Großbritannien)
Flussrate:	0,3 ml/min
Injektionsvolumen:	1–5 µl
Mobile Phase:	A: Acetonitril B: 0,1% Ameisensäure aq (pH 2,5)
Gradient:	50% B, innerhalb von 7 min auf 100% B, iso-kratich (2 min), in weiteren 2 min auf 50% B.

### 5.8.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren werden mit einem 400 MHz Bruker DRX Spektrometer (Rheinstetten), einem 500 MHz Bruker Avance III Spektrometer (Rheinstetten) oder einem 600 MHz Varian Unity plus Spektrometer (Darmstadt) aufgenommen. Dazu werden die Proben in DMSO- $d_6$ ,  $CDCl_3$ , Pyridin- $d_5$  oder  $CD_3OD$  gelöst, in NMR-Röhrchen (Schott Economic oder Professional, 178 × 5 mm) gefüllt und je nach Gerät zwischen 297 und 305 K mit/ohne Tetramethylsilan (0,00 ppm) als internem Standard gemessen. Die chemische Verschiebung der Proben wird entweder auf den Internen Standard (0,00 ppm) oder auf das Lösungsmittel bezogen ( $CDCl_3$ :  $^1H$  7,24 ppm;  $^{13}C$  77,00 ppm; DMSO- $d_6$ :  $^1H$  2,49 ppm;  $^{13}C$  39,52 ppm; Pyridin- $d_5$ :  $^1H$

7,19; 7,55; 8,71 ppm;  $^{13}\text{C}$  123,5; 135,5; 149,5 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $^1\text{H}$  3,35; 4,78 ppm;  $^{13}\text{C}$  49,3 ppm).

Eine genaue Zuordnung der Signale erfolgt mittels  $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY- und  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC- beziehungsweise  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC-, TOCSY- sowie DEPT-Experimenten.

Um stereochemische Zuordnungen in Saponinen treffen zu können, werden zum einen Kopplungskonstanten aus  $^1\text{H}$ - und  $J$ -RESOLVE-Experimenten ausgelesen und zum anderen ROESY und NOESY-Messungen durchgeführt.

Die Auswertung der Spektren erfolgt rechnerunterstützt durch die Computerprogramme Bruker Software und Mestre-C<sup>®</sup> (Universidad de Santiago de Compostela, Spanien).

NMR-Spektren von bekannten Verbindungen werden mit entsprechenden Literaturdaten abgeglichen. Bei Saponinspektren werden 4  $\mu\text{l}$  MeOD zu Pyridin- $\text{d}_5$  für den Austausch der Protonen an den Hydroxygruppen zudosiert.

#### 5.8.5.1 $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Eindimensionale  $^1\text{H}$ -NMR-Resonanzspektren geben Aufschluss über die Anzahl der vorhandenen Wasserstoffatome einer gemessenen Verbindung.

Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in [ppm] ( $\delta$ -Skala), Kopplungskonstanten ( $J$ ) in [Hz] angegeben. Die Signalmultiplizitäten der  $^1\text{H}$ -Signale werden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), qi (Quintett), dd (doppeltes Dublett), ddd (Dublett eines doppelten Dubletts) dt (doppeltes Triplet) und m (Multiplet). Chemische Verschiebungen von Signalüberlagerungen mehrerer nicht-äquivalenter Protonen, die ein Multiplet erzeugen, werden in Bereichen angegeben. Können Aufspaltungsmuster einzelner Protonen nicht nach erster Ordnung beschrieben werden, erfolgt die Angabe der chemischen Verschiebung des Signalschwerpunktes.

#### 5.8.5.2 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen geben Aufschluss über die Anzahl der vorhandenen Kohlenstoffatome einer gemessenen Verbindung. Wegen des geringen natürlichen Vorkommens des Kohlenwasserstoffisotops  $^{13}\text{C}$  (1,1%) und des kleinen gyromagnetischen Moments, erfolgt die Aufnahme der  $^{13}\text{C}$ -Spektren unter Protonen-Breitbandentkopplung. Durch die Unterdrückung der heteronuclearen  $J$ -Kopplungen wird eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses erreicht, denn  $^{13}\text{C}$ -Kerne erscheinen frei von Aufspaltungen durch  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -

Kopplungen als Singulett. Die Angabe der chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) erfolgt in ppm und wird auf 0.01 ppm gerundet.

#### 5.8.5.3 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer-Verfahren (DEPT-135°)

Mit Hilfe des DEPT-Experiments (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) gelingt die Bestimmung der Anzahl der an Kohlenstoffe direkt gebundenen Wasserstoffatome. Weiterhin gelingt teilweise eine Unterscheidung zwischen primären, sekundären und tertiären Kohlenstoffatomen. Während Methin- und Methylgruppen bei der Aufnahme von DEPT-Spektren mit  $^1\text{H}$ -Pulswinkeln von 135 ( $\theta=135^\circ$ ) ein positives Signal zeigen, verursachen Methylgruppen ein negatives Signal. Primäre und tertiäre Kohlenstoffe können mit diesem Experiment nicht unterschieden werden. Quartäre Kohlenstoffatome rufen hingegen im DEPT-Spektrum kein Signal hervor. Zusätzlich trägt der Polarisationstransfer zu einem Intensitätsgewinn bei (Friebolin, 2006).

#### 5.8.5.4 Homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Verschiebungskorrelation (g-COSY)

Die Messungen werden an 400 MHz, 500 MHz und 600 MHz Geräten durchgeführt. Bei dem zweidimensionalen, homonuclearen COSY-Experiment werden  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -korrelierte 2D-Spektren erhalten, in denen die Diagonale dem eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum entspricht. Außerhalb der Diagonale ergeben Protonen im 2D-Konturdiagramm, die über zwei (geminal,  $^2J_{\text{H,H}}$ ) oder drei (vicinal,  $^3J_{\text{H,H}}$ ) Bindungen miteinander verknüpft sind, symmetrisch angeordnete Korrelationssignale, sodass über COSY-Spektren die Konnektivitäten in den jeweiligen Spinsystemen erkannt werden können (Hesse et al., 2005; Friebolin, 2006).

#### 5.8.5.5 Heteronukleare inverse Verschiebungskorrelation (HMQC und HSQC)

Die zweidimensionale, inverse Heterokorrelationstechnik, die je nach Pulssequenz entweder HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) oder HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) genannt wird, ermöglicht die Aufnahme von  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Verschiebungskorrelationen, sodass im 2D-Spektrum die Kreuzsignale zwischen Protonen und  $^{13}\text{C}$ -Kernen angezeigt werden. Da während des Experiments über die  $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplung die Magnetisierung von ( $^1J$ ) Protonen auf die zugehörigen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffatome durch einen Mehrquantenübergang übertragen wird, kann anschließend die Resonanz der  $^1\text{H}$ -Kerne be-

obachtet werden, dagegen können quartäre Kohlenstoffatome nicht detektiert werden. Als inverses Verfahren hat das HMQC-Experiment den Vorteil einer erheblich gesteigerten Nachweisempfindlichkeit, sodass dieses Experiment auch schon mit geringen Substanzmengen durchgeführt werden kann (Bax et al., 1983; Bax und Summers, 1986).

#### 5.8.5.6 Heteronukleare inverse Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC)

Das  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Experiment (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) ist eine Weiterentwicklung des HMQC-Experimentes und korreliert Protonen- und Kohlenstoffkerne über  $^2\text{J-C,H}$ ,  $^3\text{J-C,H}$  und  $^4\text{J-C,H}$ -Kopplungen, dagegen werden geminale  $^1\text{J-C,H}$ -Kopplungen durch die Pulssequenz unterdrückt. Im Gegensatz zum HMQC liefert das HMBC Experiment auch Informationen über quartäre Kohlenstoffatome, die zwar keine Protonen tragen, jedoch an Long-range Kopplungen teilnehmen können (Bax und Summers, 1986).

Insbesondere die Zucker-Konformationen in den Steroidglycosiden sowie die Zuordnung einiger  $^{13}\text{C}$ -Signale in Steroid-Derivaten werden über HMBC-Experimente getroffen.

#### 5.8.5.7 Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy (NOESY) - Experimente

Bei NOESY- Experimenten (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy) wird der Kern-Overhauser-Effekt (NOE) genutzt, bei dem die Übertragung der Magnetisierung von einem Kern auf einen anderen durch rein räumliche Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und nicht über skalare Bindungen von statten geht. Dabei zeigen Korrelationssignale im 2D-Spektrum die räumliche Nachbarschaft von Kernen an und ermöglichen insbesondere die Aufklärung der Konstitution und Konformation der Saponinaglyca. Da die Relaxationsrate abhängig vom Abstand der Kerne ist, wechselwirken nur Kerne miteinander, die nicht weiter als maximal 0,5 nm voneinander entfernt sind (Hesse et al., 2005).

#### 5.8.5.8 Total Correlation-Spektroskopie (TOCSY)

Das TOCSY (Total Correlation-Spektroskopie)-Experiment ist die zweidimensionale Variante des „Homonuclear Hartmann-Hahn“-Experiments, bei dem die Korrelation auf dem Magnetisierungstransfer durch skalare Wechselwirkungen, den Kreuzpolarisationen, basiert. Wie im COSY-Spektrum werden  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -korrelierte 2D-Spektren erhalten, in denen die Diagonale dem eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum entspricht. Außerhalb der Diagonale ergeben Protonen im 2D-Konturdiagramm Korrelationen zwischen Protonen, die zum gleichen Spinsys-

tem gehören. Vor allem Aussagen über die Zucker-Konformationen in den Steroidglycosiden werden neben HMBC-Experimenten über TOCSY-Experimente getroffen, da die Korrelationspeaks es ermöglichen, die Protonen zu identifizieren, die zu einer Monosaccharideinheit gehören (Bax und Davis, 1985; Fribolin, 2006).

#### 5.8.5.9 *J*-aufgelöstes (*J*-resolved) 2D <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum

Die homonukleare zweidimensionale *J*-aufgelöste <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wird besonders für die Analyse von großen Molekülen herangezogen, wie Steroiden oder Saponinen, die stark überlagernde Multipllett-Aufspaltungen hervorrufen. Bei diesem Experiment kann die *J*-Kopplung von der chemischen Verschiebung getrennt betrachtet werden, da sie nach zweifacher Fouriertransformation in Hz auf der F1-Achse erscheint. Die chemische Verschiebung  $\delta$  in ppm ist dagegen auf der F2-Achse, sodass nur in einer Dimension die Multipllettstrukturen dargestellt sind (Hesse et al., 2005; Friebohn, 2006).

### 5.8.6 Sonstiges

#### 5.8.6.1 Saure Hydrolyse der Saponine zur Identifizierung der Zucker und der Aglyca

2 mg Saponin werden in einem Schraubdeckelgefäß in 5 ml Methanol gelöst, mit 4 ml Trifluoressigsäure (3 M) versetzt und für 6 Stunden unter Rühren bei 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Gemisch mit 20 ml Wasser versetzt, mit Natronlauge (4 N) neutralisiert und schließlich mit Ethylacetat (3 × 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen sowie die wässrige Phase werden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und anschließend gefriergetrocknet. Zum einen werden aus der wässrigen Fraktion die Zucker via Ionenchromatographie (s. 5.8.6.3), zum anderen die Aglyca aus der organischen Phase mittels LC/MS (5.8.2) analysiert.

### 5.8.6.2 Alkalische Hydrolyse der Asparagussäureglycoside zur Identifizierung der Zucker und Aglyca

0,5 mg der Glycoside werden in Wasser (500 µl) gelöst, mit Natronlauge (4 M, 500 µl) versetzt, geschüttelt und für 2 Stunden bei 110 °C erhitzt.

### 5.8.6.3 Qualitativer Zuckernachweis hydrolysierter Einzelsubstanzen aus Spargel

Die sauer oder alkalisch gespaltenen Glycoside aus 5.8.6.1 und 5.8.6.2 werden mit HCl beziehungsweise Natronlauge neutralisiert, mit Wasser 1:100 verdünnt und anschließend via Ionenchromatographie vergleichend zu Zuckerreferenzlösungen mittels Cochromatographie und Retentionszeitenvergleich identifiziert. Verwendet wird dabei das in 5.7.1.3 vorgestellte Ionenchromatographiesystem (Dionex, Idstein) mit den folgenden Geräteparametern:

*Zucker-System 1 zur Identifizierung von Arabinose, Glucose, Xylose, Mannose, Fructose und Ribose:*

Stationäre Phase:	Dionex CarboPac PA-20 (150 × 3 mm; Dionex, Idstein)
Vorsäule:	Dionex CarboPac PA-20 (30 × 3 mm; Dionex, Idstein)
Temperatur:	30 °C
Flussrate:	0,5 ml/min
Detektion:	gepulste Amperometrie an Goldelektrode, Referenzelektrode Ag/AgCl, Data Collection Rate 2,0 Hz
Injektionsvolumen:	10 µl
Mobile Phase:	Natronlauge (2,5 mM)
Laufzeit:	20 min
Gradient:	isokratisch
	nach jeder Probengabe wird die Säule für 10 min mit einer Natronlauge (200 mM) regeneriert

*Zucker-System 2 zur Identifizierung von Rhamnose, Glucose, Galactose und Fructose:*

Stationäre Phase:	Dionex CarboPac MA1 (250 × 4 mm; Dionex, Idstein)
Vorsäule:	Dionex CarboPac MA1 (50 × 4 mm; Dionex, Idstein)
Flussrate:	0,4 ml/min

Detektion:	gepulste Amperometrie an Goldelektrode, Referenzelektrode Ag/AgCl, Data Collection Rate 2,0 Hz
Injektionsvolumen:	10 µl
Temperatur:	30 °C
Mobile Phase:	480 mmol/l NaOH
Laufzeit:	70 min
Gradient:	isokratisch

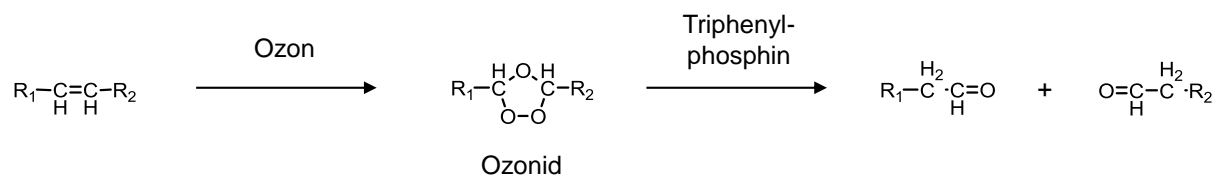
#### 5.8.6.4 Garvorschrift für weißen Spargel sowie für Spargelschalen

Der weiße, frische und gewaschene Spargel wird entweder mit einer HSM-U-Schälmaschine der Firma HEPRO maschinell oder per Hand geschält und wie folgt gekocht:

Ein Langtopf mit Siebeinsatz wird mit 1,5 l Milliporewasser befüllt und auf eine elektrische Kochplatte (Juno) gestellt. Das Wasser wird auf Stufe drei zum Kochen gebracht. Anschließend wird der Spargel gleichmäßig auf dem Siebeinsatz verteilt. Der Spargel wird, bedeckt vom Wasser, mit geschlossenem Deckel auf Heizstufe drei für 15 Minuten gegart. Nachdem das Sieb mit dem Spargel aus dem Topf genommen wird, wird das Spargelwasser abgeseiht.

#### 5.8.6.5 Bestimmung der Doppelbindungsposition mittels Ozonisierung

Die Bestimmung der Doppelbindungspositionen der Alkylamide erfolgt nach Ozonisierung der Amide, reduktiver Spaltung der Ozonide und dem Nachweis der entstehenden Aldehyde modifiziert nach Bauer (2002) (Abbildung 90).



**Abbildung 90: Bestimmung der Doppelbindungsposition mittels Ozonolyse.**



Dazu werden 3 mg der jeweiligen Fettsäureamide in 18 ml Methanol/Dichlormethan (1/1; v/v) gelöst, in einen Zweihalskolben überführt und unter Rühren auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Mit Hilfe eines Gaseinleitungsröhrchens und eines Schlauches wird das Gas aus dem Ozongenerator direkt in die Lösung geleitet. Der Ozongenerator (Typ 502, Fischer, Bonn-Bad Godesberg) wird dabei mit 200 l/h Sauerstoff (Westfalen, Reinheit: 5.0) und bei 76 W betrieben. Ein weiterer Schlauch wird aus dem Reaktionsgefäß zu einer Sicherheitswaschflasche und einer Gaswaschflasche, gefüllt mit einer Kaliumiodid-Stärkelösung, geleitet. Die Kaliumiodid-Stärkelösung besteht aus 90 ml Kaliumiodid-Lösung (10 g Kaliumiodid in 90 ml Wasser) und aus 45 ml Stärke-Lösung (10 g Stärke in 90 ml Wasser aufgeköcht). Bei Blaufärbung der Kaliumiodid-Stärkelösung wird die Ozonzufuhr beendet und 1 Minute Stickstoff eingeleitet. Zur reduktiven Spaltung der Ozonide werden 100 mg Triphenylphosphin zu der Reaktionslösung gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Ein Aliquot (5 ml) des Ansatzes wird mit 5 ml Pentan versetzt und auf eine mit Pentan vorkonditionierte Kieselgelkartusche (Chromabond<sup>®</sup> SiOH, 6 ml/1000 mg) aufgegeben. Anschließend wird die Kartusche schrittweise mit Pentan (6 ml) sowie mit einer Mischung aus Pentan/Diethylether (80/20; v/v; 6 ml) eluiert. Durch Gaschromatographie-Massenspektroskopie wird anschließend der entstandene Aldehyd mittels Cochromatographie, Massenspektrometrie und Retentionszeitenvergleich in der Pentan/Diethylether-Fraktion identifiziert.

## 6 Zusammenfassung

Ein besonders wichtiges Qualitätskriterium beim Verzehr von Lebensmitteln stellt neben der Farbe, der Textur und dem Aroma auch der unverwechselbare Geschmack dar. Charakteristische psychophysikalische Eindrücke wie die Schärfe eines Gewürzes oder die Bitterkeit verschiedener Gemüsesorten spielen beim Verzehr und damit letztlich auch beim Kauf von Nahrungsmitteln eine entscheidende Rolle. Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Bleichspargel (*Asparagus officinalis* L.) und Pfeffer (*Piper nigrum* L.) strukturell und molekularsensorisch untersucht, um neue Maßstäbe für eine objektive Beurteilung der sensorischen Qualitäten beider Lebensmittel setzen zu können.

Durch Extraktion mit anschließender Geschmacksverdünnungsanalyse und mit Hilfe von LC-MS/MS- sowie 1D- und 2D-NMR-Experimenten ist es gelungen, sechs bittere bidesmosidische und zwei monodesmosidische Saponine aus den rohen Stangen des Bleichspargels zu isolieren und anschließend zu identifizieren. Dabei zeigte sich, dass sämtliche so gewonnenen Saponine zum einen als bis dato chromatographisch nicht trennbare (25R/S)-Epimerenmischungen vorlagen und zum anderen, dass ihre terminalen Zuckerreste aus Rhamnose- und Glucose-Bausteinen bestehen. Während bei den Monodesmosiden **14a/b** lediglich ein Zuckerrest über Position C(3)  $\beta$ -glycosidisch verknüpft vorlag, konnte analog zur Literatur bei den bidesmosidischen Saponinen (**5a/b**, **10a/b** und **13a/b**) zusätzlich Glucose furostanolglycosidisch über Position C(26) gebunden gefunden werden. Im Rahmen von spektrometrischen Untersuchungen konnte darüber hinaus erstmals das literaturbekannte, aus Jungpflanzen isolierte Monodesmosid AS-1 (**15**) als bittere Markersubstanz in den Spargelstangen identifiziert werden.

Ferner gelang es erstmals, die isolierten Saponine mit Hilfe von Detektionsschwellenwerten sensorisch zu charakterisieren. Dabei konnte insbesondere die Schlüsselrolle der über Position C(3)  $\beta$ -glycosidisch verknüpften Chalkotriose- und 4-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranosid-Einheit herausgearbeitet werden. Während das Monodesmosid AS-1 beispielsweise einen Schwellenwert von 199,7 mol/l aufwies, besaß **10a/b** einen wesentlich niedrigeren Wert von 10,9  $\mu$ mol/l.

Um den Beitrag einzelner Komponenten zum sensorischen Profil des Spargels abschätzen zu können, wurden diese mittels LC-MS/MS quantitativ bestimmt und abschließend auf Basis von Dosis/Wirkungs-Überlegungen in deren Geschmacksaktivität gewichtet. Zur exakten Bestimmung der bitteren Saponinderivate wurde dazu auf Basis der Kopplung von HPLC

und Tandem-Massenspektrometrie im negativen MRM-Modus eine neue Methode unter Verwendung interner Standards entwickelt und validiert. Im Rahmen der quantitativen Untersuchungen zeigten sich Unterschiede in der Verteilung der Schlüsselbitterstoffe zwischen rohen und gekochten Bleichspargelstangen. Während die generelle Bitterkeit von rohem Spargel durch das monodesmosidischen Saponin **14a/b** verursacht wird, wird die des gekochten Gemüses durch die Bidesmoside **5a/b** und **10a/b** geprägt. Darüber hinaus konnte eine hohe natürliche Schwankungsbreite der Saponinkonzentrationen in verschiedenen Spargelchargen beobachtet werden.

Die Geschmacksprofile des Spargels zeichneten sich neben der Süße und der Bitterkeit zusätzlich durch eine dominierende, in der Literatur noch nicht beschriebene Mundfülle aus, die als „buttrig-belegend“ definiert wurde. Diese erstmals evaluierte Wahrnehmung, die sich langsam im Mundraum ausbreitet und die Zunge belegt, ist vergleichbar mit dem psychophysikalischen Eindruck, den man beim Zergehenlassen eines Butterstückes erhält. Durch die Kombination instrumentell-analytischer und humansensorischer Methoden wurden mit 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\alpha$ -glucopyranoseester (**2**) und 1,2-Dithiolan-4-carbonsäure-6-D- $\beta$ -glucopyranoseester (**3**) erstmals zwei Glycoside identifiziert, die diesen sensorischen Eindruck vermitteln.

Basierend auf den Daten der vorliegenden Arbeit ist es somit zum ersten Mal gelungen, die Basisbitterstoffe der rohen und gleichermaßen der gekochten Spargelstangen herauszuarbeiten. Die Isolierung und der Nachweis diverser Saponine bestätigte die gängige Literaturmeinung, dass Saponine an der Bitterkeit von Spargel beteiligt seien. Insbesondere die Bedeutung der bidesmosidischen Epimeren-Gemische aus Protodioscin (**5a**) und ASP-I (**5b**) beziehungsweise (25*R/S*)-Furost-5-en-3 $\beta$ ,22,26-triol-3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid]-26-O- $\beta$ -D-gluco-pyranosid (**10a/b**) konnte ebenso wie die Bedeutung des monodesmosidischen Isomerenpaares aus AS-2-I (**14a**) und Dioscin (**14b**) hinsichtlich der Bitterkeit von Spargelstangen untermauert werden.

Im Zuge möglicher Folgeuntersuchungen wäre es insbesondere von Interesse zu überprüfen, ob die sporadisch auftretende Fehlbitterkeit im Zusammenhang mit den beschriebenen Saponinen steht, oder ob weitere, noch nicht identifizierte Inhaltsstoffe als bittere Phytoanticipine oder auch als Phytoprotektoren von der Pflanze unter Stressbedingungen vermehrt gebildet werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertationsschrift wurden die wertgebenden Schlüsselgeschmacksstoffe des Pfeffers (*Piper nigrum* L.) objektiviert. Dazu wurden die sensorisch akti-

ven Inhaltsstoffe durch Extraktion mit Ethanol angereichert und anschließend mittels GVA lokalisiert. Als potenteste Inhaltsstoffe gelang es insgesamt 25 Säureamide zu identifizieren, bei denen es sich zum einen um literaturbekannte Strukturanaloga des Piperins und zum anderen um langkettige ungesättigte Alkylamide handelt. Auf der Grundlage von LC/MS- und NMR-Studien konnten zwölf Säureamiden als sensorisch potente Inhaltsstoffe des Pfeffers benannt werden. Dabei handelt es sich um Piperin (**21**), Piperlonguminin (**22**), Piperylin (**23**), Piperolein (**24**), Piperettin (**25**), Retrofractamid A (**26**), 1-[1-Oxo-9(3,4-methylenedioxyphenyl)-2*E*,4*E*,8*E*-nonatrienyl]-pyrrolidin (**27**), Dehydropipernonalin (**28**), Pipernonalin (**29**), Piperolein B (**30**) und Guineensin (**31**) sowie Brachyamid A (**32**). Darüber hinaus konnten dreizehn weitere langkettige, ungesättigte Alkylamide (**33a/b–39a/b**) identifiziert werden. Obwohl allen isolierten Fettsäureanaloga das 2,4-Dienamid-System gemeinsam ist, konnten Unterschiede sowohl in der Kettenlänge, in der Position der *cis*-ständigen Doppelbindung als auch in dem Grad der Sättigung der Fettsäurereste (C18:2, C18:3 und C20:3) aufgezeigt werden.

Unter Verwendung innovativer Sensorikmethoden, bei denen die sensorischen Stimuli auf Filterpapierstreifen appliziert wurden, gelang es, die isolierten Verbindungen bezüglich ihres Geschmacksschwellenwertes und ihrer Geschmacksqualität zu beurteilen. Auffällig war dabei, dass einige Scharfstoffe zusätzlich einen „tingling“-Effekt im Mundraum induzierten, der mit einem Prickeln auf der Zunge beschrieben werden kann. Weitergehende Studien zu Struktur/Aktivitäts-Zusammenhängen konnten ferner die strukturellen Voraussetzungen für eine Scharfaktivität der Säureamide herausstellen. Insbesondere konnte die Bedeutung der Amidbindung sowie des Piperidinringes für eine starke Scharfwahrnehmung aufgezeigt werden.

Um den Beitrag einzelner Komponenten zum sensorischen Profil des Pfeffers abschätzen zu können, wurden diese abschließend quantitativ unter Nutzung einer externen Standardkalibrierung und des LC-MS/MS-Systems bestimmt und auf Basis von Dosis/Wirkungs-Überlegungen in deren Scharf- beziehungsweise Tinglingaktivität gewichtet. Dabei gelang es zu zeigen, dass Piperin in schwarzen ganzen Pfefferkörnern eine sensorische Schlüsselrolle übernimmt, jedoch nicht allein für die Schärfe des Gewürzes verantwortlich ist. Weitere Säureamide wie **22**, **23**, **25**, **26**, **28**, **33a/b**, **37a/b**, **38a/b** und auch **39a/b** tragen auf der Basis von Dosis/Wirkungs-Überlegungen ebenfalls zum sensorischen Profil des Pfeffers bei.

Zusammenfassend ist es erstmals gelungen, die den sensorischen Eindruck von Bleichspargel (*Asparagus officinalis* L.) sowie von Pfeffer (*Piper nigrum* L.) ursächlich prägenden Naturstoffe auf molekularer Basis zu definieren und somit die Grundlage zur Objektivierung der Geschmacksqualität sowie zur wissenschaftsbasierten Optimierung von Züchtungsprogrammen zu legen.

## 7 Literaturverzeichnis

Adimoelja, A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. *In. J. Androl.* **2000**, *23*, 82–84.

Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 693–702.

Agrawal, P. K.; Jain, D. C.; Gupta, R. K.; Thakur, R. S. Carbon-13 NMR Spectroscopy of Steroidal Sapogenins and Saponins. *Phytochem.* **1985**, *24*(11), 2479–2496.

Agrawal, P. K.; Jain, D. C.; Pathak, A. K. NMR Spectroscopy of Steroidal Sapogenins and Steroidal Saponins: an Update. *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 923–953.

Agrawal, P. K.; Bunsawansong, P.; Morris, G. A. Complete Assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Steroidal Sapogenins: Smilagenin and Sarsapogenin. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 441–446.

Agrawal, P. K. Spectral Assignments and Reference Data, 25R/25S stereochemistry of spirostane-type steroidal sapogenins and steroidal saponins via chemical shift of geminal protons of ring-F<sup>+</sup>. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 965–968.

Agrawal, P. K. Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts. *Steroids* **2005**, *70*, 715–724.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG, Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit, Hersg.: BGA, Beuth Verlag GmbH, Berlin, L 00.90-7, **1996**.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 35 LMBG, Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit, Hersg.: BGA, Beuth Verlag GmbH, Berlin, L 00.90-9, **1999**.

Bajec, M. R.; Pickering, G. J. Astringency: Mechanisms and Perception. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2008**, *48*(9), 858–875.

Bajad, S.; Bedi, K. L.; Singla, A. K.; Johri, R. K. Piperine inhibits gastric emptying and gastrointestinal transit in rats and mice. *Planta Med.* **2001**, *67*, 176–179.

Bandell, M.; Story, G. M.; Hanks, S. W.; Viswanath, V.; Eid, S. R.; Petrus, M. J.; Earley, T. J.; Patapoutian, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **2004**, *41*, 849–857.

Bartoshuk, L. M. History of taste research. In: Handbook of perception. Certerette, E.C.; Friedman, M.P. Eds., *Academic Press*, New York **1978**, 2–18.

Bauer, S. Die Zusammensetzung der Oberflächenwachse von Tomaten, Paprika und Aubergine. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, **2002**.

Bautista, D. M.; Movahed, P.; Hinman, A.; Axelsson, H. E.; Sterner, O.; Högestätt, E. D.; Julius, D.; Jordt, S.-E.; Zygmunt, P. M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12248–12252.

Bautista, D. M.; Sigal, Y. M.; Milstein, A. D.; Garrison, J. L.; Zorn, J. A.; Tsuruda, P. R.; Nicoll, R. A.; Julius, D. Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci* **2008**, *11*, 772–779.

Bax, A.; Davis, D. G.; Assignment of Complex 1H NMR Spectra via Two-Dimensional Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2820–2821.

Bax, A.; Griffey, R. H.; Hawkins, B. C.; Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum NMR. *J. Magn. Res.* **1983**, *55*, 301–315.

Bax, A.; Summers, M. F. 1H and 13C assignments from sensitivity-enhanced detection of Heteronuclear Multiple Bond Connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093–2094.

Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5566–5577.

Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewalt, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G.; Beckert, R.; Fangnägels, E.; Habicher, W. D.; Knölker, H.-J.; Metz, P.; Schwetlick, K. Organikum, 23. Auflage, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2009**, 495–500.

Behrendt, H. J.; Germann, T.; Gillen, C.; Hatt, H.; Jostock, R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 737–745.

Behrendt, H. J. Vergleichende funktionelle Untersuchungen des Hitze-Capsaicin-Rezeptors (TRPV1) und des Kälte-Menthol-Rezeptors (TRPM8) in rekombinanten und nativen Zellsystemen.

temen (verwendete Spezies: Mensch, Ratte und Maus). *Dissertation*, **2004**, Ruhr-Universität Bochum.

Behrens, M.; Brockhoff, A.; Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Meyerhof, W. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 479–485.

Behrens, M.; Foerster, S.; Staehler, F.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. Broad tuning of the human bitter taste receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12630–12640.

Behrens, M.; Meyerhof, W.; Hellfritsch, C.; Hofmann, T. Moleküle und biologische Mechanismen des Süß- und Umamigeschmacks. *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2268–2291.

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, **2001**.

Bezerra, D. P.; Castro, F. O.; Alves, A. P.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Silveira, E. R.; Lima, M. A.; Elmiro, F. J.; Costa-Lotufo, L. V. In vivo growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2006**, *39*, 801–807.

Bisogno, T.; Melck, D.; Bobrov, M. Y.; Gretskaya, N. M.; Bezuglov, V. V.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity invitro and in vivo. *Biochem J.* **2000**, *351*, 817–824.

Breslin, P. A. S.; Gilmore, M. M.; Beauchamp, G. K.; Green, B. G. Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chem. Senses* **1993**, *18*(4), 405–417.

Bretthauer, F., Photoschaltbare Azobenzol-modifizierte selbstorganisierte Monoschichten auf Gold(111)-Oberflächen, *Dissertation*, **2007**, Universität Kassel, Deutschland.

Briscoe, C. P.; Tadayyon, M.; Andrews, J. L.; Benson, W. G.; Chambers, J. K.; Eilert, M. M.; Ellis, C.; Elshourbagy, N. A.; Goetz, A. S.; Strum, J. C.; Szekeres, P. G.; Tan, K. B.; Way, J. M.; Ignar, D. M.; Wilson, S.; Muir, A. I. The Orphan G Protein-coupled Receptor GRP40 Is Activated by Medium and Long Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *13*, 11303–11311.

Brock, A.; Hofmann, T. Identification of the Key Astringent Compounds in Spinach (*Spinacia oleracea*) by Means of the Taste Dilution Analysis. *Chem. Percept.* **2008**, *1*, 268–281.

Brockhoff, A.; Behrens, M.; Massarotti, A.; Appendino, G.; Meyerhof, W. Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and

labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 6236–6243.

Brown, A. J.; Goldsworthy, S. M.; Barnes, A. A.; Eilert, M. M.; Tcheang, L.; Daniels, D.; Muir, A. I.; Wigglesworth, M. J.; Kinghorn, I.; Fraser, N. J.; Pike, N. B.; Strum, P. G.; Wilson, S.; Ignar, D. M.; Foord, S. M.; Wise, A.; Dowell, S. The Orphan G Protein-coupled Receptors GRP41 and GRP43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *13*, 11312–11319.

Brückner, B.; Geyer, M.; Ziegler, J. Spargelanbau, Grundlagen für eine erfolgreiche Produktion und Vermarktung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart **2008**.

Brueckner, B.; Schwarzbach, A.; Schröder, R. Correlation between sugar and saponin contents and sensory attributes of white asparagus. *J. Verbr. Lebensm.* **2010**, *5*, 305–311.

Bryant, B. P.; Mezzine, I. Alkylamides that produce tingling parathesia active tactile and thermal trigeminal neurons. *Brain Research.* **1999**, *842*, 452–460.

Bufe, B., Hofmann, T.; Krautwurst, D.; Raguse, J.-D.; Meyerhof, W. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to b-glucopyranosides. *Nat. Genet.* **2002**, *32*, 397–401.

Bufe, B.; Breslin, P. A. S.; Kuhn, C.; Reed, D. R.; Tharp, C. D.; Slack, J. P.; Kim, U-K.; Drayna, D.; Meyerhof, W. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 322–327.

Calixto, J. B.; Kassuya, C. A. L.; André, E.; Ferreira, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol. Ther.* **2005**, *106*, 179–208.

Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, *389*, 816–824.

Cartoni, C.; Yasumatsu, K.; Ohkuri, T.; Shigemura, N.; Yoshida, R.; Godinot, N.; le Coutre, J.; Ninomiya, Y.; Damak, S. Taste Preference for Fatty Acids Is Mediated by GPR40 and GPR120. *J. Neurosci.* **2010**, *30*(25), 8376–8382.

Challenger, F.; Hayward, B. J. Occurrence of a methylsulfonium derivative of methionine ( $\alpha$ -aminodimethyl- $\gamma$ -butyrolactin) in asparagus. *J. Biol. Chem.* **1954**, *207*, 97–105.

Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Hoon, M. A.; Adler, E.; Feng, L.; Guo, W.; Zuker, C.S.; Ryba, N. J. P. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **2000**, *100*, 703–711.



Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C.S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **2006**, *444*, 288–294.

Chandrashekar, J.; Yarmolinsky, D.; von Buchholz, L.; Oka, Y.; Sly, W.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C.S. The taste of Carbonation. *Nature* **2009**, *326*, 443–445.

Chandrashekar, J.; Kuhn, C.; Oka, Y.; Yarmolinsky, D.; Hummler, E.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C.S. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* **2010**, *464*, 297–302.

Chatterjee, A.; Dutta, C. P. Alkaloids of *Piper longum* LINN-I. Structure and Synthesis of Piperlongumine and Piperlongumine. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1769–1781.

Chin, C. K.; Garrison, S. A.; Shao, Y.; Wang, M.; Simon, J.; Ho, C. T.; Huang, M. T. Functional elements from asparagus for human health. Proceedings of the Xth ISHS on Asparagus. *Acta Hortic.* **2002**, *589*, 233–241.

Chou, M. Z.; Mtui, T.; Gao, Y.-D.; Kohler, M.; Middleton, E. Resiniferatoxin Binds to the Capsaicin Receptor (TRPV1) near the Extracellular Side of the S4 Transmembrane Domain. *Biochemistry* **2004**, *43*, 250–2511.

Chu, C. J.; Huang, S. M.; De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Ewing, S. A.; Miller, J. D.; Zipkin, R. E.; Daddario, N.; Appendino, G.; Di Marzo, V.; Walker, J. M. Noleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13633–13639.

Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. *Nature* **2003**, *426*, 517–524.

Clapham, D.E.; Montell, C.; Schultz, G.; Julius, D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 591–596.

Correa, E. A.; Högestätt, E. D.; Sterner, O.; Echeverri, F.; Zygmunt, P. M. In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3299–3306.

Czepa, A.; Hofmann, T. Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3865–3873.

Da Conceicao Neto, E. R.; Johanningsmeier, S. D.; McFeeters, R. F. The Chemistry and Physiology of Sour Taste-A Review. *J. Food Sci.* **2007**, *72(2)*, R33–R38.

Das, B.; Kundu, J.; Bachar, S. C.; Uddin, M. A.; Kundu, J. K. Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of *Ludwigia hyssopifolia* Linn. and its active principle piperine. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2007**, *20*, 128–131.

Davis, J. B.; Gray, J.; Gunthorpe, M. J.; Hatcher, J. P.; Davey, P. T.; Overend, P.; Harries, M. H.; Latcham, J.; Clapham, C.; Atkinson, K.; Hughes, S. A.; Rance, K.; Grau, E.; Harper, A. J.; Pugh, P. L.; Rogers, D. C.; Bingham, S.; Randall, A.; Sheardown, S. A. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **2000**, *405*, 183–187.

Debella, A.; Haslinger, E.; Kunert, O.; Michl, G.; Abebe, D. Steroidal Saponins from *Asparagus africanus*. *Phytochem.* **1999**, *51*, 1069–1075.

Dedov, V. N.; Tran, V. H.; Duke, C. C.; Condor, M.; Christie, M. D. J.; Mandadi, S.; Roufogalis, B. D. Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *British Journal of pharmacology* **2002**, *137*, 793–798.

Dehmlow, E. V.; Shamout, A. R. Applications of phase transfer catalysis. Part 16. Phase transfer catalyzed aldol condensations of derivatives of unsaturated carboxylic acids. *J. Chem. Res. Synop.* **1981**, 106.

de Paula, V. F.; de Barbosa, L.; Demuner, A. J.; Piló-Veloso, D.; Picanço, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest. Manag. Sci.* **2000**, *56*, 168–174.

DeSimone, J. A.; Lyall, V.; Heck, G. L. A Novel Pharmacological Probe Links the Amiloride-Insensitive NaCl, KCl, and NH<sub>4</sub>Cl Chorda Tympani Taste Responses. *J. Neurophysiol.* **2001**, *86*, 2638–2641.

DeSimone, J. A.; Lyall, V. Taste receptors in the gastrointestinal tract. III. Salty and sour taste: sensing of sodium and protons by the tongue. *American Journal of Physiology* **2006**, *291*, G1005–G1010.

Desmares, G.; Lefebvre, D.; Renevret, G.; Le Drian, C. Selective formation of  $\beta$ -D-glucosides of hindered alcohols. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 880–889.

Dewis, M. L.; Huber, M.; (INTERNATIONAL FLAVORS & FRAGRANCES INC., USA); E2, E4, Z8-undecatrienoic acid and ester and carboxamide derivatives thereof, organoleptic uses thereof and processes for preparing same. U.S. Pat. Appl. Publ. **2006**, US 20050010062 A1 20050113.

Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *227*, 346–349.

Dotson, C. D.; Zhang, L.; Xu, H.; Shin, Y.-K.; Vignes, S.; Ott, S. H.; Elson, A. E. T.; Choi, H. J.; Shaw, H.; Egan, J. M.; Mitchell, B. D.; Li, X.; Steinle, N. I.; Munger, S. D. Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3974.

Drewnowski, A.; Henderson, S. A.; Shorre, A. B. Genetic Sensitive to 6-n-Propylthiouricil (PROP) and Hedonic Responses to Bitter and Sweet Taste. *Chem. Senses*. **1997**, *22*, 27–37.

Dunkel, A.; Hofmann, T. Molecular and Sensory Characterisation of  $\gamma$ -Glutamyl Peptides as Key Contributors of the Kokumi Taste of Edible Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6712–6719.

Dunkel, A.; Hofmann, T. Carboanhydrase IV vermittelt das Prickeln der Kohlensäure in Getränken. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3037–3039.

Dyer, L. A.; Palmer, A. D. N. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*, Springer; 1. Auflage, Boston **2004**.

Dyer, L.A., Richards, J.; Dodson, C.D. 2004. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of Piper amides. Pages 117 – 139 in: Dyer, L.A. and A.N. Palmer (eds.). *Piper. A model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions*. Kluwer Academic Publishers, Boston **2004**.

Englert, K.; Wodarz, H.-P. Spargel-Geschichte, Anbau, Rezepte. Verlag W. Ludwig, **1985**.

Espejo, O.; Llavot, J. C.; Jung, H.; Giralí, F. Spirostanic Diosgenin Precursors from *Dioscorea Composta* Tubers. *Phytochem.* **1982**, *21*, 413–416.

Fachverband der Gewürzindustrie e.V., Marktentwicklung der Gewürzindustrie in 2009, <http://www.gewuerzindustrie.de/press/ddfs/Marktentwicklung2009.pdf>, letzter Zugriff: 09.05.2011.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Crops, <http://faostat.fao.org/>, letzter Zugriff: 5. Mai 2011.

Feng, B.; Kang, L.-P.; Ma, B.-P.; Quan, B.; Zhou, B.-B.; Wang, Y.-Z.; Zhao, Y.; Liu, Y.-X.; Wang, S.-Q. The substrate specificity of a glutamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata*. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6796–6812.

Frank, O.; Ottinger H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1H,4H-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.; Zehentbauer G.; Hofmann T. Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 222, 492–508.

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

Frank, O.; Blumberg, S.; Krümpel, G.; Hofmann, T. Structure determination of 3-O-caffeoyl-epi- $\gamma$ -quinide, an orphan bitter lactone in Roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (20), 9581–9585.

Franke, W. Nutzpflanzenkunde, 6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart New York, **1997**.

Freist, W. Der scharfe Geschmack des Pfeffers, Ein Rätsel, nur teilweise gelöst. *Chemie in unserer Zeit.* **1991**, 3, 135–142.

Freytag, W.; Ney, K. H. Vorkommen und Entstehung von Dimethylsulfid im Spargelaroma. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **1967**, 137(5), 293–295.

Fribolin, H. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.

Friedman, M.; Levin, C. E.; Lee, S.-U.; Lee, J.-S.; Ohnisi-Kameyama, M.; Kozukue, N. Analysis by HPLC and LC/MS of Pungent Piperamides in Commercial Black, White, Green, and Red Whole and Ground Peppercorns, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 59, 3028–3036.

Fukuwatari, T.; Kawada, T.; Tsuruta, M.; Hiraoka, T.; Iwanaga, T.; Sugimoto, E.; Fushiki, T. Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* **1997**, 414, 461–464.

Galindo, M. M.; Voigt, N.; Stein, J.; van Lengerich, J.; Raguse, J.-D.; Hofmann, T.; Meyerhof, W.; Behrens, M. G Protein-Coupled Receptors in Human Fat Taste Perception. *Chem. Senses* **2011**, doi:10.1093/chemse/bjr069.

Galopin, Ch. C.; Furrer, S. M.; Goeke, A. Pungent and Tingling Compounds in Asian Cuisine. In: Hofmann T.; Ho, C. T.; Pickenhagen, W. (Eds.), *Challenges in Taste Chemistry and Biology*. ACS Symposium Series 876, American Chemical Society, Washington, DC **2004**, 139–152.

Gawel, R. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1998**, 4, 74–95.

Gerhardt, U. Gewürze in der Lebensmittelindustrie: Eigenschaften – Technologien – Verwendung, Behr, Hamburg, **1994**.

Geisler, J. G.; Gross, G. G. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*(2), 489–492.

Ghoshal, S.; Prasad, B. N. K.; Lakshmi, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *50*, 167–170.

Ghoshal, S.; Lakshmi, V. Potential antiamoebic property of the roots of *Piper longum* Linn. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 689–691.

Gilbertson, T. A.; Roper, S. D.; Kinnamon, S. C. Proton currents through amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in isolated hamster taste cells: enhancement by vasopressin and cAMP. *Neuron* **1993**, *10*(5), 931–942.

Gilbertson, T. A.; Fontenot, D. T.; Liu, L.; Zhang, H.; Monroe, W. T. Fatty acid modulation of K<sup>+</sup> channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am. J. Physiol. Cell Phys.* **1997**, *272* C, 1203–1210.

Gilbertson, T. A.; Damak, S.; Margolskee, R. F. The molecular physiology of taste transduction. *Neurobiology* **2000**, *10*, 519–527.

Gilbertson, T. A.; Yu, T.; Shah, B. P. Gustatory Mechanisms for Fat Detection, In: Fat Detection – Taste, Texture, and Post Ingestive Effects. Montmayeur, J.-P.; le Cour, J., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, **2010**.

Glabasnia, A.; Hofmann, T. Sensory-Directed Identification of Taste-Active Ellaggtannins in American (*Quercus alba* L.) and European Oak Wood (*Quercus robur* L.) and Quantitative Analysis in Bourbon Whisky and Oak-Matured Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3380–3390.

Glabasnia, A.; Hofmann, T. On the non-enzymatic liberation of limonin and C17-epilimonin from limonin-17-β-D-glucopyranoside in orange juice. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 55–63.

Go, Y.; Satta, Y.; Takenaka, O.; Takahat, N. Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* **2005**, *170*, 313–326.

Green, B. G. Physiological Measurement of Oral Chemthesis, in: Methods in Chemosensory Research, Edited by: Simon, S. A.; Nicolelis, M. A. L., CRC Press Florida, **2002**.

Green, B. G. Oral astringency: A tactile component of favour. *Acta. Psychol.* **1993**, *84*, 119–125.

Greffrath, W. Der Capsaicinrezeptor, Ein TRP zur Transduktion schmerzhafter Reize. *Schmerz* **2006**, *20*, 219–225.

Grewe, R.; Freist, W.; Meumann, H.; Kersten, S. Über die Inhaltstoffe des schwarzen Pfeffers. *Cem. Ber.* **1970**, *103*, 3752–3770.

Gunthorpe, M. J.; Benham, C. D.; Randall, A.; Davis, J. B. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*(4), 183–191.

Gyulemetova, R.; Tomova, M.; Simova, M.; Pangarova, T.; Peeva, S. Determination of furostanol saponins in the preparation Tribestan. *Pharmazie* **1982**, *37*, 296.

Han, X. W.; Yu, H.; Liu, X. M.; Bao, X.; Yu, B.; Li, C.; Hui, Y. Z. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of diosgenyl saponins. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 140–144.

Hänsel, R.; Keller, K.; Rimoler, H.; Schneider, G. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Drogen P-Z. Band 6, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 5. Auflage, **1994**, 213.

Hartmann, H. D. Spargel. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **2001**.

<sup>a</sup> Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from  $\beta$ -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chem.* **2009**, *116*, 71–81.

<sup>b</sup> Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS quantitation of bitter-tasting  $\beta$ -acid transformation products in beer. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 7480–7489.

Haseleu, G. Sensorische, strukturanalytische und quantitative Studien zu Bitterstoffen aus Hopfen (*Humulus lupulus* L.) und deren Beitrag zum Bittergeschmack von Bier. Dissertation **2010**, Technische Universität München.

Hashimoto, K.; Yaoi, T.; Koshiba, H.; Yoshib, T.; Maoka, T.; Fujiwara, Y.; Yamamoto, Y.; Mori, K. Photochemical Isomerization of Piperine, a Pungent Constituent in Pepper. *Food Sci. Technol. Int.* **1996**, *2*(1), 24–29.

Hayes, P. Y.; Jahidin, A. H.; Lehmann, R.; Penman, K.; Kitching, W.; De Voss, J. J. Steroidal Saponins from the roots of *Asparagus racemosus*. *Phytochem.* **2008**, *69*, 796–804.

Herrmann, K. Übersicht über die nichtessentiellen Inhaltsstoffe der Gemüsearten. II Cruciferen (Kohlarten, Radieschen, Rettiche, Speiserüben, Kohlrüben, Meerrettich) sowie Gramineen (Zwiebeln, Porree, Schnittlauch, Knoblauch, Spargel). *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1977**, *165*, 151–164.

Hesse, M.; Meier, H.; Zee, B.; Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7. Auflage, Thieme Verlage, Stuttgart New York, **2005**.

Hirasawa, A.; Tsumaya, K.; Awaji, T.; Katsuma, S.; Adachi, T.; Yamada, M.; Sugimoto, Y.; Miyazaki, S.; Tsujimoto, G. Free fatty acid regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **2005**, *11*(1), 90–94.

Hiwale, A. R.; Dhuley, J. N.; Naik, S. R. Effect of coadministration of piperine on pharmacokinetics of beta-lactam antibiotics in rats. *Indian J. Exp. Biol.* **2002**, *40*, 277–281.

Hofmann, T.; Soldo, T. Structural Requirements for the Cooling Activity of Cyclic  $\alpha$ -Keto Enamines. *ACS Symposium Series* **2004**, *867* (Challenges in Taste Chemistry and Biology), 153–164.

Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E. Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procynidin, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose, Castalagin, and Granidin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9503–9506.

Hoon, M. A.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J. F.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with Distinct Topographic Selectivity. *Cell* **1999**, *96*, 541–551.

Hostettmann, K.; Marston, A. Saponins. *Cambridge University Press* **1995**.

Hu, K.; Dong, A.; Yao, A.; Kobayashi, H.; Iwasaki, S. Antineoplastic Agents; II. Four Furostanol Glycosides from Rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta Med.* **1997**, *63*, 161–165.

Hu, K.; Dong, A.-J.; Yao, X.; Kobayashi, H.; Iwasaki, S. Antineoplastic steroidal saponins from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Stud. Plant Sci.* **1999**, *6*, 220–229.

Huang, S. M.; Bisogno, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.; Geppetti, P.; Walker, J. M.; Di Marzo, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2002**, *99*, 8400–8405.

Huang, A. M.; Chen, X.; Hoon, M. A., Chandrashekar, J.; Guo, W.; Tränkner, D.; Ryba, N. J.; Zuker, C. S. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* **2006**, *442*, 934–938.

Huang, X.; Kong, L. Steroidal saponins from roots of *Asparagus officinalis*. *Steroids* **2006**, *71*, 171–176.

Huang, X.-F.; Lin, Y.-Y.; Kong, L.-Y. Steroids from the Roots of *Asparagus officinalis* and Their Cytotoxic Activity. *J. Integr. Plant. Biol.* **2008**, *50* (6), 717–722.

Hufnagel, J. C. Charakterisierung wertgebender Geschmacksstoffe in Rotwein durch Anwendung molecular-sensorischer Methoden. Doktorarbeit. **2007**, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Deutschland.

<sup>a</sup> Hufnagel, J. C.; Hofmann, T. Quantitative Reconstruction of the Nonvolatile Sensometabolome of a Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*(19), 9190–9199.

<sup>b</sup> Hufnagel, J. C.; Hofmann, T. Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1376–1386.

Huhtanen, C. N. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *J. Food Prot.* **1980**, *43*, 835–839.

Ikeda, T.; Ando, J.; Miyazono, A.; Zhu, X.-H.; Tsumagari, H.; Nohara, T.; Yohomizo, K.; Uyeda, M. Anti-herpes virus activity of *Solanum* steroidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 363–364.

Ikeda, K. New Seasonings. (Übersetzung) *Chem. Senses* **2002**, *27*, 847–849.

Ikeda, T.; Tsumagari, H.; Okawa, M.; Nohara, T. Pregnane- and Furostane-Type Oligoglycosides from the Seeds of *Allium tuberosum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*(1), 142–145.

<sup>a</sup> Intelmann, D.; Batram, C.; Kuhn, C.; Haseleu, G.; Meyerhof, W.; Hofmann, T. Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Response to Bitter Compounds of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer. *Chem. Percept.* **2009**, *2*, 118–132.

<sup>b</sup> Intelmann, D.; Haseleu, G.; Hofmann, T. LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1172–1182.

Ishimaru, Y.; Inida, H.; Kabota, M.; Zhuang, H.; Tominaga, M.; Matsunami, H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD1L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*(33), 12569–12574.



<sup>a</sup> Jagella, T.; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.), I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques, *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 16–21.

<sup>b</sup> Jagella, T.; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.), II. Odor active values of desirable and undesirable odorants of black pepper, *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 22–26.

<sup>c</sup> Jagella, T.; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.), III. Desirable and undesirable odorants of white pepper, *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 27–31.

Jahnel, R. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Schmerzrezeption, insbesondere biochemische Charakterisierung der thermosensitiven Vanilloid-Rezeptoren TRPV1 und TRPV2. Dissertation **2004**, Freie Universität Berlin.

Jaquemar, D.; Schenker, T.; Trueb, B. An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(11), 7325–7333.

Jiang, P.; Ji, Q.; Liu, Z.; Snyder, L. A.; Benard, L. M.; Margolskee, R. F.; Max, M. The Cystein-rich Region of T1R3 Determines Responses to Intensely Sweet Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*(43), 45068–45075.

Jiang, P.; Cui, M.; Zhao, B.; Snyder, L. A.; Benard, L. M.; Osman, R.; Max, M.; Margolskee, R. F. Identification of the Cyclamate Interaction Site within the Transmembrane Domain of the Human Sweet Taste Receptor Subunit T1R3. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*(40), 34296–343505.

Jöbstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, P. A.; Williamson, M. P. Molecular Model for Astringency Produced Polyphenol/Protein Interactions. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 942–949.

Jordt, S.-E.; Julius, D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **2002**, *108*(3), 421–430.

Jordt, S.-E.; Bautista, D. M.; Chuang, H.-H.; McKemy, D. D.; Zygmunt, P. M.; Högestätt, E. D.; Meng, I. D.; Julius, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **2004**, *427*, 260–265.

Jung, J.; Hwang, S. W.; Kwak, J.; Lee, S. Y.; Kang, C. J.; Kim, W. B.; Kim, D.; Oh, U. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J. Neurosci.* **1999**, *19*(2), 529–538.

Kaga, H.; Ahmed, Z.; Gotoh, K.; Orito, K. New Access to Conjugated Dien- and Enamides. Synthesis of Dehydropiperonaline, Piperonaline, Piperonaline and Related Biologically Active Amides. *Synlett*. **1994**, 25(48), 607–608.

Kallithraka, S.; Bakker, J. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *J. Sens. Sci.* **1998**, 13, 29–43.

Kapoor, I. P. S.; Singh, B.; Singh, G.; De Heluani, C. S.; De Lampasona, M. P.; Catalan, C. A. N. Chemistry and in Vitro Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum*); *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57(12), 5358–5364.

Katzter, G., [http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/Pipe\\_nig.html](http://www.uni-graz.at/~katzer/germ/Pipe_nig.html), letzter Zugriff: 09.05.2011.

Kawano, K.; Sakai, K.; Sato, H.; Sakamura, S. A Bitter Principle of Asparagus: Isolation and Structure of Furostanol Saponin in Asparagus Storage Root. *Agr. Biol. Chem.* **1975**, 39, 1999–2002.

Kawano, K.; Sato, H.; Sakamura, S. Isolation and Structure of Furostanol Saponin in Asparagus Edible Shoots. *Agr. Biol. Chem.* **1977**, 41, 1–8.

Kedei, N.; Szabo, T.; Lile, J. D.; Treanor, J. J.; Olah, Z.; Iadarola, M. J.; Blumberg, P. M. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(30), 28613–28619.

Khan, I. A.; Mirza, Z. M.; Kumar, A.; Verma, V.; Qazi, G. N. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 810–812.

Kier, L. B. A Molecular Theory of Sweet Taste. *J. Pharm. Sci.* **1972**, 61(9), 1394–1397.

Kikuzaki, H.; Kawabata, M.; Ishida, E.; Akazawa, Y.; Takei, Y.; Nakatani, N.; Constituents of Piperaceae. Part V. LC-MS analysis and structural determination of new amides from Javanese long pepper (*Piper retrofractum*); *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, 57(8), 1329–1333.

Kim, U. K.; Jorgenson, E.; Coon, H.; Leppert, M.; Risch, N.; Drayna, D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* **2003**, 299, 1221–1225.

Kitagawa, I.; Taniyama, T.; Nagahama, Y.; Okubo, K.; Yamauchi, F.; Yoshikawa, F. Saponin and Sapogenol. XLII. Structures of Acetyl-soyasaponins A1, A2 and A3, Astringent Partially Acetylated Bidesmosides of Soyasapogenol A, from American Soybean, the Seeds of *Glycine max* MERRILL. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 8, 2819–2828.

- Kobata, K.; Todo, T.; Yazawa, S.; Iwai, K.; Watanabe, T. Novel Capsaicinoid-like Substances, Capsiate and Dihydrocapsiate, from the Fruits of a Nonpungent Cultivar, CH-19 Sweet, of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1695–1697.
- Koenigs, W.; Knorr, E. Über einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Cem. Ber.* **1901**, *34*(1), 957–981.
- Koo, Y. K.; Jang, Y.; Cho, H.; Lee, C.-H.; Jang, K. H.; Chang, Y. H.; Shin, J.; Oh, U. Hydroxy- $\alpha$ -sanshool activates TRPV1 and TRPA1 in sensory neurons. *European Journal of Neuroscience* **2007**, *26*, 1139–1147.
- Köster, G. Spargelseiten, <http://www.spargelseiten.de/index.html>, letzter Zugriff: 18.05.2011.
- Koul, S. K.; Taneja, S. C.; Agarwal, V. K.; Dhar, K. L. Minor amides of Piper species. *Phytochemistry* **1988**, *27*(11), 3523–3527.
- Koul, S.; Koul, J. L.; Taneja, S. C.; Dhar, K. L.; Jamwal, D. S.; Singh, K.; Reen, R. K.; Singh, J. Structure-Activity Relationship of Piperine and its Synthetic Analogues for their Inhibitory Potentials of Rat Hepatic Microsomal Constitutive and Inducible Cytochrom P450 Activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 251–268.
- Koziol, M. J. Afrosimetric Estimation of Threshold Saponin Concentration for Bitterness in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *54*, 211–219.
- Kozukue, N.; Park, M.-S.; Choi, S.-H.; Lee, S.-U.; Ohnishi-Kameyama, M.; Levin, C. E.; Friedman, M. Kinetics of Light-Induced *Cis-Trans* Isomerization of Four Piperines and Their Levels in Ground Black Peppers as Determined by HPLC and LC/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7131–7139.
- Kuhn, C.; Bufe, B.; Winnig, M.; Hofmann, T.; Frank, O.; Behrens, M.; Lewtschenko, T.; Slack, J. P.; Ward, C. D.; Meyerhof, W. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10260–10265.
- Kuljanabhagavad, T.; Wink, M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem Rev.* **2009**, *8*, 473–490.
- Labruyère, B. Determination of Pungent Constituents of *Piper nigrum*. *J. Agric. Food Chem.* **1966**, *14*(5), 469–472.
- Ladenburg, A.; Roth, C. F. Nachweis der Identität von synthetischem Piperidin mit dem aus Piperin gewonnenen. *EurJIC* **1884**, *17*(1), 513–515.

Laugerette, F.; Passilly-Degrace, P.; Patris, B.; Niot, I.; Febbraio, M.; Montmayeur, J.-P.; Besnard, P. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*(11), 3177–3184.

Laugerette, F.; Gaillard, D.; Passilly-Degrace, P.; Niot, I.; Besnard, P. Do we taste fat? *Biochimie* **2007**, *89*, 265–269.

Lazurévskii, G. V.; Goryanu, G. M.; Kintya, P. K. Steroid glycosides from *Asparagus officinalis*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **1976**, *231*(6), 1479–1481.

Learmonth, D. A. A concise synthesis of the 3-O- $\beta$ -D- and 4'-O- $\beta$ -D-glucuronide conjugates of *trans*-resveratrol. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 262–267.

Lee, S. A.; Hong, S. S.; Han, X. H.; Hwang, J. S.; Oh, G. J.; Lee, K. S.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y.; Ro, J. S. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on monoamine oxidase and antidepressant-like activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2005**, *53*, 832–835.

Lee, S., W.; Rho, M.-C.; Park, H., R.; Choi, J.-H.; Kang, J., Y.; Lee, J., W.; Kim, K.; Lee, H., S.; Kim, Y., K. Inhibition of Diacylglycerol Acyltransferase by Alkamides Isolated from the Fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum*. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*(26), 9759–9763.

Leffingwell, J. C. Cooling Ingredients and Their Mechanism of Action. Reprinted from Handbook of cosmetic science and technology, 3. Auflage, Barel, A. O.; Paye, M.; Maibach, H. I. *Informa Healthcare* **2009** (Pub.), New York, 65, 661–675.

Li, C. Yu, B.; Liu, M.; Hui, Y. Synthesis of diosgenyl  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-  $\beta$ -D-glucopyranoside (gracillin) and related saponins. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 189–195.

Li, X.; Staszewski, L.; Xu, H.; Durick, K.; Zoller, M.; Adler, E. Human Receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 4692–4696.

Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, Z.; Cao, X.; Gao, K. Stereoselective synthesis of naturally occurring unsaturated amide alkaloids by a modified Ramberg-Bäcklund reaction. *Can. J. Chem.* **2004**, *82*, 622–630.

<sup>a</sup> Li, S.; Wang, C.; Li, W.; Koike, K.; Nikaido, T.; Wang, M. W. Antidepressant-like effects of piperine and its derivative, antiepilepsirine. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2007**, *9*, 421–430.

<sup>b</sup> Li, S.; Wang, C.; Wang, M.; Li, W.; Matsumoto, K.; Tang, Y. Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. *Life Sci.* **2007**, *80*, 1373–1381.

Liang, F.; Li, L.-J.; Abliz, Z.; Yang, Y.-C.; Shi, J.-G. Structural characterization of steroidal saponins by electrospray ionization and fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1168–1173.

Lin, Z.; Liao, Y.; Venkatasamy, R.; Hider, R.; Soumyanath, A. Amides from *Piper nigrum* L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 529–536.

Lindemann, B. Receptors and transduction in taste. *Nature* **2001**, *413*, 219–225.

LopezJimenez, N. D.; Cavenagh, M. M.; Sainz, E.; Cruz-Ithier, M. A.; Battey, J. F.; Sullivan, S. L. Two members of the TRPP family of ion channels, *Pkd113* and *Pkd211*, are co-expressed in subset of taste receptor cells. *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 68–77.

Ludwig, M. G.; Vanek, M.; Guerini, D.; Gasser, J. A.; Jones, C. E.; Junker, U.; Hofstetter, H.; Wolf, R. M.; Seuwen, K. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* **2003**, *425*, 93–98.

Macpherson, L. J.; Xiao, B.; Kwan, K. Y.; Petrus, M. J.; Dubin, A. E.; Hwang, S. W.; Cravatt, B.; Corey, D. P.; Patapoutian, A. An Ion Channel Essential for Sensing Chemical Damages. *J. neurosci.* **2007**, *27*(42), 11412–11415.

Maehashi, K., Matano, M.; Wang, H.; Vo, L. A.; Yamamoto, H.; Huang, L. Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 851–855.

Mandloi, D.; Sant, P. G. A Saponin from *Asparagus gonocladus*. *Phytochem.* **1981**, *20*(7), 1687–1688.

Matsumura, S.; Mizushige, T.; Yoneda, T.; Iwanaga, T.; Tsuzuki, S.; Inoue, K.; Fushiki, T. GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* **2007**, *28*(1), 49–55.

Matsunami, H.; Montmayeur, J.-P.; Buck, L. B. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **2000**, *404*, 601–604.

McKemy, D. D.; Neuhäusser, W. M.; Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **2002**, *416*, 53–58.

McNamara, F. N.; Randall, A.; Gunthorpe, M. J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *British Journal of pharmacology* **2005**, *144*, 781–790.

Menozzi-Smarrito, C.; Riera, C. E.; Munari, C.; Le Coutre, J.; Robert, F. Synthesis and Evaluation of New Alkylamides Derived from  $\alpha$ -Hydroxysanshool, the Pungent Molecule in Szechuan pepper. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1982–1089.

Meyerhof, W. Geschmacksfragen – Neues aus der Ernährungsforschung. Mechanismen der Geschmackswahrnehmung und ihre Auswirkung auf das Essverhalten. *Moderne Ernährung heute* **2003**, *1*, 1–5.

Meyerhof, W. Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2005**, *154*, 37–72.

Meyerhof, W.; Batram, C.; Kuhn, C.; Brockhoff, A.; Chudoba, E.; Bufe, B.; Appendino, G.; Behrens, M. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. *Cem. Senses* **2010**, *35*, 157–170.

Miyahara, K.; Kudo, K.; Kawasaki, T. Co-occurrence and high-performance liquid chromatographic separation of the glycosides of rhodea-sapogenin and its analogs with differ in F-ring structure. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 348–351.

Miyakado, M.; Nakayama, I.; Yoshioka, H.; Nakatani, N. The Piperaceae amides I: Structure of pipericide, a new insecticidal amide from *Piper nigrum* L. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*, 1609–1611.

Miyakado, M.; Nakayama, I.; Yoshioka, H.; Nakatani, N. Insecticidal joint action of pipericide and co-occurring compounds isolated from *Piper nigrum* L. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1701–1703.

Mizui, F.; Kasai, R.; Ohtani, K.; Tanaka, O. Saponins from brans of Quinoa, *Chenopodium quinoa* WILLD. I. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*(4), 1415–1418.

Morakawa, T.; Matsuda, H.; Yamaguchi, I.; Pongpiriyadacha, Y.; Yoshikawa, M. New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. *Planta Medica* **2004**, *70*(2), 152–159.

Morini, G.; Bassoli, A.; Temussi, P. A. From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding site of the human T1R2\_T1R3 receptor. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5520–5529.

Moyer, B.; Zlotnik, A.; Hevezi, P.; Soto, H.; Kalabat, D.; Lu, M.; Gao, N.; Servant, G.; White, E. C.; Brust, P.; Williams, M. Identification of TRPML3 (MCOLN3) as a salty taste receptor and use in assays for identifying taste (salty) modulators and/or therapeutics that modulate sodium transport, absorption or excretion and/or aldosterone, and/or vasopressin production or release. U.S. Pat. Appl. Publ. **2009**, US 2009210953 A1 20090820.

- Murakami, T.; Kishi, A.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Medicinal Foodstuffs. XVII. Fungreek Seed. (3): Structures of New Furostanol-Type Saponins, Trigoneosides Xa, Xb, Xlb, Xlla, Xllb, and Xllla, from the Seeds of Egyptian *Trigonella foenum-graecum* L.. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*(7), 994–1000.
- Nakamura, N.; Kiuchi, F.; Tsuda, Y. Infrared Spectra of Conjugated Amides: Reassignment of the C=O and C=C Absorption. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*(7), 2647–2651.
- Nakatani, N.; Inatani, R. Isobutyl Amides from Pepper (*Piper nigrum* L.). *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*(6), 1473–1476.
- Nelson, G.; Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Feng, L.; Zhao, G.; Ryba, N. J. P.; Zucker, C. S. An amino-acid taste receptor. *Nature* **2002**, *416*, 199–202.
- Nelson, T. M.; Munger, S. D.; Boughter Jr, J. D. Taste Sensitivities to PROP and PTC Vary Independently in Mice. *Chem. Senses* **2003**, *28*, 695–704.
- Ney, K. H. Aromaintensivierende Wirkung von L-Glutamat und ähnlichen Verbindungen. *Eur. Food Res. Technol.* **1971**, *146*, 141–143.
- Ney, K. H.; Freytag, W. Dimethylsulfid als wesentliche Komponente des Spargelaromas – Weitere Untersuchungen der flüchtigen Bestandteile des gekochten Spargels, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1972**, *149*, 154–155.
- Ney, K. H. Aromagrams– A New Approach to Flavor Characteristics and Discription. In Hrsg. Charalambous G.: *Flavors and Off-Flavors*. Elsevier, Amsterdam **1989**, 561–576.
- Oersted, H. C. Über das Piperin, ein neues Pflanzenalkaloid. *Schweigger's Journ. f. Chem. u. Phys.* **1820**, *29*(1), 80–82.
- Ohsu, T.; Amino, Y.; Nagasaki, H.; Yamanaka, T.; Takeshita, S.; Hatanaka, T.; Maruyama, Y.; Miyamura, N.; Eto, Y. Involvement of the Calcium-sensing Receptor in Human Taste Perception. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(2), 1016–1022.
- Okumura, Y.; Narukawa, M.; Iwasaki, Y.; Ishikawa, A.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M.; Watanabe, T. Activation of TRPV1 and TRPA1 by Black Pepper Components. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *5*, 1068–1072.
- Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Ploszynski, M.; Colquhoun, I. J.; Price, K. R.; Fenwick, G. R. Zahnic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 191–196.

Ott, E.; Zimmermann, K. Über natürliche und künstliche Pfefferstoffe und die Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Pfeffergeschmack. *Liebigs Ann. Chem* **1921**, 425(3), 314–337.

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.

<sup>a</sup> Ottinger, H.; Soldo, T.; Hofmann, T. Discovery and Structure Determination of a Novel Maillard-Derived Sweetness Enhancer by Application of the Comparative Taste Dilution Analysis (cTDA). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1035–1041.

<sup>b</sup> Ottinger, H.; Hofmann, T. Identification of the Taste Enhancer Alapyridaine in Beef Broth and Evaluation of Its Sensory Impact by Taste Reconstitution Experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6791–6796.

Pant, G.; Panwar, M. S.; Negi, D. S.; Rawat, M. S. M. Structure Elucidation of Spirostanol Glycoside from *Asparagus Officinalis* Fruits by Concerted Use of Two-Dimensional NMR Techniques. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, 26, 911–918.

Park, I.-K.; Lee, S. – G.; Shin, S. – C.; Park, J. – D.; Ahn, Y. – J.; Larvival Activity of Isobutylamides Identified in *Piper nigrum* Fruits against Three Mosquito Species. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1866–1870.

Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. Phytochemistry of the genus piper. *Phytochemistry* **1997**, 46(4), 597–673.

Parmentier, M. L.; Prezeau, L.; Bockaert, J.; Pin, J. P. A model for the functioning of family 3 PCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23(6), 268–274.

Peier, A. M.; Moqrich, A.; Hergarden, A. C; Reeve, A. J.; Andersson, D. A.; Stroy, G. M.; Earley, T. J.; Dragoni, I.; McIntyre P.; Bevan, S.; Patapoutian, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **2002**, 108, 705–715.

Pellissier, H. The glycosylation of steroids. *Tetrahedron* **2004**, 60, 5123–5162.

Pelzer, R.; Surburg, H.; Hopp, R. Mittel mit physiologischem Kühleffekt und für diese Mittel geeignete wirksame Verbindungen. Deutsches Patent, 2. November **1994**, 4 226 043.

Pin, J.-P.; Galvez, T.; Prézeau, L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. ther.* **2003**, 98, 325–354.



Pradeep, C. R.; Kuttan, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. *Clin. Exp. Metastasis*. **2002**, *19*, 703–708.

Pronin, A. N.; Tang, H.; Connor, J.; Keung, W. Identification of Ligands for Two Human Bitter T2R Receptors. *Chem. Senses* **2004**, *29*, 583–593.

Puri, R.; Wong, C. Solasodine and Diosgenin:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Assignments by Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Mag. Reson. Chem.* **1993**, *31*, 278–282.

Reen, R. K.; Wiebe, F. J.; Singh, J. Piperine inhibits aflatoxin B1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *58*(3), 165–173.

Rehnberg, B.G.; Hettinger, T.P.; Frank, M.E. Salivary ions and neural taste responses in the hamster. *Chem. Senses* **1992**, *17*, 179–190.

Rhener, G.; Daniel, H. Biochemie der Ernährung, 2. Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin **2002**.

Ribeiro, T. S.; Freire-de-Lima, L.; Previato, J. O.; Mendonca-Previato, L.; Heise, N.; de Lima, M. E. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3555–3558.

Richter, T. A.; Dvoryanchikov, G. A.; Chaudhari, N.; Roper, S. D. Acid-Sensing Ion Channel-2 is Not Necessary for Sour Taste in Mice. *J. Neurosci.* **2004**, *24*(16), 4088–4091.

Rimbach, G.; Möhring, J.; Erbersdobler, H. F. Gewürze in: Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger, Springer-Lehrbuch, **2010**, 259–281.

Roper, S. D. Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Eur. J. Physiol.* **2007**, *454*, 759–776.

Roth, L.; Kormann, K. Duftpflanzen, Pflanzendüfte: ätherische Öle und Riechstoffe. ecomed, Landsberg, **1996**.

Rotzoll, N.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Activity-guided identification of (S)-malic acid 1-O-D-glucopyranoside (morelid) and  $\gamma$ -aminobutyric acid as contributors to umami taste and mouth-drying oral sensation of morel mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4149–4156.

Rügheimer, L. Künstliches Piperin. *EurJIC* **1882**, *15*(1), 1390–1391.

Rychlik, M.; Asam, S. Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* **2009**, *21*, 470–482.

Sainz, E.; Cavenagh, M. M.; Gutiurrez, J.; Battey, J. F.; Northup, J. K. Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochem. J.* **2007**, *403*, 537–543.

Sandell, M. A.; Breslin, P. A. S. Variability in a taste-receptor gene determines whether we taste toxins in food. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 792–794.

Sato, H.; Sakamura, S. A Bitter Principle of Tomato Seeds Isolation and Structure of a New Furostanol Saponin. *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*(2), 225–231.

Sautour, M.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M-A. Steroidal saponins from *Asparagus acutifolius*. *Phytochemistry* **2007**, 2554–2562.

Scharbert, S.; Holzmann N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3498–3508.

Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular Definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5377–5384.

Scherb, J.; Kreissl, J.; Haupt, S.; Schieberle, P. Quantitation of S-Methylmethionine in Raw Vegetables and Green Malt by a Stable Isotope Dilution Assay Using LC-MS/MS: Comparison with Dimethyl Sulfide Formation after Heat Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*(19), 9091–9096.

Schieberle, P.; Hofmann, T. Auf den Geschmack gekommen – Die molekulare Welt des Lebensmittelgenusses. *Chem. Unserer Zeit* **2003**, *37*, 388–401.

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

Schwarz, B.; Hofmann, T. Sensory-Guided Decomposition of Red Current Juice (*Ribes rubrum*) and Structure Determination of Key Astringent Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1394–1404.

Schwarz, B.; Hofmann, T. Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1693–1698.

Schwarzbach, A. Vergleichende Untersuchungen zum Saponingehalt von *Asparagus officinalis*. Dissertation **2004**, TU Berlin.

Schwarzbach, A.; Schreiner, M.; Knorr, D. Effect of cultivars and deep freeze storage on saponin content of white asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.). *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 32–35.

Scott, I. M.; Gagnon, N.; Lesage, L.; Philogène, B. J.; Arnason, J. T. Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* **2005**, *98*, 845–855.

Scott, I. M.; Jensen, H. R.; Philogène, B. J. R.; Arnason, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem Rev* **2008**, *7*, 65–75.

Scoville, W. L. Note on Capsicums. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1912**, *1*, 453–454.

Sefkow, M. First efficient synthesis of chlorogenic acid. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1137–1141.

Selvendiran, K.; Banu, S. M.; Sakthisekaran, D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *350*, 73–78.

Shao, Y.; Poobrasert, O.; Kennelly, E. J.; Chin, C.-K.; Ho, C.-T.; Huang, M.T.; Garrison, S. A.; Cordell, G. A. Steroidal Saponins from *Asparagus officinalis* and Their Cytotoxic Activity. *Planta Med.* **1997**, *63*, 258–262.

Shchelochkova, A. P.; Pal'yants, N. Sh.; Koshoev, K. K.; Abubakirov N. K. Diosgenin and Neotigogenin Glucosides. *Chem. Nat. Compd.*, **1979**, *15*(1), 90.

Shimoyamada, M.; Suzuki, M.; Sonta, H.; Maruyama, M.; Okubo, K. Antifungal Activity of the Saponin Obtained from *Asparagus officinalis* L. and Its Active Principle. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *10*, 2553–2557.

Shimoyamada, M.; Suzuki, M.; Maruyama, M.; Watanabe, K. An Antifungal Saponin from white Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Bottoms. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *72*, 430–434.

Shimoyamada, M.; Nakashima, S.; Nakashima, K.; Okubo, K.; Watanabe, K. Antifungal Saponin from white Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Bottoms and Their Physiological Role in the Plant Defense System. In: Rai, M. K. *Plant-derived antimicrobials*. New York **2003**, 257 (278), 257–278.

Siddiqui, B. S.; Gulzar, T.; Begum, S.; Afshan, F.; Sattar, F. A. Two New Insecticidal Dimers from Fruits of *Piper nigrum* LINN. *Helvetica Chimica Acta*. **2004**, *87*, 660–666.

Singh, R.; Whitesides, G. M. Comparison of Rate Constants for Thiolate-Disulfide Interchange in Water and in Polar Aprotic Solvents Using Dynamic  $^1\text{H}$  NMR Line Shape Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1190–1197.

Smith, D. V.; Ossebaard, C. A. Amiloride suppression of the taste intensity of sodium chloride: evidence from direct magnitude scaling. *Physiol. Behav.* **1995**, *57*, 773–777.

Smith, D. V.; Margolskee, R. F. Making sense of taste. *Sci. Am.* **2001**, *284*, 32–39.

Soldo, T. Studien zu Struktur/Aktivitäts-Zusammenhängen und zur Bildung von kühlenden sowie geschmacksmodulierenden Verbindungen aus Zuckern und Aminosäuren. Dissertation **2005**, Technische Universität München.

Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H. *Lebensmitteltabelle für die Praxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 7. Auflage **2008**, 866–867.

Spring, F. S.; Stark, J. Piperettine from *Piper nigrum*; its isolation, identification, and synthesis. *J. Chem. Soc.* **1950**, 1177–1180.

Srinivasan, K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*(8), 735–748.

Stähler, F.; Riedel, K.; Demgensky, S.; Neumann, K.; Dunkel, A.; Täubert, A.; Raab, B.; Behrens, M.; Raguse, J.-D.; Hofmann, T.; Meyerhof, W. A Role of the Epithelial Sodium Channel in Human Salt Taste Transduction? *Chem. Percept.* **2008**, *1*, 78–90.

Stähler, F.; Meyerhof, W. Geschmackspräferenzen/Geschmacksaversionen wie Rezeptorzellen Nahrungspräferenzen prägen. *Schweizer Zeitschrift für Ernährungsmedizin* **2010**, *2*, 6–9.

Stark, T.; Hofmann, T. Isolation, Structure Determination, Synthesis, and Sensory Activity of *N*-Phenylpropanoyl-L-amino Acids from Cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5419–5428.

Stark, T.; Justus, H.; Hofmann, T. Quantitative Analysis of *N*-Phenylpropanoyl-L-amino Acids in Roasted Coffee and Cocoa Powder by Means of Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2859–2867.

Stark, T.; Bareuther, S.; Hofmann, T. Molecular Definition of the Taste of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) by Means of Quantitative Studies and Sensory Experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5530–5539.

Starckenmann, C.; Cayeux, I.; Decorzant, E.; Yang, E. X.-H.; Niclass, Y.; Nicolas, L. Taste Contribution of (*R*)-Strombine to Dried Scallop. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7938–7943.

<sup>a</sup> Steinhaus, M.; Schieberle, P. Characterization of Odorants Causing an Atypical Aroma in White Pepper Powder (*Piper nigrum* L.) Based on Quantitative Measurements and Ortho-nasal Breakthrough Thresholds. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6049–6055.

<sup>b</sup> Steinhaus, M.; Schieberle, P. Role of the Fermentation Process in Off-odorant Formation in White Pepper: On-site Trial in Thailand. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6056–6060.

Sterner, O.; Szallasi, A. Novel natural vanilloide receptor agonists: new therapeutic targets for drug development. *Trends in Pharmaceutical Science* **1999**, *20*, 459–465.

Stevens, D. R.; Seifer, R.; Bufe, B. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* **2001**, *413*, 631–635.

Story, G. M.; Peier, A. M.; Reeve, A. J.; Eid, S. R.; Mosbacher, J.; Hricik, T. R.; Earley, T. J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D. A.; Hwang, S. W.; McIntyre, P.; Jegler, T.; Bevan, S.; Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* **2003**, *112*, 819–829.

Sugai, E.; Morimitsu, Y.; Iwasaki, Y.; Morita, A.; Watanabe, T.; Kubota, K. Pungent Qualities of Sanshool-Related Compounds Evaluated by a Sensory Test and Activation of Rat TRPV1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*(10), 1951–1957.

Suhr, R. Synthese komplexer Steroidsaponin-Mimetika. Universität Hamburg, Dissertation, **2001**.

Sun, C.; Pei, S.; Pan, Y.; Shen, Z. Rapid structural determination of amides in *Piper longum* by high-performance liquid chromatography combined with ion trap mass spectrometry; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1497–1503.

Sun, Z.; Huang, X.; Kong, L. A new steroidal saponin from the dried stems of *Asparagus officinalis* L.. *Filoterapia* **2010**, *81*(3), 210–213.

Sunila, E. S.; Kuttan, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 339–346.

Tachdjian, C.; Patron, A. P.; Qi, M.; Adaminski-Werner, S.; Tang, X. Q.; Cheng, Q.; Darmohusodo, V.; Lebl-Rinnova, M.; Priest, C.; (Senomyx, Inc., USA); Aromatic amides and ureas and their uses as sweet and/or umami flavor modifiers, tastants and taste enhancers. U.S. Pat. Appl. Publ. **2006**, US 2006045953 A1 20060302.

Tainter, D. R.; Grenis, A. T. Spices and Seasonings: A Food Technology Handbook. 2. Auflage, Wiley Verlag, New York, **2001**.

Tanaka, O. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. *Trends in analytical chemistry* **1982**, *11*, 246–248.

Temussi, P. The history of sweet taste: not exactly a piece of cake. *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 188–199.

Teuscher, E. Biogene Arzneimittel, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **1997**, 5. Auflage, 350–354.

Toelstede, S.; Hofmann, T. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolites in Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2795–2804.

Toelstede, S.; Dunkel, A.; Hofmann, T. A Series of Kokumi Peptides Impart the Long-Lasting Mouthfulness of Matured Gouda Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1440–1448.

Tominaga, M.; Caterina, M. J.; Malmberg, A. B.; Rosen, T. A.; Gilbert, H.; Skinner, K.; Rammann, B. E.; Basbaum, A. I.; Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. **1998**, *21*, 531–543.

Tosun, F.; Tanker, M.; Coskun M.; Tosun, A. Determination of mdiosgenin in *Tribulus terrestris* L. growing in Turkey by HPLC. *Pharmacia* **1991**, *31*, 90–96.

Traxler, J. T. Piperanine, a Pungent Component of Black Pepper. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*(6), 1135–1138.

Treesukosol, Y.; Lyall, V.; Heck, G. L.; DeSimone, J. A.; Spector, A. C. A psychophysical and electrophysiological analysis of salt taste in *Trpv 1* null mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, R1799–R1809.

<sup>a</sup> Tressl, R.; Holzner, M.; Apetz, M. Formation of Flavor Components in Asparagus. 1. Biosynthesis of sulphur-containing acids in Asparagus, *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*(3), 455–459.

<sup>b</sup> Tressl, R.; Bahri, D.; Holzer, M.; Kossa, T. Formation of Flavor Components in Asparagus. 2. Formation of Flavor Components in Cooked Asparagus, *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*(3), 459–463.

Trevisani, M.; Smart, D.; Gunthorpe, M. J.; Tognetto, M.; Barbieri, M.; Campi, B.; Amatesi, S.; Gray, J.; Jerman, J. C.; Brough, S. J.; Owen, D.; Smith, G. D.; Randall, A. D.; Harrison, S.; Bianchi, A.; Davis, J. B.; Geppetti, P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nature Neuroscience* **2002**, *5*(6), 546–551.

<sup>a</sup> Tsukamoto, S.; Cha, B.-C.; Ohta, T. Dipiperamides A, B, and C: bisalkaloids from the white pepper *Piper nigrum* inhibiting CYP3A4 activity. *Tetrahedron* **2002**, *58*(9), 1667–1671.

<sup>b</sup> Tsukamoto, S.; Tomise, K.; Miyakawa, K.; Cha, B.-C.; Abe, T.; Hamada, T.; Hirota, H.; Ohta, T. CYP3A4 Inhibitory Activity of New Bisalkaloids, Dipiperamides D and E, and Cognates from White Pepper; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*(9), 2981–2985.

Tsuzuki, W.; Tsuzuki, S.; Hayamizu, K.; Kabayashi, S.; Suzuki, T. Conformation analysis of glycerides by nuclear magnetic resonance. *Chemistry and Physics of Lipids* **1994**, *76*, 93–102.

Ueda, Y.; Sakaguchi, M.; Hirayama, K.; Miyajima, R.; Kimizuka, A. Characteristic Flavour Constituents in Water Extract of Garlic. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*(1), 163–169.

Ueda, Y.; Tsubuku, T.; Miyajima, R. Composition of Sulfur-Containing Components in Onion and Their Flavor Characters. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 108–110.

Ueda, Y.; Yonemitsu, M.; Tsubuku, T.; Sakaguchi, M. Flavor Characteristics of Glutathione in Raw and Cooked Foodstuffs. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*(12), 1977–1980.

Ugawa, S.; Minami, Y.; Guo, W. Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature* **1998**, *395*, 555–556.

Ugawa, S.; Yamamoto, T.; Ueda, T.; Ispida, Y.; Inagaki, A.; Nishigaki, M.; Shimada, S. Amiloride-Intensive Currents of the Acid-Sensing Ion Channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b Heteromeric Sour-Taste Receptor Channel. *J. Neurosci.* **2003**, *23*(9), 3616–3622.

Ulrich, D.; Hoberg, E.; Bittner, T.; Engewald, W.; Meilchen, K. Contribution of volatile compounds to the flavor of cooked asparagus. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *231*, 200–204.

van der Wel, H.; Loeve, K. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *31*, 221–225.

Van der Klaauw, N. J.; Smith, D. Taste Quality Profiles for Fifteen Organic and Inorganic Salts. *Physiol. Behav.* **1995**, *58* (2), 295–306.

Van Heerden, F. R.; Brandt, E. V.; Roux, D. G. Isolation and synthesis of trans- and cis-(-)-clovamides and their deoxy analogues from the bark of *Dalbergia Melanoxylon*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2125–2129.

Veerareddy, P. R.; Vobalaboina, V.; Nahid, A. Formulation and evaluation of oil-in-water emulsions of piperine in visceral leishmaniasis. *Pharmazie* **2004**, *59*, 194–197.

Venkatachalam, K.; Montell, C. TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 387–417.

Venkatasamy, R. Synthesis and Biological Studies of Piperine Analogues for the Treatment of Vitiligo (in Englisch). PhD Thesis. **2003**, King's College London, Großbritannien.

Venkatasamy, R.; Faas, L.; Young, A. R.; Raman, A.; Hider, R. C. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1905–1920.

Vijayakumar, R. S.; Surya, D.; Nalini, N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* **2004**, *9*, 105–110.

Vijayakumar, R. S.; Nalini, N. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent from *Piper nigrum* on erythrocyte antioxidant status in high fat diet and antithyroid drug induced hyperlipidemic rats. *Cell Biochem. Funct.* **2006**, *24*, 491–498.

Wang, J.; Wu, X.; Simonavicius, N.; Tian, H.; Ling, L. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34457–34464.

Wang, L.; Wang, X.; Yuan, X.; Zhao, B. Simultaneous Analysis of Diosgenin and Sarsapogenin in *Asparagus officinalis* Byproduct by Thin-layer Chromatography. *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 14–17.

Wang, M.; Tadmor, Y.; Wu, Q.-L.; Chin, C.-K.; Garrison, S. A.; Simon, J. E. Quantification of Protodioscin and Rutin in *Asparagus* Shoots by LC/MS and HPLC Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6132–6136.

Wang, Y.; Ohtani, K.; Kasai, R.; Yamasaki, K. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus Terrestris*. *Phytochemistry* **1997**, *4*, 811–817.



Warmke, R.; Belitz, H. D.; Grosch, W. Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung* **1996**, *203*, 230–235.

Watson, H. R.; Hems, R.; Rowsell, D. G.; Spring, D. J. New compounds with the menthol cooling effect. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1978**, *29*, 185–200.

Wei, K.; Li, W.; Koike, K.; Pei, Y.; Chen, Y.; Nikaido, T. New amide alkaloids from the roots of *Piper nigrum*; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*(6), 1005–1009.

Weiss, E. A. *Spice Crops*. CABI Publishing, CAB International, New York, **2002**.

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

Womack, E. B.; McWhirter, J. *Organic Syntheses* **1955**, Collective Vol. 3, 714–15.

Wood, C.; Siebert, T.; Parker, M.; Capone, D. L.; Elsey, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J. From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3738–3744.

Wu, S.; Sun, C.; Pei, S.; Lu, Y.; Pan, Y. Preparative isolation of amides from the fruits of *Piper longum* L. by upright counter-current chromatography and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatography* **2004**, *1040*, 193–204.

Xu, H.; Staszewski, L.; Tang, H.; Adler, E.; Zoller, M.; Li, X. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (39), 14258–14263.

Yamada, H.; Nishizawa, M. Synthesis and Structure Revision of Intensely Sweet Saponin Osladin. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 387–397.

Yamaguchi, S. The Synergistic taste effect of monosodium glutamate and disodium 5'-inosate. *J. Food Sci.* **1967**, *32*(4), 473–487.

Yamaguchi, S.; Ninomya, K. Umami and food palatability. *Journal of Nutrition* **2000**, *130*, 921–926.

Yang, Y. C.; Lee, S. G.; Lee, H. K.; Kim, M. K.; Lee, S. H.; Lee, H. S. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3765–3767.

Yasumatsu, K.; Hario, N.; Murata, Y.; Shirotsaki, S.; Ohkuri, T.; Yoshida, R.; Ninomiya, Y. Multiple receptors underline glutamate taste responses in mice. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 747S–752S.

Yoon, K. D.; Kim, J. Preparative separation of dioscin derivatives from *Dioscorea villosa* by centrifugal partition chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 2486–2491.

Yoshikawa, M.; Xu, F.; Morikawa, T.; Komatsu, H.; Murakami, N.; Johji, Y.; Matsuda, H. Medicinal Foodstuffs. IV. Fungreek Seed. (1): Structures of Trigoneosides Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, and IIIb, New Furostanol Saponins from the Seeds of Indian *Trigonella foenum-graecum* L.. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*(1), 81–87.

Yoshikawa, M.; Xu, F.; Morikawa, T.; Pongpiriyadacha, Y.; Nakamura, S.; Asao, Y.; Kumahara, A.; Matsuda, H. Medicinal Flowers. XII. New Spirostane-Type Steroid Saponins with Anti-diabetogenic Activity from *Borassus flabellifer*. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*(2), 308–316.

Zhang, H.-J.; Kongmany, S.; Tan, G. T.; Ma, C.; Southavong, B.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. S. Biactive Constituents from *Asparagus cochinchinensis*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 194–200.

Zhang, Y.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Cook, B.; Wu, D.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J. P. Coding of sweet, bitter and umami tastes: different receptor cells sharing similar signal pathways. *Cell* **2003**, *112*, 293–301.

Zhang, F.; Klebansky, B.; Fine, R. M.; Xu, R. M.; Pronin, A.; Liu, H.; Tachdjian, C.; Li, X. Molecular mechanism for the umami taste synergism. *PNAS* **2008**, *105*(52), 20930–20934.

Zhao, G. Q.; Zhang, Y.; Hoon M. A.; Chandrashekar, J.; Erlenbach, I.; Ryba N. J. P.; Zuker, C. The receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste. *Cell* **2003**, *115*, 255–266.

Zheng, Q. – A.; Zhang, Y. – J.; Li, H. – Z.; Yang, C. – R. Steroidal saponins from fresh stem of *Dracaena cochinchinensis*. *Steroids* **2004**, *69*, 111–119.

Zhou, L. – B.; Chen, T. – H.; Bastow, K. F.; Shibano, M.; Lee, K. – H.; Chen, D. – F. Filiosapinosides A – D, Cytotoxic Steroidal Saponins from the Roots of *Asparagus filicinus*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*(8), 1263–1267.

## 8 Anhang

Im Anhang sind neben einigen Ausbeuten von Fraktionen, die aus *Asparagus officinalis* L. gewonnen wurden, die Strukturen mit Atomnummern und NMR-Daten der in Kapitel 3 beschriebenen Saponine und Sapogenine zusammengefasst. Die Bezifferung der Kohlenstoffatome bezieht sich auf die Strukturen in Abbildung 91. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Saponine und Sapogenine wurden bei 500 MHz, die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bei 125 MHz in Pyridin- $d_5$  + MeOD (95/5; v/v) aufgenommen.

**Tabelle 17: Ausbeuten der Methanolextrakte und Rückstände des rohen beziehungsweise gekochten weißen Spargels, der Spargelschale und des Kochwassers bezogen auf 100 g Frischmasse.**

Extrakte	Ausbeute [g/ 100 g Frischmasse]	
	Methanol-Wasserextrakt	Rückstand
Weißer Spargel, geschält roh	3,6528	4,6081
Weißer Spargel, geschält gekocht	1,8628	4,6580
Kochwasser	1,7502	–
Weißer Spargelschalen, roh <sup>a</sup>	3,2804	5,0996

<sup>a</sup> bezogen auf 100 g Schalenfrischmasse

**Tabelle 18: Ausbeuten der verschiedenen Lösungsmittelextrakte aus geschältem rohem und gekochtem weißem Spargel, rohen, weißen Spargelschalen und dem Kochwasser bezogen auf 100 g frischen, weißen Grolim-Spargel.**

Extrakte	Ausbeute [g/100 g Frischmasse]			
	Weißer Spargel roh	Weißer Spargel gekocht	Weißer Spargel Kochwasser	Weißer Spargel-schalen
Methanol/Wasser	3,6528	1,8628	1,7502	3,2804
Pentan	0,1999	0,4372	0,1560	0,2103
Dichlormethan	0,2048	0,0616	0,1904	0,1802
Ethylacetat	0,0921	0,0308	0,0289	0,0671
Wasser	3,3831	1,2210	1,2290	2,8974

**Tabelle 19: Anteil der Subfraktionen des Ethylacetatextraktes bezogen auf den Spargel-gesamtextrakt.**

Fraktion	Anteil an Ethylacetat-fraktion [g/100 g]	Anteil an Spargel [g/100 g]
EtOAc-0/100-MeOH/H <sub>2</sub> O	57,73	0,0515
EtOAc-30/70-MeOH/H <sub>2</sub> O	4,96	0,0045
EtOAc-70/30-MeOH/H <sub>2</sub> O	6,85	0,0063
EtOAc-100/0-MeOH/H <sub>2</sub> O	9,65	0,0087

Tabelle 20: Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale (400 MHz, DMSO + D<sub>2</sub>O; 95/5; v/v) und  $^{13}\text{C}$  NMR-Signale (100 MHz, DMSO + D<sub>2</sub>O; 95/5; v/v) von **2** und **3**.<sup>a-b</sup>

Position	<b>2 (α)</b>				<b>3 (β)</b>			
	$\delta_{\text{C}}$ / ppm	HSQC	$\delta_{\text{H}}$ / ppm	M [J Hz]	$\delta_{\text{C}}$ / ppm	HSQC	$\delta_{\text{H}}$ / ppm	M [J Hz]
3	41.5	[CH <sub>2</sub> ]	3.27-3.34	m	41.5	[CH <sub>2</sub> ]	3.27-3.34	m
			3.35-3.45	m			3.35-3.45	m
4	50.2	[CH	3.56-3.64	m <sup>c</sup>	50.2	[CH	3.56-3.64	m <sup>c</sup>
5	41.5	[CH <sub>2</sub> ]	3.27-3.34	m	41.5	[CH <sub>2</sub> ]	3.27-3.34	m
			3.35-3.45	m			3.35-3.45	m
6	171.9	[C]	—	—	171.9	[C	—	—
1'	92.5	[CH]	4.87	d [J=3.6]	97.2	[CH]	4.27	d [J=7.9]
2'	72.4	[CH]	3.02-3.14	m	74.9	[CH]	2.89	t [J=8.4]
3'	73.5	[CH]	3.35-3.43	m	76.5	[CH]	3.02-3.14	m
4'	70.7	[CH]	3.02-3.14	m	70.2	[CH]	3.02-3.14	m
5'	69.3	[CH]	3.73-3.77	m	73.0	[CH]	3.27-3.45	m
6'	65.0	[CH <sub>2</sub> ]	4.02-4.10	m	65.0	[CH <sub>2</sub> ]	4.02-4.10	m
			4.25-4.32	m			4.25-4.32	m

<sup>a</sup> Nummerierung bezieht sich auf die Strukturen **2** und **3** in Abbildung 22. <sup>b</sup> Zuordnungen wurden mittels HSQC-, HMBC-, DEPT- und COSY-Experiments getroffen. <sup>c</sup> Überlappungen mit dem D<sub>2</sub>O-Signal.

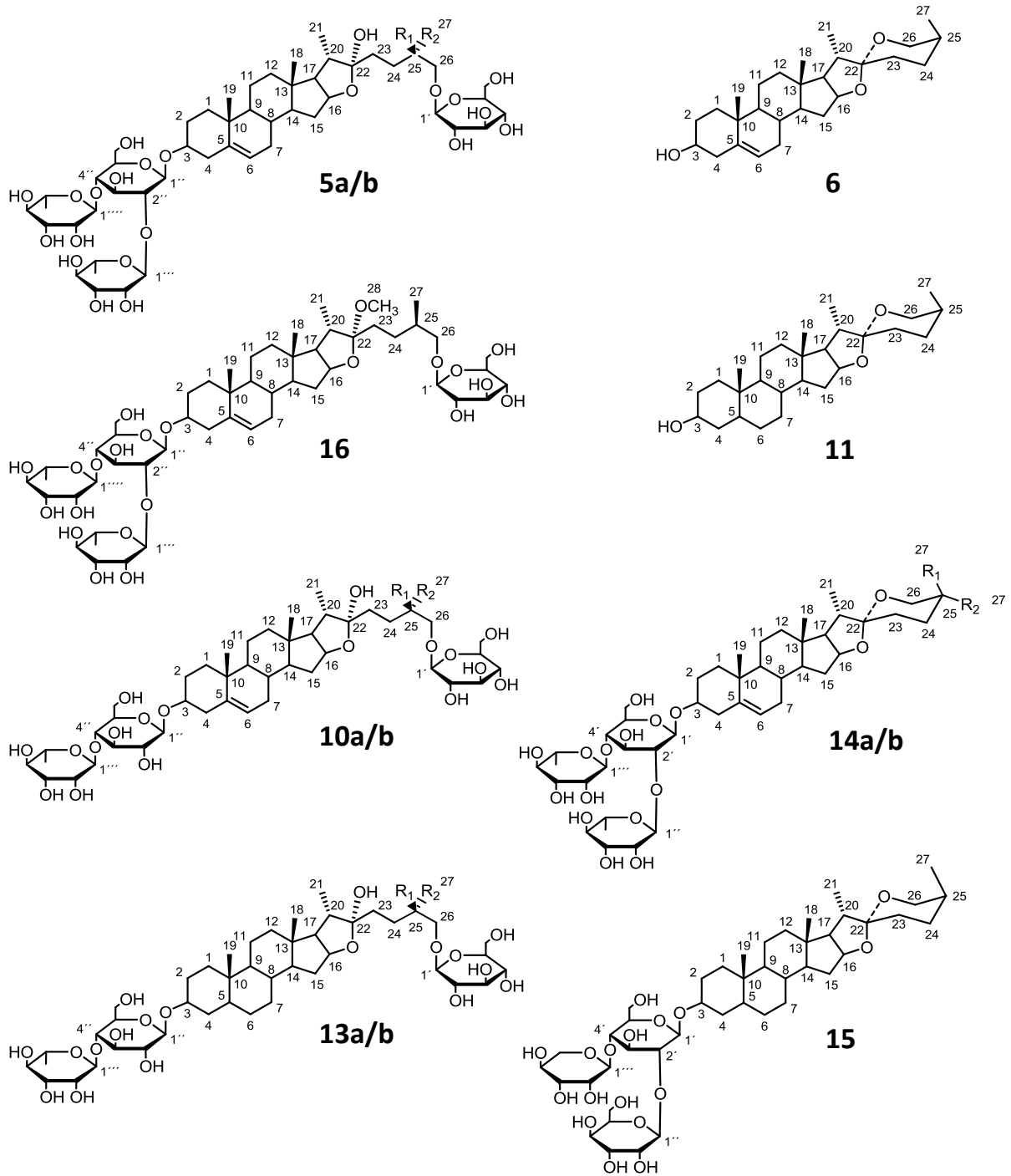


Abbildung 91: Sapogenine und Saponine mit Atomnummern, deren spektroskopische Daten in dieser Arbeit aufgeführt sind.

Tabelle 21: NMR-Daten von Diosgenin (6) und Sarsapogenin (11).

Position	6				11			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
1	37.8	[CH <sub>2</sub> ]	1.04-1.10	m	30.6	[CH <sub>2</sub> ]	1.32-1.46	m
			1.76-1.82	m			1.82-1.94	m
2	32.5	[CH <sub>2</sub> ]	1.67-1.81	m	28.6	[CH <sub>2</sub> ]	1.50-1.62	m
			1.98-2.08	m			1.68-1.76	m
3	71.1	[CH]	3.77-3.83	m	66.1	[CH]	4.35-4.39	m
4	43.4	[CH <sub>2</sub> ]	2.56-2.61	m	34.4	[CH <sub>2</sub> ]	1.50-1.62	m
							1.99-2.07	m
5	141.9	[C]	—	—	37.1	[CH]	2.08-2.16	m
6	121.0	[CH]	5.37	br. d [J=5.2]	27.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.10-1.20	m
							1.82-1.92	m
7	32.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.47-1.66	m	26.9	[CH <sub>2</sub> ]	0.96-1.04	m
			1.88-1.97	m			1.32-1.46	m
8	31.7	[CH]	1.47-1.66	m	35.6	[CH]	1.51-1.60	m
9	50.4	[CH]	0.90-0.97	m	40.1	[CH]	1.32-1.46	m
10	37.0	[C]	—	—	35.6	[C]	—	—
11	21.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.39-1.46	m	21.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.21-1.26	m
			1.39-1.46	m			1.32-1.46	m
12	39.9	[CH <sub>2</sub> ]	1.04-1.10	m	40.4	[CH <sub>2</sub> ]	1.10-1.20	m
			1.67-1.81	m			1.68-1.76	m
13	40.5	[C]	—	—	40.9	[C]	—	—
14	56.7	[CH]	1.04-1.10	m	56.6	[CH]	1.09-1.14	m
15	32.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.39-1.46	m	32.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.32-1.46	m
			1.98-2.08	m			1.96-2.10	m
16	81.1	[CH]	4.49-4.56	m	81.4	[CH]	4.58	ddd [J=6.6, 7.4, 8.6]
							1.84	dd [J=7.3, 8.6]
17	62.8	[CH]	1.76-1.82	m	63.0	[CH]	1.84	dd [J=7.3, 8.6]
18	16.4	[CH <sub>3</sub> ]	0.84	s	16.6	[CH <sub>3</sub> ]	0.85	s
19	19.5	[CH <sub>3</sub> ]	1.06	s	24.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.01	s
20	41.9	[CH]	1.88-1.97	m	42.5	[CH]	1.82-1.94	m
21	14.9	[CH <sub>3</sub> ]	1.12	d [J=6.8]	14.9	[CH <sub>3</sub> ]	1.15	d [J=6.8]
22	109.0	[C]	—	—	109.7	[C]	—	—
23	31.8	[CH <sub>2</sub> ]	1.47-1.66	m	26.4	[CH <sub>2</sub> ]	1.32-1.46	m
			1.67-1.81	m			1.82-1.92	m
24	29.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.47-1.66	m	26.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.32-1.46	m
			1.67-1.81	m			2.08-2.16	m
25	30.6	[CH]	1.47-1.66	m	27.6	[CH]	1.49-1.61	m
26	66.8	[CH <sub>2</sub> ]	3.45-3.51	m	65.0	[CH <sub>2</sub> ]	3.35	br. d [J=10.8]
			3.56	dd [J=3.6, 11.2]			4.06	dd [J=3.2, 11.1]
27	17.2	[CH <sub>3</sub> ]	0.68	d [J=5.8]	16.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.06	d [J=7.3]

Tabelle 22: Aglycon-NMR-Daten C(1) bis C(15) von Protodioscin und Protoneodioscin (5a/b) und Protodioscin (5a).

Position	5a/b				5a			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
1	37.4	[CH <sub>2</sub> ]	0.90-0.97 1.67-1.76	m (o) m (o)	37.5	[CH <sub>2</sub> ]	0.92-1.01 1.69-1.77	m m
2	30.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.77-1.93 1.95-2.10	m (o) m (o)	30.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.77-1.94 1.94-2.09	m m
3	78.3	[CH]	3.77-3.93	m	78.1	[CH]	3.80-3.94	m
4	38.9	[CH <sub>2</sub> ]	2.62-2.71 2.72-2.80	m m	38.9	[CH <sub>2</sub> ]	2.64-2.73 2.73-2.80	m m
5	140.7	[C]	—	—	140.8	[C]	—	—
6	121.8	[CH]	5.09-5.31	m	121.8	[CH]	5.27-5.33	m
7	32.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.34-1.48 1.77-1.93	m m	32.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.35-1.50 1.77-1.94	m m
8	31.6	[CH]	1.77-1.93	m	31.7	[CH]	1.77-1.94	m
9	50.2	[CH]	0.81-0.91	m	50.3	[CH]	0.84-0.92	m
10	37.0	[C]	—	—	37.1	[C]	—	—
11	21.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.34- 1.48 <sup>a</sup> 1.34- 1.48 <sup>a</sup>	m m m	21.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.35-1.50 <sup>a</sup> 1.35-1.50 <sup>a</sup>	m m
12	39.8	[CH <sub>2</sub> ]	0.98-1.15 1.67-1.76	m m	39.9	[CH <sub>2</sub> ]	1.01-1.19 1.69-1.77	m m
13	40.7	[C]	—	—	40.8	[C]	—	—
14	56.5	[CH]	0.97-1.14	m	56.6	[CH]	1.01-1.19	m
15	32.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.34-1.48 1.95-2.10	m m	32.4	[CH <sub>2</sub> ]	1.35-1.50 1.94-2.09	m m

<sup>a</sup>fallen zusammen.



Tabelle 23: Aglycon-NMR-Daten C(16) bis C(28) von Protodioscin und Protoneodioscin (5a/b) und Protodioscin (5a).

Position	5a/b				5a			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
16	81.0	[CH]	4.84-4.94	m	81.0	[CH]	4.81-4.95	m
17	63.7	[CH]	1.77-1.93	m	63.8	[CH]	1.77-1.94	m
18	16.3	[CH <sub>3</sub> ]	0.85	s	16.4	[CH <sub>3</sub> ]	0.87	s
19	19.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.01	s	19.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.03	s
20	40.5	[CH]	2.16-2.23	m	40.6	[CH]	2.17-2.24	m
21	16.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.27	d	16.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.30	d
				[J=7.0]				[J=7.0]
22	110.5	[C]	—	—	110.5	[C]	—	—
23	37.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.60-1.75	m	37.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.69-1.77	m
			1.95-2.10	m			1.94-2.09	m
24	28.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.60-1.75	m	28.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.61-1.69	m
			1.95-2.10	m			1.94-2.09	m
	28.15 <sup>#</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	1.60-1.75 <sup>#</sup>	m				
			1.95-2.10 <sup>#</sup>	m				
25	34.2 <sup>b</sup>	[CH]	1.67-1.76	m	34.3	[CH]	1.77-1.94	m
	34.3 <sup>b, #</sup>	[CH]	1.77-1.93 <sup>#</sup>	m				
26	74.9	[CH <sub>2</sub> ]	3.93-3.99	m	75.2	[CH <sub>2</sub> ]	3.80-3.94	m
			4.00-4.07	m			3.94-4.00	m
	75.0 <sup>#</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	3.93-3.99 <sup>#</sup>	m				
			4.00-4.07 <sup>#</sup>	m				
27	17.3 <sup>a</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	0.99	d	17.4	[CH <sub>3</sub> ]	0.97	d
				[J=6.6]				[J=6.6]
	17.3 <sup>#, a</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	0.95 <sup>#</sup>	d				
				[J=6.6]				

<sup>#</sup>gehören zu dem Epimer; <sup>a</sup>fallen zusammen; <sup>b</sup>möglicherweise vertauscht.

Tabelle 24: Zucker-NMR-Daten von 5a/b und reinem Protodioscin 5a.

Position	5a/b				5a			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [J/Hz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [J/Hz]
26-O-Glc								
1'	105.0	[CH]	4.98	d [J=7.8]	104.8	[CH]	4.78	d [J=7.6]
	104.8 <sup>#</sup>	[CH]	4.76 <sup>#</sup>	d [J=7.6]				
2'	74.9	[CH]	3.93-4.00	m	75.0	[CH]	3.94-4.00	m
3'	78.3 <sup>a</sup>	[CH]	3.53-3.66	m	78.4	[CH]	3.80-3.94	m
4'	71.4	[CH]	4.12-4.23	m	71.5	[CH]	4.12-4.22	m
5'	78.3 <sup>a</sup>	[CH]	4.24-4.36	m	78.3	[CH]	4.25-4.37	m
6'	62.5	[CH <sub>2</sub> ]	4.24-4.36	m	62.5	[CH <sub>2</sub> ]	4.25-4.37	m
			4.44-4.51	m			4.45-4.53	m
3-O-Glc								
1''	100.1	[CH]	4.90	br. s [J=7.7] <sup>b</sup>	100.2	[CH]	4.91	d [J=7.8]
2''	78.3 <sup>a</sup>	[CH]	4.12-4.23	m	78.4	[CH]	4.12-4.22	m
3''	76.8	[CH]	3.56-3.66	m	76.8	[CH]	3.55-3.65	m
4''	78.0	[CH]	4.24-4.36	m	78.4	[CH]	4.25-4.36	m
5''	77.7	[CH]	4.12-4.23	m	77.7	[CH]	4.12-4.22	m
6''	60.9	[CH <sub>2</sub> ]	4.00-4.07	m	61.1	[CH <sub>2</sub> ]	4.04	dd [J=3.4, 12.5]
			4.12-4.24	m			4.12-4.22	m
2''-O-Rha								
1'''	101.9	[CH]	6.33	br. s [J=2.6] <sup>b</sup>	102.0	[CH]	6.33	br. s [J=2.6] <sup>b</sup>
2'''	72.2	[CH]	4.70-4.75	m	72.4	[CH]	4.74-4.79	m
3'''	72.4	[CH]	4.59-4.64	m	72.5	[CH]	4.55-4.59	m
4'''	73.3	[CH]	4.24-4.36	m	73.7	[CH]	4.12-4.22	m
5'''	69.4	[CH]	4.84-4.95	m	69.5	[CH]	4.81-4.95	m
6'''	18.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.70-1.75	m	18.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.73	d [J=6.2]
4''-O-Rha								
1''''	102.7	[CH]	5.78	br. s [J=2.6] <sup>b</sup>	102.8	[CH]	5.78	br. s [J=2.6] <sup>b</sup>
2''''	72.5 <sup>c</sup>	[CH]	4.59-4.64	m	72.5 <sup>c</sup>	[CH]	4.60-4.65	m
3''''	72.2 <sup>c</sup>	[CH]	4.52-4.58	m	72.4 <sup>c</sup>	[CH]	4.45-4.53	m
4''''	73.5	[CH]	4.24-4.36	m	73.9	[CH]	4.12-4.22	m
5''''	70.2	[CH]	4.84-4.95	m (o)	70.4	[CH]	4.81-4.95	m
6''''	18.5	[CH <sub>3</sub> ]	1.58	d [J=6.1]	18.6	[CH <sub>3</sub> ]	1.59	d [J=6.2]

<sup>#</sup>gehören zu dem Epimer; <sup>a</sup>fallen zusammen; <sup>b</sup>aus dem J-resolved-Spektrum herausgelesen; <sup>c</sup>möglicherweise vertauscht.

**Tabelle 25: Aglycon-NMR-Daten C(1) bis C(15) von ASP-II und seinem (25S)-Epimer (10a/b) sowie von Dihydro-ASP-II und seinem (25S)-Epimer (13a/b).**

Position	10a/b				13a/b			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
1	37.0	[CH <sub>2</sub> ]	0.89-0.96 1.66-1.73	m m	30.7	[CH <sub>2</sub> ]	1.34-1.58 1.59-1.78	m m
2	30.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.78-1.94 1.94-2.11	m m	26.8	[CH <sub>2</sub> ]	1.34-1.58 1.78-2.10	m m
3	78.0	[CH]	3.76-3.89	m	74.5	[CH]	4.13-4.24	m
4	38.8	[CH <sub>2</sub> ]	2.60-2.70 2.70-2.77	m m	30.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.59-1.78 1.59-1.78	m m
5	140.8	[C]	—	—	36.7	[CH]	1.95-2.11	m
6	121.6	[CH]	5.08-5.52	m	26.5	[CH <sub>2</sub> ]	1.01-1.12 1.59-1.78	m m
7	32.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.29-1.46 1.78-1.94	m m	26.8	[CH <sub>2</sub> ]	0.86-0.98 1.12-1.34	m m
8	31.7	[CH]	1.46-1.57	m	35.2	[CH]	1.34-1.58	m
9	50.2	[CH]	0.82-0.87	m	40.2	[CH]	1.12-1.34	m
10	37.2	[C]	—	—	35.3	[C]	—	—
11	21.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.31-1.46 1.31-1.46	m m	21.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.12-1.34 1.12-1.34	m m
12	39.9	[CH <sub>2</sub> ]	1.05-1.14 1.66-1.78	m m	40.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.59-1.78 2.17-2.24	m m
13	40.7	[C]	—	—	41.2	[C]	—	—
14	56.5	[CH]	0.96-1.05	m	56.2	[CH]	1.02-1.12	m
15	32.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.31-1.46 1.94-2.12	m m	32.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.34-1.58 1.95-2.11	m m

Tabelle 26: Aglycon-NMR-Daten C(16) bis C(27) von ASP-II und seinem (25S)-Epimer (10a/b) sowie von Dihydro-ASP-II und seinem (25S)-Epimer (13a/b).

Position	10a/b				13a/b			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
16	81.0	[CH]	4.84-4.97	m	81.2	[CH]	4.90-4.98	m
17	63.6	[CH]	1.78-1.94	m	63.9	[CH]	1.78-1.95	m
18	16.3	[CH <sub>3</sub> ]	0.83	s	16.7	[CH <sub>3</sub> ]	0.84	s
19	19.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.00	s	23.6	[CH <sub>3</sub> ]	0.81	s
20	40.5	[CH]	2.14-2.21	m	40.6	[CH]	2.17-2.25	m
21	16.1	[CH <sub>3</sub> ]	1.29	d	16.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.30	d
				[J=7.0]				[J=7.0]
22	110.6	[C]	—	—	110.5	[C]	—	—
23	37.0	[CH <sub>3</sub> ]	1.66-1.78	m	36.9	[CH <sub>2</sub> ]	1.59-1.78	m
			1.78-1.94	m			1.95-2.11	m
24	28.2	[CH <sub>3</sub> ]	1.57-1.66	m	28.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.59-1.78	m
			1.94-2.12	m			1.95-2.11	m
	28.2 <sup>#,a</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	1.57-	m	28.1 <sup>#,a</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	1.59-1.78 <sup>#</sup>	m
			1.66 <sup>#</sup>					
			1.94-	m			1.95-2.11 <sup>#</sup>	m
			2.12 <sup>#</sup>					
25	34.0	[CH]	1.78-1.94	m	34.2	[CH]	1.78-2.10	m
	34.0 <sup>#,a</sup>	[CH]	1.78-	m	34.4 <sup>#</sup>	[CH]	1.78-2.10 <sup>#</sup>	m
			1.94 <sup>#</sup>					
26	75.1	[CH <sub>2</sub> ]	3.44-3.48	m	75.2	[CH <sub>2</sub> ]	3.93-4.02	m
			4.03-4.07	m			4.02-4.13	m
	75.1 <sup>#,a</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	3.44-	m	75.3 <sup>#</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	3.93-4.02 <sup>#</sup>	m
			3.48 <sup>#</sup>					
			4.03-	m			4.02-4.13 <sup>#</sup>	m
			4.07 <sup>#</sup>					
27	17.3	[CH <sub>3</sub> ]	0.95	d	17.4 <sup>a</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	0.95	d
				[J=6.7]				[J=6.6]
	17.3 <sup>#,a</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	1.00 <sup>#</sup>	d	17.4 <sup>#,a</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	1.00 <sup>#</sup>	d
				[J=6.7]				[J=6.6]

<sup>#</sup>gehören zu dem Epimer; <sup>a</sup>fallen zusammen; <sup>b</sup>möglicherweise vertauscht.

Tabelle 27: Zucker-NMR-Daten von ASP-II und seinem (25S)-Epimer (10a/b) sowie von Dihydro-ASP-II und seinem (25S)-Epimer (13a/b).

Position	10a/b				13a/b			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
26-O-Glc								
1'	104.8	[CH]	5.06	d [J=7.8]	105.0	[CH]	5.12	d [J=7.8]
	104.6 <sup>#</sup>	[CH]	4.77 <sup>#</sup>	d [J=7.7]	104.7 <sup>#</sup>	[CH]	4.78 <sup>#</sup>	d [J=7.6]
2'	74.9	[CH]	3.88-3.98	m	74.9	[CH]	3.93-4.02	m
3'	78.3	[CH]	3.75-3.88	m	78.4	[CH]	3.89-3.93	m
4'	71.5	[CH]	4.07-4.21	m	71.5	[CH]	4.13-4.26	m
5'	78.3	[CH]	4.21-4.35	m	78.4	[CH]	4.26-4.38	m
6'	62.5	[CH <sub>2</sub> ]	4.21-4.35	m	62.6	[CH <sub>2</sub> ]	4.26-4.38	m
			4.44-4.48	m			4.54-4.58	m
3-O-Glc								
1''	102.1	[CH]	4.94	d [J=7.7]	102.9	[CH]	4.83	d [J=7.6]
2''	74.9	[CH]	3.88-3.98	m	74.9	[CH]	4.03-4.13	m
3''	76.9	[CH]	4.07-4.21	m	76.5	[CH]	4.13-4.26	m
4''	78.2	[CH]	4.21-4.35	m	78.2	[CH]	4.42-4.48	m
5''	77.9	[CH]	3.55-3.68	m	77.1	[CH]	3.65-3.70	m
6''	61.3	[CH <sub>2</sub> ]	4.03-4.07	m	61.4	[CH <sub>2</sub> ]	4.03-4.13	m
			4.21-4.35	m			4.13-4.26	m
4''-O-Rha								
1'''	101.6	[CH]	6.29	br. s [J=2.5] <sup>a</sup>	102.6	[CH]	5.88	br. s [J=2.8] <sup>a</sup>
2'''	72.3 <sup>b</sup>	[CH]	4.54-4.64	m	72.5 <sup>b</sup>	[CH]	4.67-4.69	m
3'''	72.4 <sup>b</sup>	[CH]	4.49-4.54	m	72.6 <sup>b</sup>	[CH]	4.54-4.58	m
4'''	73.9	[CH]	4.21-4.35	m	73.9	[CH]	4.26-4.38	m
5'''	70.3	[CH]	4.91-4.97	m	70.2	[CH]	4.98-5.04	m
6'''	18.5	[CH <sub>3</sub> ]	1.68	d [J=6.4]	18.5	[CH <sub>3</sub> ]	1.69	d [J=6.2]

<sup>a</sup>aus dem *J*-resolved-Spektrum herausgelesen; <sup>b</sup>möglicherweise vertauscht; <sup>#</sup>gehören zu dem Epimer.

Tabelle 28: Aglycon-NMR-Daten C(1) bis C(15) von AS-2-I und Dioscin (14a/b) sowie von AS-1 (15).

Position	14a/b				15			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
1	37.4	[CH <sub>2</sub> ]	0.88-0.94 1.66-1.76	m m	30.7	[CH <sub>2</sub> ]	1.36-1.50 1.70-1.82	m m
2	30.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.76-1.86 2.01-2.11	m m	26.8	[CH <sub>2</sub> ]	1.36-1.48 1.82-1.89	m m
3	78.3	[CH]	3.75-3.85	m	75.3	[CH]	4.11-4.22	m
4	39.0	[CH <sub>2</sub> ]	2.58-2.67 2.68-2.75	m m	30.7	[CH <sub>2</sub> ]	1.70-1.82 1.70-1.82	m m
5	140.9	[C]	—	—	36.5	[CH]	2.05-2.17	m
6	121.9	[CH]	5.23-5.29	m	26.6	[CH <sub>2</sub> ]	1.11-1.20 1.70-1.82	m m
7	32.4	[CH <sub>2</sub> ]	1.28-1.44 1.76-1.86	m m	26.8	[CH <sub>2</sub> ]	0.88-0.94 1.18-1.36	m m
8	31.8	[CH]	1.44 1.58	m	35.5	[CH]	1.50-1.61	m
9	50.4	[CH]	0.79-0.88	m	40.2	[CH]	1.18-1.36	m
10	37.6	[C]	—	—	35.8	[C]	—	—
11	21.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.28-1.44 1.28-1.44	m m	21.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.18-1.36 1.36-1.50	m m
12	40.0	[CH <sub>2</sub> ]	0.95-1.11 1.61-1.66	m m	40.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.11-1.18 1.70-1.82	m m
13	40.5	[C]	—	—	40.7	[C]	—	—
14	56.7	[CH]	0.88-1.10	m	56.2	[CH]	1.01-1.15	m
15	32.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.28-1.44 1.93-2.01	m m	32.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.36-1.48 2.05-2.17	m m

\*möglicherweise vertauscht.

Tabelle 29: Aglykon-NMR-Daten C(16) bis C(27) von AS-2-I und Dioscin (14a/b) sowie von AS-1 (15).

Position	14a/b				15			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
16	81.2	[CH]	4.38-4.48	m	81.3	[CH]	4.49-4.54	m
	81.3 <sup>#</sup>	[CH]	4.07-4.18	m				
17	62.8	[CH]	1.70-1.76	m	62.9	[CH]	1.82-1.89	m
	62.9 <sup>#</sup>	[CH]	1.70-1.76	m				
18	16.4 <sup>*</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	0.76	s	16.4	[CH <sub>3</sub> ]	0.83	s
19	19.4	[CH <sub>3</sub> ]	0.99	s	23.6	[CH <sub>3</sub> ]	0.98	s
20	42.0	[CH]	1.86-1.92	m	42.2	[CH]	1.92-1.99	m
	42.5 <sup>#</sup>	[CH]	1.76-1.86	m				
21	14.9	[CH <sub>3</sub> ]	1.04-1.11	m	14.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.10	d [J=6.9]
	15.0 <sup>#</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	1.04-1.11	m				
22	109.4	[C]	—	—	109.6	[C]	—	—
	109.8 <sup>#</sup>	[C]	—	—				
23	31.9	[CH <sub>2</sub> ]	1.28-1.44	m	26.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.18-1.36	m
			1.91-2.02	m			1.82-1.89	m
	26.4 <sup>#</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	1.28-1.44	m			1.76-1.86	m
24	29.3	[CH <sub>2</sub> ]	1.44-1.58	m	26.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.36-1.48	m
			1.70-1.76	m			2.05-2.17	m
	26.2 <sup>#</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	1.28-1.44	m			2.02-2.11	m
25	30.7	[CH]	1.44-1.58	m	27.5	[CH]	1.50-1.61	m
	27.6 <sup>#</sup>	[CH]	1.44-1.58	m				
26	67.0	[CH <sub>2</sub> ]	3.37-3.46	m	64.8	[CH <sub>2</sub> ]	3.37	br. d [J=11.1]
			4.13-4.24	m			4.08	dd [J=3.1, 11.1]
	65.1 <sup>#</sup>	[CH <sub>2</sub> ]	3.28-3.34	m			3.96-4.02	m
27	17.2	[CH <sub>3</sub> ]	0.65	d [J=5.9]	15.9	[CH <sub>3</sub> ]	1.03	d [J=7.2]
	16.3 <sup>*#</sup>	[CH <sub>3</sub> ]	1.02	d [J=7.1]				

\*möglicherweise vertauscht, #Verschiebungen des Isomers.

Tabelle 30: Zucker-NMR-Daten von von AS-2-I und Dioscin (14a/b) sowie von AS-1 (15).

Position	14a/b				15			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
3-O-Glc								
1'	100.2	[CH]	4.86	d [J=7.6]	101.4	[CH]	4.78	d [J=7.6]
2'	78.3	[CH]	4.18-4.28	m	81.0	[CH]	4.11-4.22	m
3'	76.9	[CH]	3.56-3.63	m	75.5	[CH]	4.11-4.22	m
4'	78.6	[CH]	4.18-4.28	m	80.3	[CH]	4.11-4.22	m
5'	77.9	[CH]	4.07-4.18	m	76.2	[CH]	3.70-3.75	m
6'	61.2	[CH <sub>2</sub> ]	3.96-4.01 4.13-4.20	m	61.9	[CH <sub>2</sub> ]	4.38-4.43 4.45-4.49	m
2''-O-Rha								
1''	102.1	[CH]	6.12	d [J=1.3]				
2''	72.4	[CH]	4.70-4.72	m				
3''	72.5	[CH]	4.54-4.56	m				
4''	73.9	[CH]	4.18-4.28	m				
5''	69.6	[CH]	4.86-4.91	m				
6''	18.6	[CH <sub>3</sub> ]	1.66-1.76	m				
4'''-O-Rha								
1'''	102.9	[CH]	5.71	d [J=1.2]				
2'''	72.4	[CH]	4.66-4.68	m				
3'''	72.6	[CH]	4.46-4.52	m				
4'''	73.9	[CH]	4.18-4.28	m				
5'''	70.4	[CH]	4.76-4.86	m				
	18.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.44-1.58	m				
2''-O-Glc								
1''					105.1	[CH]	5.35	d [J=7.6]
2''					77.6	[CH]	3.98-4.09	m
3''					77.5	[CH]	4.11-4.22	m
4''					71.6	[CH]	4.11-4.22	m
5''					78.3	[CH]	3.84-3.94	m
6''					62.7	[CH <sub>2</sub> ]	4.38-4.43 4.45-4.49	m
4'''-O-Xyl								
1'''					105.3	[CH]	4.96	d [J=7.6]
2'''					74.7	[CH]	3.84-3.94	m
3'''					77.9	[CH]	3.98-4.09	m
4'''					70.4	[CH]	3.98-4.09	m
5'''					67.2	[CH <sub>2</sub> ]	3.56-3.61 4.11-4.22	m



Tabelle 31: Aglycon-NMR-Daten C(1) bis C(15) von Methylprotodioscin (16).

Position	16			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
1	37.4	[CH <sub>2</sub> ]	0.92-0.99	m
			1.61-1.72	m
2	30.0	[CH <sub>2</sub> ]	1.73-1.80	m
			1.96-2.06	m
3	78.4	[CH]	3.87-3.92	m
4	38.8	[CH <sub>2</sub> ]	2.62-2.69	m
			2.75	dd [J=3.6, 12.6]
5	140.7	[C]	—	—
6	121.7	[CH]	5.28	br. d [J=4.5]
7	32.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.31-1.46	m
			1.73-1.80	m
8	31.5	[CH]	1.73-1.80	m
9	50.2	[CH]	0.80-0.88	m
10	37.0	[C]	—	—
11	20.9	[CH <sub>2</sub> ]	1.31-1.46 <sup>a</sup>	m
			1.31-1.46 <sup>a</sup>	m
12	39.6	[CH <sub>2</sub> ]	1.01-1.11	m
			1.61-1.72	m
13	40.6	[C]	—	—
14	56.5	[CH]	1.01-1.11	m
15	32.2	[CH <sub>2</sub> ]	1.31-1.46	m
			2.14-2.20	m

<sup>a</sup>fallen zusammen.

Tabelle 32: Aglycon-NMR-Daten C(16) bis C(28) von Methylprotodioscin (16).

Position	16			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [J/Hz]
16	81.2	[CH]	4.44	dd [J=3.6, 9.1]
17	64.1	[CH]	1.61-1.72	m
18	16.1	[CH <sub>3</sub> ]	0.77	s
19	19.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.00	s
20	40.3	[CH]	2.14-2.20	m
21	16.1	[CH <sub>3</sub> ]	1.14	d [J=6.9]
22	112.5	[C]	—	—
23	30.7	[CH <sub>2</sub> ]	1.73-1.80 1.96-2.06	m m
24	28.1	[CH <sub>2</sub> ]	1.61-1.72 1.96-2.06	m m
25	34.1	[CH]	1.80-1.89	m
26	74.9	[CH <sub>2</sub> ]	3.54 3.87-3.92	dd m
27	17.0	[CH <sub>3</sub> ]	0.96	d [J=7.3]
28	47.1	[CH <sub>3</sub> ]	3.22	s

#gehören zu dem Epimer; <sup>a</sup>fallen zusammen; <sup>b</sup>möglicherweise vertauscht.

Tabelle 33: Zucker-NMR-Daten von Methylprotodioscin (16).

Position	16			
	$\delta_C$ /ppm	HSQC	$\delta_H$ /ppm	M [JHz]
26-O-Glc				
1'	104.7	[CH]	4.78	d [ $J=7.5$ ]
2'	75.1	[CH]	3.92-3.97	m
3'	78.4	[CH]	3.52-3.57	m
4'	71.4	[CH]	4.10-4.18	m
5'	78.3	[CH]	4.22-4.32	m
6'	62.5	[CH <sub>2</sub> ]	4.22-4.32	m
			4.49	dd [ $J=2.2,$ 11.7]
3-O-Glc				
1''	100.1	[CH]	4.89	d [ $J=7.7$ ]
2''	78.4	[CH]	4.10-4.18	m
3''	76.7	[CH]	3.57-3.61	m
4''	78.0	[CH]	4.22-4.32	m
5''	77.7	[CH]	4.10-4.18	m
6''	61.0	[CH <sub>2</sub> ]	4.00	dd [ $J=3.2,$ 12.4]
			4.10-4.18	m
2''-O-Rha				
1'''	101.9	[CH]	6.29	d [ $J=2.6$ ]
2'''	72.2	[CH]	4.72-4.75	m
3'''	72.4	[CH]	4.57-4.61	m
4'''	73.7	[CH]	4.22-4.32	m
5'''	69.4	[CH]	4.81-4.91	m
6'''	18.3	[CH <sub>3</sub> ]	1.70	d [ $J=6.2$ ]
4''-O-Rha				
1''''	102.7	[CH]	5.71	d [ $J=2.6$ ]
2''''	72.5 <sup>c</sup>	[CH]	4.57-4.61	m
3''''	72.2 <sup>c</sup>	[CH]	4.52-4.55	m
4''''	73.7	[CH]	4.22-4.32	m
5''''	70.2	[CH]	4.81-4.91	m
6''''	18.4	[CH <sub>3</sub> ]	1.57	d [ $J=6.2$ ]

<sup>#</sup>gehören zu dem Epimer; <sup>a</sup>fallen zusammen; <sup>b</sup>aus dem  $J$ -resolved-Spektrum herausgelesen; <sup>c</sup>möglicherweise vertauscht.

## Lebenslauf

Name	Corinna Dawid
Geburtsdatum	28.05.1982
Geburtsort	Rheda-Wiedenbrück
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Michael Klaus Dawid Maria Elisabeth Dawid, geb. Großekathöfer
Geschwister	eine Schwester Christina Dawid

### Schulausbildung

1988 – 1992	Brüder-Grimm-Schule, Grundschule in Rheda-Wiedenbrück
1992 – 2001	Ratsgymnasium in Rheda-Wiedenbrück
15.06.2001	Allgemeine Hochschulreife

### Studium

Okt. 2001 – Okt. 2003	Grundstudium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
06.10.2003	staatl. Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker
Okt. 2003 – Okt. 2005	Hauptstudium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
25.10.2005	Erste staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker

### Promotionsstudium

02.01.2006 – 30.09.2007	Beginn der Dissertation am Institut für Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster unter der Betreuung von Prof. Dr. Hofmann
01.10.2007 – 30.06.2010	Beendigung der Dissertation am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik an der Technischen Universität München in Freising unter Betreuung von Prof. Dr. Hofmann

### Berufstätigkeit

Sommersemester 2004	Assistentin des Quantitativ-Analytischen Praktikums des Studiengangs Diplomchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
02.10.2006 – 30.09.2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

seit 01.10.2007

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik an der Technischen Universität München in Freising

seit 01.04.2010

Leiterin der lebensmittelchemischen Praktika I und II im Hauptstudium der Lebensmittelchemie der Technischen Universität München in Freising