



Untersuchungen zu Struktur-Geruchsbeziehungen von Lactonen

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

- genehmigte Dissertation -

vorgelegt von

Katja Buhr

aus Bochum

München 2006

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20070012

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20070012>]

*An idealist is one who,
on noticing that a rose smells better than a cabbage,
concludes that it will also make a better soup.*

*H. L. Mencken (1880-1956)
A Book of Burlesques, Sententia (1920)*

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1997 bis März 2006 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Helmut Guth im Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften) der Bergischen Universität Wuppertal. Die praktischen Arbeiten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden in der Zeit von November 1997 bis September 2001 durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Guth für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit und nicht zuletzt auch für seine Geduld und Unterstützung in der Phase des Zusammenschreibens.

Herrn Dr. Weissshuhn und Frau Ilka Möller möchte ich danken für die freundliche Unterstützung bei der Aufnahme der NMR-Spektren.

Herrn Dr. Guido Machmüller danke ich für die Synthese von Ethylweinlacton sowie zahlreiche anregende Diskussionen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Claudia Rometsch, Herrn Dr. Roberto Fritzer und Frau Dr. Anke Sies für Bestimmung bzw. Bestätigung der Geruchsschwellenwerte.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen in der Lebensmittelchemie möchte ich für die konstruktiven Diskussionen und das ausgezeichnete Arbeitsklima bedanken.

Für die besondere Unterstützung und zahlreiche aufbauende Gespräche beim Zusammenschreiben dieser Arbeit danke ich Frau Katrin Hübner und Frau Karin Lesse, die es immer wieder geschafft haben, mich zum Weitermachen anzuspornen. Unvergesslich bleibt auch die Unterstützung der legendären Hausgemeinschaft von Chanel, 6, Old Blackrock Road in Cork und der Corktango Familie.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie sehr bedanken, die mir die akademische Ausbildung ermöglicht und mich nach besten Kräften unterstützt hat.

Abstract

Analog to drug design the prediction of odour threshold values is still an exciting area of research as it would enable a more precise planning of the synthesis of new flavour compounds instead of the more trial and error-like way which is still implemented in many cases today. In spite of increasing knowledge about the mechanisms determining the human sense of smell and a rising number of publications on structure odour relationships the development of a powerful tool for prediction of odour threshold values is still missing. Additionally, very few studies considered stereochemical information yet.

The variation in odour intensity for the eight stereoisomers of 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranone (wine lactone) is an example how subtle differences in their three dimensional structure have a crucial impact on their odour intensity. While all of them display the same sweet coconut-like odour, their odour threshold values vary over eight orders of magnitude between 10^{-5} and 1000 ng/l air. This observation provided the incentive for systematic investigation of the underlying structure odour relationships of lactones as it has been done in the present study.

The present study was based on a data set consisting of the eight stereoisomers of 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranone, their sixteen saturated derivatives (3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranone) as well as a number of monocyclic γ - und δ -lactones adding up to 62 lactonic structures.

If not commercially available, the compounds were synthesized via enantioselective methods and their odour threshold values were determined by chiral GC/Olfactometry. Most of the lactones showed either coconut-like or peach-like odour qualities. Odour threshold values were confirmed by a panel of 5 participants.

Lowest odour threshold values for coconut-like odour were found for (3S,3aS,6R,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (**2a1**), (3S,3aS,6S,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (**2a2**) and (3S,3aS,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (**1a**, wine lactone). Lowest odour threshold values for peach-like odour quality were displayed by S- δ -Dodecalactone and R- γ -Dodecalactone. A superpo-

sition of these compounds was therefore used as reference for coconut-like and peach-like odour respectively.

Furthermore, a systematic computational method for investigation of structure odour relationships was developed. This method included the calculation of energy minimized three-dimensional molecular models of the compounds, calculation of their molecular surfaces as well as the Electrostatic Potential (ESP) as a characteristic surface property. Afterwards statistical methods such as Kohonen Neural Networks and Partial Least Square Regression were successfully implemented in order to build predictive models for coconut-like and peach-like odour respectively as well as identification of important molecular regions.

The fact that the actual conformation of the ligand at the olfactory receptor is unknown while predictive tools could only be developed by reverting to energy minimized structures is generally regarded as a weakness of such studies. Therefore a similarity study for peach-like odour quality has been implemented with both, energy minimized and dynamic structures. The dynamic structures include the superposition of all conformations which show a maximum difference of 1 kcal/mol from the conformation with the lowest energy. Both sets of molecular models have been subject to the same calculation procedure including Kohonen Neural Network technology and Partial Least Square Regression. The resulting predictive models do not show a significant difference in predictive ability. This confirms that-in the case of the present study-the implementation of energy minimised structures is appropriate in order to simplify investigation of structure odour relationships.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung und Motivation | 1 |
| 2. Theorieteil | 3 |
| 2.1. Allgemeines | 3 |
| 2.1.1. Aromastoffe..... | 3 |
| 2.1.2. Wechselwirkungen von Aromastoffen..... | 4 |
| 2.1.2.1 Wechselwirkungen von Aromastoffen mit der Lebensmittelmatrix | 4 |
| 2.1.2.2. Wechselwirkungen von Aromastoffen mit dem Geruchssinn | 5 |
| 2.2. Der Geruchssinn | 6 |
| 2.2.1. Morphologie | 6 |
| 2.2.2. Signalübertragung | 8 |
| 2.2.3. Regeneration und Adaption..... | 10 |
| 2.2.4. Unterscheidung von Gerüchen | 10 |
| 2.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen | 11 |
| 2.3.1 Protein-Ligand Wechselwirkungen..... | 11 |
| 2.3.1.1. Sterische Deskriptoren | 12 |
| Die Molrefraktion..... | 12 |
| Sterimol Parameter | 13 |
| Konnektivitätsindizes | 13 |
| 2.3.1.2. Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Bindungen | 16 |
| 2.3.1.3 Hydrophobe Wechselwirkungen und entropische Beiträge | 17 |
| 2.3.2. Der Hansch Ansatz..... | 18 |
| 2.3.3. CoMFA, CoMSIA und Almond..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.4. 3D-Modelling | 21 |
| 2.3.4.1 Generierung von dreidimensionalen Strukturen | 21 |
| 2.3.4.2. Molekülmechanik..... | 21 |
| 2.3.4.3 Quantenmechanische Rechenverfahren | 24 |
| 2.3.4.4. Konformationsanalyse..... | 26 |
| 2.3.4.5. Weiterführende Ansätze | 26 |
| 2.4. Statistische Methoden | 27 |
| 2.4.1. Künstliche Neuronale Netze..... | 27 |
| 2.4.1.1. Neuronale Netzwerke nach Kohonen..... | 29 |
| Trainingsprozess..... | 31 |
| 2.4.1.2. Mögliche Darstellungen des Ergebnisses..... | 32 |
| Output Activity Maps..... | 32 |
| Belegungsdichtemaps (Counting Maps) | 33 |
| Feature Maps | 33 |
| 2.4.1.3. Anwendung von Kohonen Netzwerken zum Vergleich von Moleküloberflächen | 34 |
| 2.4.2. Partial Least Square Regression (PLS) | 37 |
| 2.5. Struktur-Geruchsbeziehungen, Stand der Forschung..... | 39 |
| 2.5.1 Beispiele für Fallstudien..... | 40 |
| 2.5.2 Olfaktophorhypothesen | 41 |
| 2.5.3 Ligandenbasierte und strukturbasierte Ansätze..... | 42 |
| 2.5.4 Beispiele für einzelne Geruchsqualitäten | 43 |
| 2.5.4.1 Untersuchung unterschiedlicher statistischer Verfahren für die Anwendung von Struktur-Geruchsbeziehungen bei Pyrazinen: | 44 |
| 2.5.4.2 Stand der Forschung auf dem Gebiet der amberartigen Geruchstoffe | 44 |
| 2.5.4.3 Stand der Forschung auf dem Gebiet der Ester mit fruchtigen Geruch. | 46 |
| 2.5.4.4 Stand der Forschung auf dem Gebiet der Lactone | 46 |

3. Ergebnisse und Diskussion..... 48

3.1 Synthese von Modellverbindungen. Konformationsanalyse 48

3.1.1. Modellverbindungen 48

3.1.1 Enantioselektive Synthese der 8 Stereoisomere von 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon. 50

3.1.2 Enantioselektive Synthese der 16 Stereoisomere (2a₁₋₂-2h₁₋₂) von Dimethylhexahydrobenzofuranon 51

3.1.3 Synthese weiterer Modellverbindungen..... 52

 a) Dehydromintlacton..... 52

 b) Synthese der bicyclischen Lactone 7 und 8: 52

 c) Bicyclen 3a-d 53

3.1.4. Konformationsanalyse..... 54

3.2 Charakterisierung der geruchlichen Eigenschaften 58

3.2.1. Bestimmung der Geruchschwellenwerte mittels chiraler GC/Olfaktometrie..... 58

3.2.2. Ergebnisse und Diskussion zur Bestimmung der Geruchschwellenwerte 58

 3.2.2.1. Bicyclische Lactone 58

 3.2.2.2. Monocyclische Lactone..... 59

 3.2.2.3 Diskussion der gemessenen geruchlichen Eigenschaften 63

 3.2.2.4 Vorläufige Ableitung von Zusammenhängen für Lactone mit pfirsichartiger Geruchsqualität..... 64

3.3 Einsatz von Molecular Modelling und statistischen Methoden zur Aufklärung von Struktur-Geruchsbeziehungen in der Verbindungsklasse der Lactone..... 65

3.3.1 Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen mono- und bicyclischer Lactone der Geruchsqualität kokosartig. 65

| | |
|--|-----|
| 3.3.1.1 Molecular Modelling..... | 65 |
| 3.3.1.1.1 Generierung dreidimensionaler Molekülmodelle..... | 65 |
| 3.3.1.1.2. Moleküloberflächen | 66 |
| 3.3.1.2. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen: | 67 |
| 3.3.1.2.1. Methodenentwicklung mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl- hexahydrodro-benzofuran-2-on und unter Berücksichtigung eines Teildatensatzes. | 67 |
| Kohonen Maps mit abgebildetem molekularen elektrostatischen Potential (ESP) | 68 |
| Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte..... | 70 |
| Differenzspektren | 71 |
| Auswahl einer geeigneten Leitstruktur | 72 |
| Kalkulation einer Moleküloberfläche mittels IRIS Explorer 3.5 | 73 |
| 3.3.1.2.2. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen mit Leitstruktur aus vier überlagerten bicyclischen Lactonen und unter Berücksichtigung des gesamten Datensatzes. | 74 |
| Rückprojektionen | 76 |
| Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte..... | 79 |
| 3.3.1.2.3. Vorhersage von Geruchsschwellenwerten mittels Partial Least Square Regression | 89 |
| Varianzen, Sample Scores und Important Variables..... | 91 |
| 3.3.1.2.5 Diskussion der berechneten Geruchsschwellen | 102 |
| 3.3.1.3. Entwicklung eines Rezeptormodells für kokosnussartigen Geruch..... | 103 |
| 3.3.1.4. Abschließende Diskussion zur Untersuchung von Struktur- Geruchsbeziehungen von Lactonen der Geruchsqualität kokosartig | 104 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.2 Monocyclische Lactone der Geruchsqualitäten pfirsich: Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen mit der energetisch günstigsten Molekülkonformation im Vergleich zu einem dynamischen Ansatz..... | 106 |
| 3.3.2.1 Datensatz | 106 |
| 3.3.2.2 Molecular Modelling..... | 107 |
| 3.3.2.3. Erzeugung einer Moleküloberfläche mittels IRIS Explorer 3.5..... | 108 |
| 3.3.2.4. Auswahl einer geeigneten Leitstruktur..... | 109 |
| 3.3.2.5. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen: | 111 |
| 3.3.2.5.1. Nichtdynamischer Ansatz, Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte | 111 |
| Farbkodierung für die abgebildete Belegungsdichte..... | 112 |
| 3.3.2.5.2 Dynamischer Ansatz; Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte | 113 |
| 3.3.2.6. Vorhersage von Geruchsschwellenwerten mittels Partial Least Square Regression | 114 |
| 3.3.2.6.1. Modelle zur Vorhersage von Geruchsschwellenwerten für die Geruchsqualität pfirsichartig; Korrelation zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Geruchsschwellenwert; | 114 |
| a) Dynamischer Ansatz | 114 |
| b) Nichtdynamischer Ansatz | 116 |
| 3.3.2.7. Diskussion der Vorhersagemodelle..... | 117 |
| | |
| 4. Zusammenfassung | 120 |

| | |
|---|-----|
| 5. Experimenteller Teil..... | 122 |
| 5.1 Referenzsubstanzen und sonstige Chemikalien | 122 |
| 5.2 Verwendete Abkürzungen für die Referenzsubstanzen | 123 |
| 5.3. Chromatographische Systeme | 128 |
| 5.3.1 GC / MS | 128 |
| 5.3.2. GC /FID und GC/Olfaktometrie..... | 130 |
| 5.3.3. HPLC zur präparativen Aufreinigung: | 131 |
| 5.3.4. Flash Chromatographie zur präparativen Aufreinigung..... | 131 |
| 5.4. Kernresonanzspektrometrie..... | 131 |
| 5.5. Software | 132 |
| 5.6. Berechnung dreidimensionaler Molekülmodelle mittels Hyperchem 5.0..... | 132 |
| 5.6.1. Moleküldynamiksimulation in Hyperchem 5.0..... | 132 |
| 5.6.2. Konformationssuche in Hyperchem 5.0..... | 132 |
| 5.6.3. Kraftfeldminimierung..... | 134 |
| 5.7. Berechnung von Moleküloberflächen mittels WinMopac97 | 134 |
| 5.8 Berechnung von Moleküloberflächen und Rückprojektionen mit IRIS Explorer 3.5.. | 134 |
| 5.8.1. Operational Maps | 135 |
| 5.8.2. Verwendete Module: | 136 |
| 5.9. Oberflächenvergleich mittels Neural Connection 2.0 | 137 |
| 5.9.1. Vorbereitung der Eingabedaten..... | 138 |
| 5.9.2. Datenimport..... | 138 |
| 5.9.3. Kohonen Netzwerk:..... | 139 |
| 5.10. Vorhersage von Geruchsschwellenwerten mittels Unscrambler 7.5 | 140 |
| 5.11. Synthesen und Analysendaten..... | 141 |
| 5.11.1. 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2 (3H)-benzofuranon (1a-h)..... | 141 |
| 5.11.2. 3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a ₁₋₂ -2h ₁₋₂) | 142 |
| 5.11.3. Stereoisomere 2a1 und 2b2 | 142 |
| 5.11.4 Stereoisomere 2a2 und 2b1 | 144 |
| 5.11.5. Stereoisomere 2c1 und 2d2 | 146 |
| 5.11.6. Stereoisomere 2c2 und 2d1 | 146 |
| 5.11.7. Stereoisomere 2e1 und 2f2..... | 147 |
| 5.11.8. Stereoisomere 2e2 und 2f1 | 149 |

| | |
|---|-------|
| 5.11.9. Stereoisomere 2g1 und 2h2 | 149 |
| 5.11.10 Stereoisomere 2g2 und 2h1 | 150 |
| 5.11.11. Bicyclen 3a und 3b | 151 |
| 5.11.11. Bicyclen 3c und d | 152 |
| | |
| 6. Literatur und Internetressourcen | 154 |
| | |
| 6.1. Literatur | 154 |
| 6.2. Internet Ressourcen: | 167 |
| | |
| 7. Anhang | 168 |
| | |
| 7.1 Abkürzungsverzeichnis | 168 |
| 7.2 Tabellenverzeichnis | 169 |
| 7.3 Abbildungsverzeichnis | 170 |
| 7.4 Arbeitsvorschriften | 1709 |
| 7.5 Kohonen Maps | 17087 |

1. Einleitung und Motivation

Trotz zunehmender Aufklärung über Funktion und Signalübertragung des menschlichen Geruchs sinns [Kajiya, 2001; Pelosi, 2001; Frings, 2001; Korsching, 2001; Araneda, 2000; Mombaerts, 1999; Malnic, 1999; Mori, 1995] sind viele Fragen weiterhin unbeantwortet. Zum Beispiel lässt sich bis heute nicht zweifelsfrei erklären, wie der Mensch tausende von Geruchsstoffen unterscheiden und auch neue, unbekannte Aromastoffe wahrnehmen und beschreiben kann. Des Weiteren ist trotz zahlreicher Fallstudien im Bereich der Struktur-Geruchsbeziehungen nicht eindeutig zu erklären, welche funktionellen Gruppen für die Ausprägung einer Geruchsaktivität verantwortlich sind, geschweige denn welche funktionelle Gruppe welche Geruchsqualität determiniert [Kraft, 2000; Bajgrowicz, 2000; Frater, 1998; Chastrette, 1997; Rossiter, 1996].

Um die Zusammenhänge zwischen Struktur und Geruch einer Verbindung näher zu betrachten, lässt sich sowohl die Geruchsqualität als auch die Geruchsintensität heranziehen: In Bezug auf die Geruchsqualität ist die folgende, widersprüchliche Beobachtung erwähnenswert, die bisher nicht vollständig erklärt werden kann: Moleküle so unterschiedlicher Struktur wie Benzaldehyd und Blausäure besitzen die gleiche Geruchsqualität während Moleküle, die sich so ähnlich sind wie das R- und das S-Enantiomer des Carvons unterschiedliche Geruchsqualität besitzen [Rossiter, 1996].

Betrachtet man hingegen die Geruchsintensität von Aromastoffen liefern die acht Stereoisomere des Weinlactons ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie minimale Unterschiede in der dreidimensionalen Struktur eines Moleküls sich auf die Geruchsintensität auswirken können. Obwohl bei allen die gleiche süße, kokosnussartige Geruchsqualität ausgeprägt ist, liegen die Geruchsschwellenwerte zwischen $1 \cdot 10^{-5}$ und 1000 ng/l Luft, unterscheiden sich also um acht Zehnerpotenzen. [Guth, 1996].

Diese Entdeckung lieferte den Anstoß, die Zusammenhänge zwischen der dreidimensionalen Struktur dieser Aromastoffe und ihrer Geruchsaktivität näher zu untersuchen. Hierbei wurden neben den acht Stereoisomeren des Weinlactons, einem ungesättigten bicyclischen γ -Lacton, auch dessen 16 gesättigte Derivate sowie eine Reihe kommerziell erhältlicher monocyclische γ - und δ -Lactone in die Untersuchungen einbezogen.

Die betreffenden Substanzen wurden, wenn nicht kommerziell erhältlich, selbst synthetisiert und anschließend mit chiraler GC/Olfaktometrie in Bezug auf ihre Geruchsqualität und Geruchsintensität charakterisiert. Außerdem wurde eine Methode zur systematischen Untersuchung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen mittels computerchemischer Kalkulationsmethoden entwickelt. Hierbei wurden zunächst mittels Molecular Modelling dreidimensionale Molekülmodelle sowie das elektrostatische Potential als charakteristische Oberflächeneigenschaft berechnet. Anschließend wurden mittels Neuronaler Netze (Kohonen Technik) [Gasteiger, 1998; Kohonen, 1982] und Partial Least Square Regression (PLS) systematische Ähnlichkeitsstudien zur Aufdeckung von Struktur-Geruchsbeziehungen durchgeführt.

2. Theorieteil

2.1. Allgemeines

Geruchs- und Geschmackseindrücke sind das Ergebnis einer direkten Wechselwirkung mit den aus der Lebensmittelmatrix freigesetzten flüchtigen, aromaaktiven Verbindungen mit den olfaktorischen Rezeptoren des menschlichen Geruchsinn. In diesem Zusammenhang finden sowohl Wechselwirkungen zwischen Lebensmittel und Aromastoff statt, als auch Wechselwirkungen zwischen Aromastoff und Geruchsinn. Diese Arbeit konzentriert sich auf die nähere Untersuchung der Eigenschaften einer bestimmten Gruppe von Stimulanzien, den Lactonen und ihren Wechselwirkungen mit den olfaktorischen Rezeptoren, ausgedrückt in ihren Geruchsschwellenwerten.

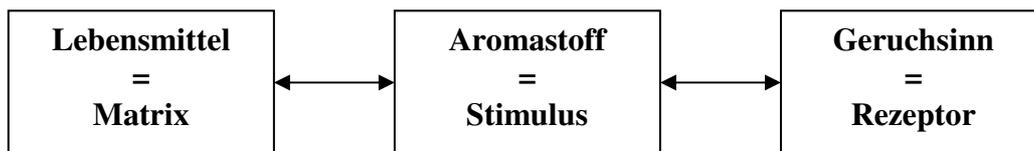


Abbildung 2.1: Gesamtsystem Lebensmittel-Aromastoff-Geruchsinn

2.1.1. Aromastoffe

Aromastoffe sind Riechstoffe, die sowohl ortho- als auch retronasal über den Geruchsinn wahrgenommen werden können. In Abgrenzung davon, handelt es sich bei den Geschmacksstoffen um schwerflüchtige Verbindungen, die über die Geschmacksrezeptoren, welche auf der Zunge lokalisiert sind, wahrgenommen werden. Dabei können nach heutigem Kenntnisstand die fünf Grundgeschmacksrichtungen süß, sauer, bitter, salzig und umami unterschieden werden. Geruch- und Geschmacksstoffe prägen gemeinsam mit der Textur, die über den Tastsinn wahrgenommen wird, den so genannten "Flavour" eines Lebensmittels [Rehner, 1999; Belitz, 1992; Ohloff, 1990].

Aromastoffe zeichnen sich dadurch aus, dass es sich um leicht flüchtige, hydrophobe Moleküle niedrigen Molekulargewichts handelt. Das höchste Molekulargewicht, das bisher für einen

Aromastoff gefunden wurde, beträgt 294 Dalton für das Labdanderivats 13,20-Diepoxy-14,15,16-trisnor-labdan $C_{18}H_{30}O_3$. Das in Abbildung 2 dargestellte Epimer A hat einen intensiven amberartigen Geruch, während das Epimer B eine wesentlich geringere Geruchsintensität aufweist [Demole, 1967].

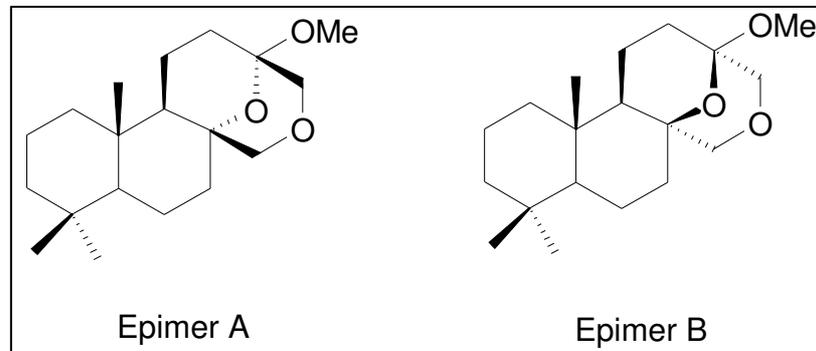


Abbildung 2.2: Epimere A und B von 13,20-Diepoxy-14,15,16-trisnor-labdan $C_{18}H_{30}O_3$

Obwohl es sich um kleine hydrophobe Moleküle handelt, müssen geruchsaktive Substanzen trotzdem genügend Information in Form von funktionellen Gruppen tragen, um effektiv mit den Geruchsrezeptoren in Wechselwirkung treten zu können und eine von mehreren hundert möglichen charakteristischen Geruchsqualitäten auszuprägen. Auf Grund der Bedeutung für die Geruchsaktivität eines Aromastoffs wurde der Begriff osmophile Gruppe für den polaren Anteil des Moleküls geprägt [Ohloff, 1990].

Die geruchlichen Eigenschaften eines Aromastoffs sind charakterisiert durch die Geruchsqualität, z. B. kokosnussartig oder pfirsichartig, sowie die Geruchsintensität ausgedrückt als Geruchsschwellenwert. Unter dem Geruchsschwellenwert versteht man die niedrigste noch wahrnehmbare Konzentration eines Aromastoffes. Sie wird normaler Weise in ng/l Luft angegeben.

2.1.2. Wechselwirkungen von Aromastoffen

2.1.2.1 Wechselwirkungen von Aromastoffen mit der Lebensmittelmatrix

Flüchtige Bestandteile eines Lebensmittels stehen im Gleichgewicht mit dem Kopfraum über dem Lebensmittel. Dabei ist die Kopfraumkonzentration über dem Lebensmittel nicht nur abhängig von der Flüchtigkeit des betreffenden Aromastoffes. Der Verteilungskoeffizient an der Grenzfläche Lebensmittel / Luft wird ebenfalls beeinflusst von der Beschaffenheit der

Lebensmittelmatrix. Lipide können zum Beispiel die Löslichkeit von Aromastoffen im Lebensmittel erhöhen, während eine hohe Salzkonzentration den Übergang der Aromastoffe in die Gasphase begünstigen kann. Proteine können durch spezifische sowie unspezifische Bindung die Aromastoffe im Lebensmittel einschließen [Guth, 2004]. Das gleiche gilt für Wechselwirkungen mit Polysacchariden. Dieser Effekt wird zum Beispiel ausgenutzt bei der Einkapselung von Aromastoffen durch Sprühtrocknung mit Polysacchariden wie Gummi arabicum, Maltodextrin und modifizierter Stärke. Außerdem kommt die Bildung von Einschlußverbindungen mit Cyclodextrinen in Frage. Dadurch werden die flüchtigen Aromastoffe im Lebensmittel besser zurückgehalten und erst dann freigesetzt, wenn die makromolekulare Hülle durch Erwärmen beim Kochprozess aufgelöst wird [Belitz, 1992].

Die Aromastoffe, die sich im Gesamtsystem Lebensmittelmatrix-Aromastoff-Geruchsinn über dem Kopfraum des Lebensmittels befinden, machen also sein charakteristisches Aromaprofil aus. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund oben erwähnter Wechselwirkungen mit der Matrix nicht alle im Lebensmittel enthaltenen Aromastoffe zur Ausprägung des jeweils charakteristischen Aromas beitragen. Das Weinlacton besitzt zum Beispiel einen Geruchsschwellenwert von $1 \cdot 10^{-5}$ ng/l Luft, hat sich aber als ungeeignet zur Aromatisierung von Joghurt erwiesen, da die Komplexierung durch die vorhandenen Milchproteine die Freisetzung aus dem Lebensmittel vermindert (unveröffentlichte Daten). Diese Wechselwirkungen von Aromastoffen mit der Lebensmittelmatrix stellen einen Forschungsansatz dar, der im Rahmen der COST Aktionen 96 und 921 verfolgt wird [<http://www.cost921.uni-wuppertal.de>].

2.1.2.2. Wechselwirkungen von Aromastoffen mit dem Geruchsinn

Im Rahmen dieser Arbeit fand eine Fokussierung auf die Struktur des Stimulus selbst und dessen Wechselwirkung mit den Geruchsrezeptoren statt (**Abbildung 2.1**). Da die Struktur und Beschaffenheit der Geruchsrezeptoren unbekannt ist, erfolgt eine Ableitung der Wechselwirkungsfähigkeit des Aromastoffes aus seinen Geruchsschwellenwerten. Die Ableitung von Struktur-Geruchsbeziehungen erfolgte mittels computerchemischer Methoden, auf die im **Kapitel 2.3. Struktur-Aktivitätsbeziehungen** näher eingegangen wird.

2.2. Der Geruchssinn

2.2.1. Morphologie

Der Mensch besitzt bis zu 50 Millionen olfaktorische Sinneszellen, die von einem Vielfachen an Stütz- und Basalzellen begleitet werden. Sie sind im Riechepithel (Riechschleimhaut, Regio olfactoria) am oberen Nasendach lokalisiert. Das menschliche Riechepithel ist etwa 100-200 μm dick und nimmt eine Fläche von 2-3 cm^2 ein. Die darin eingebetteten Riechzellen sind primäre Sinneszellen, die als Ausnahmeerscheinung unter den reifen Nervenzellen, die Fähigkeit zur mitotischen Teilung haben. Sie werden nach einer mittleren Lebensdauer von 20 bis 60 Tagen aus den Basalzellen des Epithels erneuert [Rehner, 1999; Ohloff, 1990].

Riechzellen sind bipolare Neuronen. Ihr apikaler Fortsatz ist ein unverzweigter Dendrit, dessen leicht verdicktes Ende 5-20 zilienförmige Fortsätze trägt. Diese Riechhärchen bilden in der Schleimhaut eine verfilzte Schicht, die als chemorezeptive Oberfläche dient. In der Cilienmembran sind die Rezeptorproteine, die zur Familie der 7-Transmembranproteine gehören, lokalisiert. Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte integrale Membranproteine, die die Cilienmembran mit sieben α -Transmembranhelices durchziehen. In jedem Riechneuron wird nur ein einziges von ca. 1000 verschiedenen Rezeptorproteinen exprimiert [Rehner, 1999; Malnic, 1999; Mori, 1995; Ohloff, 1990].

Der zweite Fortsatz der Riechneuronen läuft in ein etwa 0,2 μm dünnes Axon aus. Die Axone lagern sich zu Bündeln, den so genannten Filia olfactoria zusammen und werden durch die Siebplatte des Nasenbeins in den Riechkolben des Vorderhirns (Bulbus olfactorius) geleitet. Dort laufen sie mit den sekundären Neuronen in den als Glomeruli bezeichneten, knäuelartigen Ballungen zusammen [Rehner, 1999; Mori, 1995; Ohloff, 1990].

Wichtig für die Differenzierung von Geruchsqualitäten scheint hier die Tatsache zu sein, dass in einem Glomerulus jeweils nur die Axone eines Typs von Neuronen konvergieren. Und zwar konvergieren genau diejenigen Neuronen, in denen das gleiche Rezeptorprotein exprimiert wird (olfaktorische Konvergenz). Von dort wird die olfaktorische Information über den Riechstrang sowohl in das Riechhirn (Rhinenzephalon) als auch in übergeordnete Teile des

Gehirns weitegeleitet (olfaktorische Divergenz) [Malnic 1999; Mori 1995; Axel, 1995], siehe auch **Kapitel 2.2.4** dieser Arbeit zur Unterscheidung von Gerüchen.

Neben den Riechneuronen, Stütz- und Basalzellen ist das Riechepithel noch durchsetzt von den so genannten Bowmannschen Drüsen, deren Sekret das gesamte Riechepithel bedeckt. Die Cilienmembranen mit ihren Geruchsrezeptoren sind also eingebettet in einen komplex zusammengesetzten Mucus. Er enthält unter anderem Mucine, Olfaktomedine, Kohlenhydrate, Enzyme und Odorant Binding Proteins (OBP) [Rehner, 1999].

Mucine sind Glykoproteine, die Wassermoleküle an der Oberfläche der Sinneszellen festhalten. Die peri-Rezeptor-Ereignisse finden also in wässrigem Medium statt. Gleichzeitig ist anzunehmen, dass die in diesem Medium ausgebildeten Hydrathüllen zur Bildung des eines Rezeptor-Ligand Komplexes aus Aromastoff und Geruchsrezeptor abgestreift werden müssen. [Pelosi, 2001; Rehner, 1999].

Olfaktomedine sind Polypeptide, die zur Struktur und Elastizität des Mucus beitragen, während Enzyme am Abbau der Odorantien beteiligt sind. Komplexbildung von Geruchstoffen mit Kohlenhydraten kann zu Konformationsänderungen führen, die die Bindung an ein Rezeptorprotein begünstigen [Rehner, 1999].

Darüber hinaus wurde die Funktion der Odorant Binding Proteins (OBP) in zahlreichen Publikationen diskutiert. Zunächst nahm man an, dass sie am Transport der Geruchstoffe an das Rezeptorprotein beteiligt sind bzw. den Durchtritt der eher unpolaren Aromastoffe durch das wässrige Medium zum Rezeptor hin erst ermöglichen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass dies allein einerseits wegen der geringen Anzahl unterschiedlicher OBP im Vergleich zur Anzahl unterschiedlicher Aromastoffe sowie Rezeptorproteine und andererseits aufgrund der kurzen Zeit, die zur Signalauslösung benötigt wird, eher unwahrscheinlich ist. Deshalb nimmt man inzwischen an, dass sie ebenfalls am Abbau von Aromastoffen beteiligt sein könnten. Darüber hinaus wird aufgrund der Strukturanalogie zu zahlreichen Pheromone Binding Proteins (PBP) diskutiert, dass die OBP gar nicht im Zusammenhang mit dem Geruchssinn stehen, sondern tatsächlich keine Odorant-sondern Pheromone Binding Proteins sind. PBP sind erwiesenermaßen in der Tierwelt an der Wahrnehmung von Pheromonen über das Vomeronasalorgan (VNO) beteiligt. Es wird jedoch angenommen, dass das menschliche Vomeronasalorgan im Laufe der Evolution seine Funktion verloren hat, da eine analoge Funktion beim Men-

schen bisher nicht bestätigt werden konnte [Pelosi, 2001; Brennan, 2001; Tegoni, 2000; Keverne, 1999].

2.2.2. Signalübertragung

Die olfaktorischen Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranproteine (7TM), die in der Zilienmembran der Riechneuronen lokalisiert sind. Die Bindung eines Aromastoffs an den Transmembranrezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die analog zur Signaltransduktion bei Photorezeptoren, Neurotransmitter- und Hormonrezeptoren eine G-Protein-vermittelte Signalkaskade aktiviert [Frings, 2001; Mombaerts, 1999; Mori, 1995; Axel, 1995; Lancet, 1993; Buck, 1991]

Der in **Abbildung 2.3** dargestellte Hauptweg der Signaltransduktion verläuft über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als second messenger. Die Bindung eines Aromastoffs an den Geruchsrezeptor bewirkt die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins und die Dissoziation der α -Untereinheit G_{olf} . G_{olf} ist ein GTP-bindendes Protein, das in den Zilienmembranen reifer Riechzellen exprimiert und von picomolaren Konzentrationen an Geruchstoffen aktiviert wird. G_{olf} überträgt das Signal vom Rezeptorprotein auf eine Typ III-Adenylatcyclase (AC), die cAMP aus ATP synthetisiert. Dies führt zum Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, der die Öffnung eines spezifischen Cyclonucleotid-gesteuerten (GNG) Ionenkanals bewirkt. Dies hat den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Mucus durch den geöffneten Ionenkanal in die Zilienlumen zur Folge. Außerdem werden durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration gleichzeitig Ca-abhängige Cl^- -Kanäle geöffnet, und Cl^- strömt aus der Zelle in den Mucus. Dies führt zur Depolarisierung der Zellmembran und zur Erzeugung eines Aktionspotentials. [Frings, 2001; Rehner, 1999; Hatt, 1999; Goodenough, 1998; Mori 1995].

Darüber hinaus wird auch ein Nebenweg der Signalübertragung beschrieben, bei dem Inositoltriphosphat (IP_3) als second messenger involviert ist (**Abbildung 2.4**). Hier wird statt Adenylatcyclase Phospholipase C (PLC) durch das aktivierte G-Protein angesprochen, was zur Erhöhung des IP_3 -Spiegels führt, der wiederum IP_3 -gesteuerte Calciumkanäle öffnet. Dies führt ebenfalls zur Depolarisierung der Zellmembran und zur Erzeugung eines Aktionspotentials, das über die Axone der Riechneurone zum Riechkolben (Bulbus olfactorius) weitergeleitet wird [Rehner G et al (1999), Mori K et al (1995)].

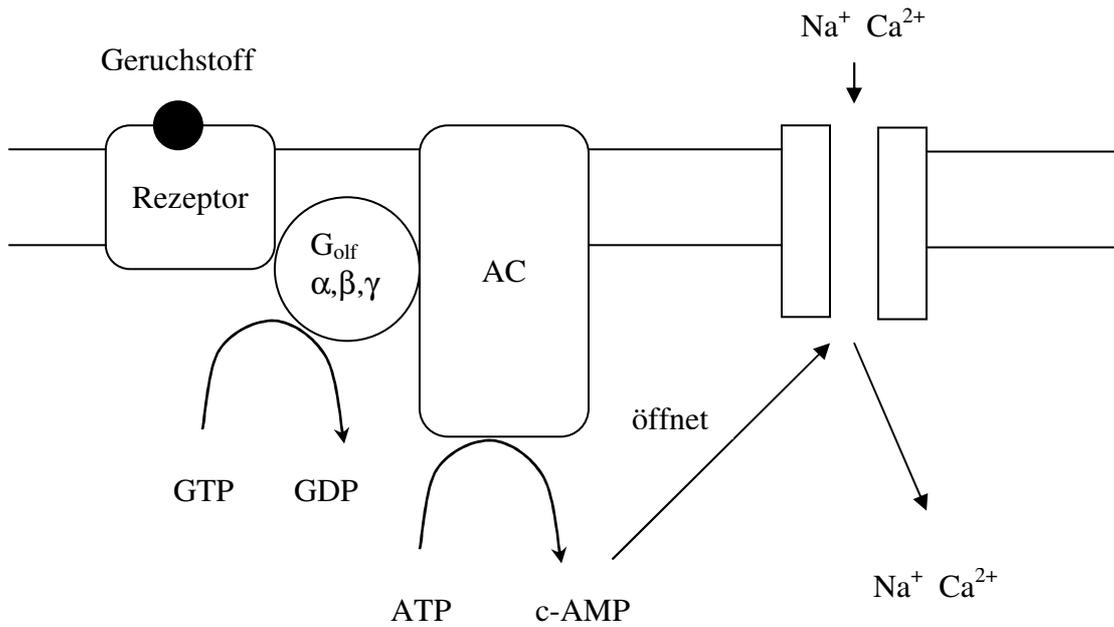


Abbildung 2.3: Hauptweg der Signalübertragung über c-AMP als second messenger

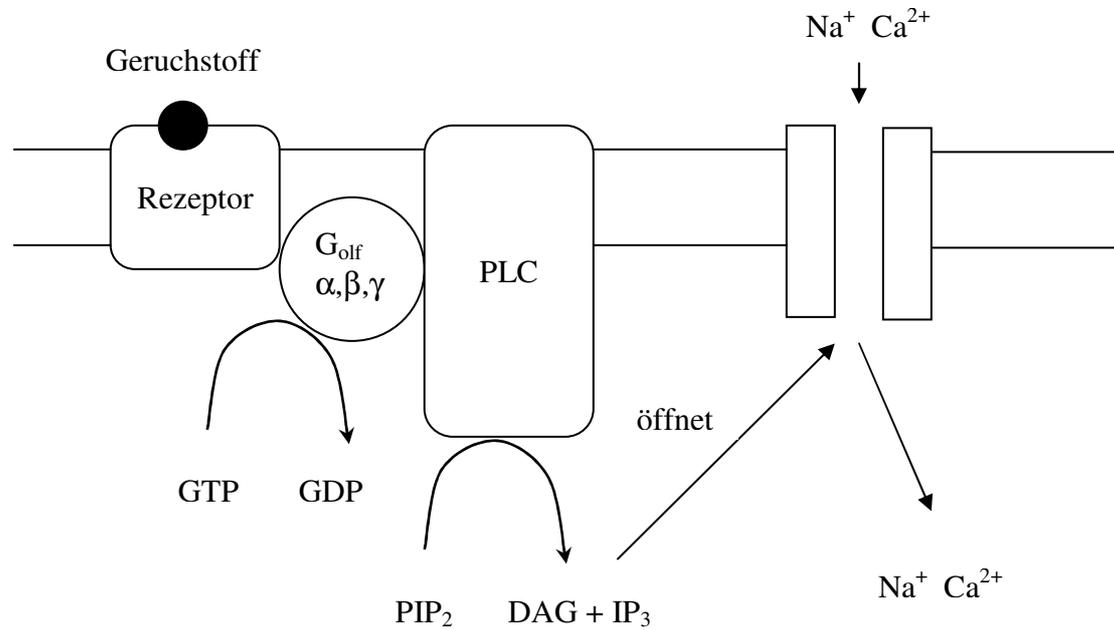


Abbildung 2.4: Nebenweg der Signalübertragung mit IP₃ als second messenger

2.2.3. Regeneration und Adaption

Da bereits 5-10 Sekunden nach der Auslösung eines olfaktorischen Signals, ein neues Signal induziert werden kann, muss der Geruchsinn über sehr effektive Mechanismen zur Signalbeendigung verfügen. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Mechanismen in der Literatur diskutiert:

Einerseits wird die Hemmung der Adenylatcyclase durch hohe Calciumkonzentrationen, durch calciumbindende Proteine sowie durch Phosphoryllierung beschrieben. Andererseits wird die Aktivität der CNG-Kanäle über einen negativen Feedbackmechanismus durch Ca^{2+} gehemmt. Außerdem wird cAMP unter Beteiligung einer durch Ca^{2+} aktivierbaren Phosphodiesterase hydrolysiert, so dass das ursprüngliche cAMP-Level schnell wieder hergestellt wird. Als zusätzlicher Adaptionmechanismus wird auch eine Phosphoryllierung der Rezeptorproteine diskutiert. Darüber hinaus transportieren Na/Ca-Austauschsysteme Calcium aus dem Zellumen hinaus und verhindern damit auch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der Cl^- -Kanäle. Als weiterer Mechanismus spielt auch das aktive Ausschleusen von Ca^{2+} mittels Ca-ATPasen unter ATP-Verbrauch eine Rolle [Matthews, 2003; Frings 2001].

2.2.4. Unterscheidung von Gerüchen

Da die Signalkaskade unabhängig von der Art des Geruchsstoffes für alle Geruchsqualitäten die gleiche ist, nimmt man an, dass die weitere Verschaltung der Neuronen verantwortlich ist für die Erkennung unterschiedlicher Geruchsqualitäten. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass die Axone von Neuronen in denen derselbe Rezeptortyp exprimiert wird konvergieren [Malnic, 1999].

Darüber hinaus unterscheidet man die "one odorant-one receptor" und die "multiple odorant-multiple receptor"-Hypothese. Im ersten Fall geht man davon aus, dass jeweils nur ein Rezeptor für eine Geruchsqualität verantwortlich ist. Differenzen in Geruchsintensitäten bei gleicher Geruchsqualität resultieren hierbei aus der unterschiedlichen Bindungsaffinität der Liganden. Bei der "multiple odorant-multiple receptor"-Hypothese geht man hingegen davon aus, dass jeder Aromastoff an mehrere Rezeptoren binden kann und umgekehrt. Man nimmt an, dass hierbei für jede Geruchsqualität ein charakteristisches Muster an angesprochenen Rezeptoren

existiert. Dies würde auch die konzentrationsabhängige Änderung der Geruchsqualität, wie sie z. B. für 4-Methyl-4-mercaptopentan-2-on in der Literatur beschrieben wird [Darriet, 1993] wie folgt erklären: Bei erhöhter Konzentration werden auch Rezeptoren angesprochen, an die der Aromastoff nicht optimal binden kann, so dass sich ein anderes Muster an angesprochenen Rezeptortypen ergibt als bei niedrigen Konzentrationen. Folglich entsteht auch ein anderer Geruchseindruck [Malnic, 1999].

2.3 Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen stützt sich auf das Postulat, dass die biologische Aktivität einer Verbindung eine Funktion ihrer Struktur ist. In diesem Zusammenhang wurden insbesondere in der Medizinalchemie unter dem Begriff Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) zahlreiche Anstrengungen vorgenommen, dieses Postulat umzukehren und Vorhersagemodelle zu entwickeln mit dem Ziel einer gezielteren und effektiveren Synthese neuer Wirkstoffe. Hierbei werden leicht zugängliche Deskriptoren generiert und als unabhängige Variablen mittels statistischer Korrelationsverfahren mit der biologischen Aktivität als abhängiger Variablen korreliert [Selassie, 2003].

Die Anzahl an möglichen Deskriptoren zur mathematischen Beschreibung eines Moleküls reicht von einfach zugänglichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie zum Beispiel Molekulargewicht und Siedepunkt bis hin zu komplexen mathematischen Modellen zur Berechnung topologischer und elektrotopologischer Indices. Im Folgenden werden die für die QSAR Forschung wichtigsten Aspekte kurz zusammengefasst.

2.3.1 Protein-Ligand Wechselwirkungen

Erster Schritt bei der Auslösung eines Geruchseindrucks ist die Bindung eines Aromastoffes (Ligand) an einen olfaktorischen Rezeptor. Wichtig ist hierbei, dass der Geruchstoff die richtige Größe und Gestalt aufweist, um nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip optimal in die Proteinbindetasche hineinzupassen. Dieser Aspekt wird von zahlreichen sterischen Parametern beschrieben, wie zum Beispiel der Molrefraktion (MR), den Sterimol Parametern nach Verloop und den Konnektivitätsindizes nach Randić bzw. Kier und Hall [Selassie, 2003; Randić,

2001; Hall, 2001; Böhm, 1996; Kier, 1977]. Darüber hinaus ist es aber auch notwendig, dass die Oberflächeneigenschaften von Ligand und Rezeptor zueinander passen, damit sich spezifische Wechselwirkungen ausbilden können. Wichtige Wechselwirkungstypen sind Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und entropische Beiträge [Selassie, 2003; Böhm, 1996].

2.3.1.1. Sterische Deskriptoren

Die Molrefraktion

Einer der am meisten benutzten sterischen Parameter ist die Molrefraktion MR. Sie korreliert in erster Näherung mit der Größe eines Restes und kann daher angesehen werden als ein grobes Maß für den Umfang bzw. die Sperrigkeit eines Moleküls. Tatsächlich beinhaltet die Molrefraktion die Polarisierbarkeit eines Moleküls und hängt über die Gleichung:

$$MR = 4\pi N\alpha / 3 \quad (1)$$

mit den London Dispersionskräften zusammen. N ist die Avogadrokonstante und α die Polarisierbarkeit des Moleküls. Es enthält keine Information über die Form des Moleküls. Darüber hinaus ist die Molrefraktion ebenfalls definiert über die Lorentz-Lorenz Gleichung:

$$MR = [(n^2 - 1)/(n^2 + 2)][MW/\text{density}] \quad (2)$$

MW ist das Molekulargewicht und n der Brechungsindex.

Bei Alkylsubstituenten besteht eine hohe Kollinearität mit der Hydrophobität einer Verbindung. Die dreidimensionale Struktur eines Moleküls wird durch die Molrefraktion nur unzulänglich beschrieben, denn der MR Deskriptor unterscheidet nicht die Form eines Substituenten. Zum Beispiel sind die MR-Werte für die beiden Reste $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ und $\text{C}(\text{Et})(\text{CH}_3)_2$ beide gleich: 2,42. Trotz dieser Einschränkungen deutet die extensive Erfahrung mit diesem Parameter darauf hin, dass negative Koeffizienten eine sterische Hinderung im aktiven Zentrum implizieren, während positive MR-Werte auf dipolare Wechselwirkungen

oder eine günstige Positionierung eines Liganden zur Ausbildung von Wechselwirkungen hindeutet. [Selassie, 2003; Böhm, 1996].

Sterimol Parameter

Ein weiterer sterischer Deskriptor sind die STERIMOL Parameter nach Verloop. Diese Deskriptoren beschreiben sterische Bedürfnisse eines Substituenten entlang verschiedener, festgelegter Achsen. Die Verloop Parameter definieren hier geometrisch eine Länge in Richtung der Bindung eines Substituenten an sein Gerüst und senkrecht dazu unterschiedliche Breiten des Substituenten. Diese ligandenzentrierte Orientierung führt nicht immer zum Erfolg. Ein Ausweg bieten hier so genannte 3D-QSAR Methoden [Selassie, 2003; Böhm, 1996].

Konnektivitätsindizes

Weitere sterische Deskriptoren sind die molekularen Konnektivitätsindizes, die zunächst von Randić vorgeschlagen und dann extensiv weiterentwickelt wurden von Kier und Hall. Es handelt sich um echte Strukturdeskriptoren, die auf der zweidimensionalen Darstellung eines Moleküls basieren. Die Stärke dieses Ansatzes liegt darin, dass sich die Indizes direkt aus den Strukturformeln ableiten lassen und keine experimentellen Messungen erforderlich sind [Selassie, 2003; Randić, 2001; Hall, 2001].

Zur Berechnung von Konnektivitätstermen wird für jedes Atom eines Moleküls ein δ -Wert definiert, der der Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome entspricht, mit denen es verbunden ist. Des Weiteren wird jeder Bindung zwischen zwei Atomen ein Term C_s zugeordnet, der sich aus den δ -Werten der gebundenen Atome i und j nach folgender Gleichung berechnet.

$$C_s = (\delta_i \delta_j)^{-1/2} \quad (3)$$

Der Konnektivitätsindex nullter Ordnung eines Moleküls berücksichtigt nur die Atome, und keine Bindungen. Dieser Term wird wie folgt berechnet:

$${}^0\chi = \sum (\delta_i)^{-1/2} \quad (4)$$

Der Konnektivitätsterm erster Ordnung ${}^1\chi$ berücksichtigt auch die Bindungen und ergibt sich aus der Summe aller C_s -Terme mit:

$${}^1\chi = \sum C_s = \sum (\delta_i \delta_j)^{-1/2} \quad (5)$$

In der Regel beschreibt ${}^1\chi$ ein vollständiges Molekül. Es können aber auch Teilgruppen bzw. Substituenten verglichen werden. Dann bezeichnet man den Konnektivitätsterm in der Regel mit ${}^m\chi_t$, wobei m die Anzahl der Bindungen beschreibt und t die Art des Konnektivitätsterms definiert, z.B. ob es sich um einen so genannten Path, Cluster, oder einen Ring handelt.

Konnektivitätsterme zweiter Ordnung ${}^2\chi$ berechnen sich analog zu ${}^1\chi$ für zwei benachbarte Bindungen mit den Atomen i , j und k nach folgender Gleichung:

$${}^2\chi = \sum (\delta_i \delta_j \delta_k)^{-1/2} \quad (6)$$

Path und Clusterterme sind Konnektivitätsterme höherer Ordnung. Path-Terme entsprechen berücksichtigen entsprechend mehr als 2 benachbarte Bindungen und berechnen sich nach:

$${}^m\chi_p = \sum \Pi(\delta_i)^{-1/2} \quad (7)$$

Cluster Terme sind ebenfalls Terme höherer Ordnung. Sie beschreiben zum Beispiel 3 benachbarte Bindungen, die ein gemeinsames Atom teilen (Verzweigungen).

Die Konnektivitätsindizes lassen sich wie folgt interpretieren: Ein Konnektivitätsterm nullter Ordnung beschreibt Art und Anzahl der Verzweigungspunkte innerhalb eines Moleküls. Konnektivitätsterme erster und zweiter Ordnung kodieren den Verzweigungsgrad eines Moleküls und korrelieren daher mit dem molekularen Volumen und der Oberfläche. Konnektivitätsindizes höherer Ordnung ${}^m\chi_p$ beschreiben spezifische oder lokale, geometrische Charakteristika der Molekülstruktur.

Da diese Terme nicht zwischen verschiedenen Atomtypen unterscheiden wurden Valenzterme ${}^m\chi_t^v$ mit δ^v eingeführt, die definiert sind über die Anzahl der Valenzelektronen Z^v und die Anzahl der gebundenen Wasserstoffatome nach:

$$h_i \quad \delta_i^v = Z^v - h_i \quad (8)$$

Auf diese Art und Weise kann auch zwischen Einzel- und Doppelbindungen unterschieden werden. [Randić, 2001; Hall, 2001; Kier, 1977]

Es wurde gezeigt, dass die molekularen Konnektivitätsindizes mit vielen physikochemischen Parametern, wie z. B. Siedepunkt, Molrefraktion, Polarisierbarkeit und Verteilungskoeffizienten zusammenhängen. Kier stellte bereits 1977 eine Korrelation zwischen Konnektivitätsstermen und den von Amoore publizierten geruchlichen Ähnlichkeiten ausgewählter Verbindungen her. Für die Geruchsqualitäten etherisch, blumig, bittermandelartig wurden Korrelationskoeffizienten > 0.9 erzielt. Diese Arbeit bezieht sich allerdings lediglich auf Geruchsqualitäten, eine Korrelation mit der Geruchsintensität wurde nicht versucht [Kier, 1977]

Eine Weiterentwicklung und Ergänzung der molekularen Konnektivitätsindizes stellen die Elektrotopological State Indices dar. Sie codieren neben sterischen Eigenschaften auch elektronische Eigenschaften der Atome eines Moleküls und sind daher keine reinen sterischen Parameter mehr. Shvets hat diese Indices zur Beschreibung von Struktur-Geruchsbeziehungen benutzt [Shvets, 1998].

Schwachpunkt aller bisher aufgeführten Deskriptoren liegt in ihrer beschränkten Fähigkeit zur Beschreibung der dreidimensionalen Struktur eines Moleküls sowie der Berücksichtigung der Stereochemie. Da Enantiomere sich sowohl in Wirkstärke als auch in ihrer Wirkqualität erheblich unterscheiden können ist die Berücksichtigung der Stereochemie aber von entscheidender Bedeutung. Für den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fall unterscheidet sich das sehr geruchsintensive Weinlacton von seinem praktisch geruchlosen Enantiomer um acht Zehnerpotenzen [Guth, 1996] Ein tragisches Beispiel aus der Medizinalchemie ist das Thalidomid (Contergan[®]), dessen teratogene Wirkung nur auf eines der beiden Enantiomere zurückzuführen ist [Böhm, 1996]

Ein Lösungsansatz zur Berücksichtigung dreidimensionaler und stereochemischer Aspekte ist das so genannte 3D Modelling sowie 3D-QSAR Modelle CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) und CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis), die in **Kapitel 2.3.3.** der vorliegenden Arbeit näher erläutert werden.

2.3.1.2. Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Bindungen

Die häufigste Bindungsform für Protein-Ligand Komplexe sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasserstoffbrückenbindungsdonoren NH oder OH und einer entsprechenden Gegengruppe mit einer negativen Partialladung, welche als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor wirken kann, zum Beispiel Stickstoff- oder Sauerstoffatome. Wasserstoffbrücken sind elektrostatische Wechselwirkungen. Ihre Stärke beruht darauf, dass das Proton der Donorgruppe an ein stark elektronegatives Atom gebunden ist, wodurch die Elektronendichte vom Proton zum Nachbaratom verschoben wird. Die Einflussosphäre des Wasserstoffatoms wird also kleiner, dadurch kann der Akzeptor näher an das Proton heranrücken, als von der Summe der van der Waals Radien zu erwarten wäre. Die elektrostatische Anziehung zwischen den Partnern wird dadurch größer. Eine Wasserstoffbrücke besitzt eine ausgeprägte Abstands- und Winkelabhängigkeit. Sie ist direktional in engen Grenzen definiert. [Böhm 1996].

Da alle biochemischen Reaktionen in wässrigem Medium stattfinden, ist der Einfluss des Reaktionsmediums von entscheidender Bedeutung. Die solvatisierten Reaktionspartner müssen zunächst die Wasserstoffbrücken ihrer Hydrathüllen abstreifen, bevor Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand geknüpft werden können. Daher wird eine energetisch begünstigte Reaktion im wässrigen Medium möglicherweise nicht stattfinden, weil der Beitrag der zu brechenden Wasserstoffbrücken den Beitrag der Bindungsenthalpie überkompensiert. Der Ligand muss also mehr Wasserstoffbrücken zum Protein aufbauen können als dies für das Lösungsmittel allein der Fall ist. Dies kann zum Beispiel der Fall sein, wenn sich die Wassermoleküle im Gegensatz zum Liganden in der Proteinbindetasche nicht optimal ausrichten und alle Wasserstoffbrücken absättigen können [Böhm, 1996].

Im selteneren Fall von ionischen Bindungen sind geladene Gruppen des Liganden an entgegengesetzt geladene Gruppen des Proteins gebunden. Die elektrostatischen Ladungen zwischen solchen Salzbrücken sind besonders stark. Die Bildung von Protein-Ligand Komplexen ist besonders häufig bei Metallproteasen, die Metallionen als Cofaktoren besitzen, von solchen Wechselwirkungen geprägt [Böhm, 1996].

2.3.1.3 Hydrophobe Wechselwirkungen und entropische Beiträge

Hydrophobe Wechselwirkungen entstehen durch enge Nachbarschaft zwischen unpolaren Aminosäureseitenketten des Rezeptorproteins und lipophilen Gruppen des Liganden, wie zum Beispiel aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffen und Halogensubstituenten. Lipophile Teile des Proteins sind alle Teile, die keine Wasserstoffbrücken oder andere polare Wechselwirkungen ausbilden können. Sie sind nicht gerichtet, die relative Orientierung spielt außer bei Aromaten nicht so eine große Rolle wie bei Wasserstoffbrückenbindungen. Häufig stellt die hydrophobe Wechselwirkung den wichtigsten Beitrag zur Bindung, obwohl die Anziehungskraft der lipophilen Gruppen hierbei gering ist. Entscheidend ist die Freisetzung der Wassermoleküle aus ihrer lipophilen Umgebung [Böhm, 1996].

Hydrophobe Kontakte setzen ebenfalls Wassermoleküle aus den Bindetaschen frei, die nun ebenfalls untereinander Wasserstoffbrücken ausbilden können. Dadurch erhöht sich die Gesamtzahl der Wasserstoffbrücken. Außerdem sind die Wassermoleküle nicht mehr in der Bindetasche des Proteins fixiert. Ihre erhöhte Bewegungsfreiheit vergrößert die Unordnung der Teilchen und liefert einen entscheidenden Beitrag zur Entropie des Systems [Böhm, 1996]

Die hydrophobe Protein-Ligand Wechselwirkung ist demnach im Wesentlichen entropischer Natur, dadurch dass Wassermoleküle aus der Protein Bindetasche verdrängt werden. Es handelt sich nicht um direkte Wechselwirkungen, sondern durch die Assoziation des Liganden an das Protein erhöhen sich die Freiheitsgrade des Systems Protein-Ligand-Wasser. Dadurch wird der Entropieverlust durch die Assoziation von Protein und Ligand überkompensiert. Der Entropieverlust durch eine Protein-Ligand-Komplexbildung liegt in der Einschränkung der Freiheitsgrade. Beide besitzen im Komplex weniger Rotations- und Translationsfreiheitsgrade. Außerdem kann der Ligand im ungebundenen Zustand mehrere Konformationen einnehmen [Böhm, 1996]

Starre Liganden wie zum Beispiel das Weinlacton, seine Stereoisomere und hydrierten Derivate, können viel fester binden als flexible Liganden, da der Verlust an inneren Freiheitsgraden für starre Liganden wesentlich geringer ist.

2.3.2. Der Hansch Ansatz

Ein klassischer Ansatz zur quantitativen Beschreibung von Struktur Wirkungsbeziehungen ist die Hansch Analyse nach der folgenden Gleichung:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = -k_1(\log P)^2 + k_2(\log P) + k_3\sigma + \dots k \quad (9)$$

C ist hierbei eine molare Konzentration, die den gleichen biologischen Effekt hervorruft. Log P ist der Logarithmus des Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten P und genauso wie Hammettkonstante σ ein Maß für die Lipophilie einer Verbindung, welche entscheidenden Einfluss auf hydrophobe Wechselwirkungen und einen entropischen Beitrag zur Bindungsenergie hat. Der quadratische LogP Term erlaubt die Beschreibung nichtlinearer Struktur-Wirkungsbeziehungen und kann bei linearer Abhängigkeit entfallen. Jeder einzelne Term kann wegfallen, wenn er für die betreffende Struktur-Wirkungsbeziehung nicht relevant ist. Andere Terme wie die Polarisierbarkeit oder sterische Parameter können zusätzlich aufgenommen werden [Vandeginste, 1998; Böhm, 1996; Hansch, 1964].

Die Koeffizienten k_1 , k_2 bis k werden mittels Regressionsanalyse ermittelt. Das Ergebnis dieser Rechnung beurteilt man über die Summe der Abweichungsquadrate, die zwischen allen gemessenen biologischen Werten und den durch das Modell berechneten Werten den kleinstmöglichen Wert annehmen sollte [Vandeginste, 1998; Böhm, 1996; Hansch, 1964]

Die Hansch Analyse erlaubt die Beschreibung eines Datensatzes mit einem mathematischen Modell. Über die Art der Deskriptoren, die für die Beschreibung der Struktur-Wirkungsbeziehung signifikant sind, sind Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der Substanzen möglich. Auch kann in begrenztem Maße die Wirkung unbekannter Verbindungen vorhergesagt werden [Vandeginste, 1998; Böhm, 1996; Hansch, 1964]

Dreidimensionale Information über die Beschaffenheit der betreffenden Moleküle kann nur sehr begrenzt, z.B. über das Volumen von Molekülen berücksichtigt werden. Unterschiedliche Wirkmechanismen von Enantiomeren, die gleiche physikalische Eigenschaften und Molekülvolumina haben sind über dieses Modell nur schwer zu beschreiben. Eine erste Methode, die

diese Information berücksichtigt, ist die CoMFA Methode und ihre Weiterentwicklungen, die im Folgenden Kapitel näher erläutert werden.

2.3.3. CoMFA, CoMSIA und Almond

Die Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA), die 1988 von R. D. Cramer vorgestellt wurde ist auch heute noch das am häufigsten benutzte Verfahren in der 3D-Struktur-Wirkungsanalyse. Zur Durchführung einer CoMFA-Analyse werden zunächst dreidimensionale Modelle für alle Moleküle des Datensatzes erzeugt und überlagert. Anschließend werden die überlagerten Moleküle in ein Gitter eingelagert. Die Gitterpunkte weisen typischer Weise einen Abstand von ein bis zwei Å auf. Für jeden Gitterpunkt werden dann die Wechselwirkungsenergien mit einer Atomsonde, z.B. mit den Eigenschaften eines Wasserstoff-, Sauerstoff- oder Kohlenstoffatoms, berechnet. Die Gesamtheit aller Wechselwirkungsbeiträge bezeichnet man als Feld des Moleküls. Anschließend werden der Einfluss von mehreren tausend Feldpunkten jedes einzelnen Moleküls des Datensatzes mittels Partial Least Square Analyse statistisch ausgewertet [Vandeginste, 1998; Böhm, 1996].

Die Wechselwirkungsenergien werden über ein Lennard Jones- bzw. Coulomb Potentials beschrieben. Das Lennard Jones Potential ist abhängig von dem Abstand der Teilchen r und beschreibt van der Waals Wechselwirkungen zwischen nicht verbundenen Atomen gemäß der folgenden Gleichung:

$$E_{LJ} = \sum \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (10)$$

($A \cdot r^{-12}$) ist immer positiv und konvergiert mit abnehmendem Abstand der Atome gegen Unendlich. A beschreibt die Abstoßung zwischen zwei Atomen, die sich zu nahe kommen. Der Term ($- B \cdot r^{-6}$) beschreibt die anziehenden Wechselwirkungen zwischen zwei Teilchen. Der Betrag ist immer negativ und geht mit zunehmendem Abstand gegen Null.

Das Coulomb Potential beschreibt die Wechselwirkungsenergien zwischen geladenen Teilchen in Abhängigkeit von der Dielektrizitätskonstante D , der Ladung der Teilchen q und dem abstand der Teilchen r , und gemäß der folgenden Gleichung:

$$E_c = \sum \frac{q_A \cdot q_B}{D \cdot r} \quad (11)$$

Wenn der Abstand zwischen der Atomsonde und einem Atom des Moleküls gegen Null geht strebt das Coulomb Potential für gleich geladene Teilchen gegen $+\infty$ und für entgegengesetzt geladene Teilchen gegen $-\infty$. Bei der Berechnung der Wechselwirkungsenergien über das Lennard Jones Potential und Coulomb Potential werden hydrophobe und damit entropische Beiträge nur indirekt erfasst, z.B. darüber dass hydrophobe Moleküle keine bzw. nur geringe Partialladungen tragen. Zur expliziten Berechnung eines hydrophoben Felds eignet sich das Softwareprogramm HINT [Böhm, 1996; Höltje, 1996]

Außerdem werden bei der Berechnung der Wechselwirkungsenergien über die oben beschriebenen Potentiale extrem große Feldbeiträge erreicht wenn die Gitterpunkte besonders nahe an der Oberfläche oder innerhalb eines Moleküls liegen. Sie werden aus der CoMFA Analyse ausgeschlossen durch die Einführung von Grenzwerten. Nachteil hierbei ist, dass bei einer üblichen Maschenweite des Gitters von zwei Å, das sehr steil ansteigende Lennard Jones Potential von praktisch Null bis auf den Grenzwert ansteigen kann, was oft zu zerrissenen und daher schwer interpretierbaren Feldern führt. Ein Ansatz zur Lösung ist Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA) Hierbei werden die Moleküle analog zur CoMFA Methode überlagert und anschließend werden die Ähnlichkeiten zu einer Atomsonde, zum Beispiel einem Kohlenstoffatom, an jedem Gitterpunkt berechnet. Das Ähnlichkeitsmaß zwischen Sonde und Molekül wird abstandabhängig über eine Gaußfunktion definiert. Im Gegensatz zur klassischen CoMFA Analyse strebt diese Funktion gegen einen endlichen Wert, so dass keine Grenzwerte definiert werden müssen [Böhm, 1996].

Zeitaufwendigster und kritischer Schritt bei der Durchführung einer CoMFA Analyse ist die vorbereitende Überlagerung der Moleküle. Der Erfolg einer CoMFA Analyse hängt entscheidend von einer sinnvollen Überlagerung der betreffenden Moleküle ab, was insbesondere wenn das Targetprotein und die Art der Wechselwirkung unbekannt ist keine triviale Aufgabe darstellt. Ein neuer Ansatz, der diesen zeitaufwendigen Schritt umgeht ist das Softwareprogramm Almond, das auf so genannte gridunabhängige Deskriptoren (GRIND) und deren relativen Abständen zueinander beruht [1,2]

2.3.4. 3D-Modelling

2.3.4.1 Generierung von dreidimensionalen Strukturen

Erster Schritt bei der Untersuchung von dreidimensionalen Struktur Wirkungsbeziehungen ist die *in silico* Generierung möglichst realistischer dreidimensionaler Molekülmodelle. Die meisten Softwareprogramme besitzen eine Eingabeeinheit in der man die betreffenden zweidimensionalen Formeln der entsprechenden Moleküle zeichnet. Aus diesen wird dann im nächsten Schritt ein dreidimensionales Molekülmodell berechnet. Zur anschließenden geometrischen Optimierung stehen molekülmechanische Methoden, die so genannten Kraftfeldern, semi-empirische und *ab initio* Verfahren zur Verfügung [Höltje, 1996].

2.3.4.2. Molekülmechanik

Kraftfeld- oder molekülmechanische Methoden sind empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und Energien. In der Molekülmechanik werden die Atome eines Moleküls vereinfacht als Massepunkte betrachtet, deren Wechselwirkungen auf einfache mechanische Gesetze reduziert werden können. Die zentrale Annahme der Molekülmechanik besteht darin, dass Bindungen wann immer möglich Standardwerte einnehmen. Die Gleichgewichtsbindungs-längen, Bindungswinkel und entsprechenden Kraftkonstanten sind als Parameter für jedes Kraftfeld definiert. Jede Abweichung von Standardwerten resultiert in einer Erhöhung der Gesamtenergie des Moleküls. Die Gesamtenergie ist also ein Maß für intermolekulare "Strains" im Vergleich zu einem hypothetischen Molekül mit idealer Geometrie. Darüber hinaus hat die Gesamtenergie allein keine physikalische Bedeutung. Der allgemeine Vorteil von Kraftfeldrechnungen liegt in ihrer Geschwindigkeit und breiten Anwendbarkeit bei immer noch ausreichender Genauigkeit [Höltje, 1996; Böhm, 1996].

Die meisten Kraftfelder berücksichtigen die folgenden Energieterme, deren Summe die Gesamtenergie E_{tot} eines Moleküls ergibt:

$$E_{\text{total}} = E_{\text{stretch}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{static}} \quad (12)$$

E_{stretch} beschreibt die Energieänderung bei Bindungsdehnung und Stauchung, E_{bend} berücksichtigt den Einfluss des Bindungswinkels zwischen zwei Atomen. E_{tors} beschreibt die Energieänderung bei Änderung des Torsionswinkels. Die beiden Terme E_{vdW} und E_{static} beschreiben Wechselwirkungen zwischen Atomen, die nicht kovalent aneinander gebunden sind.

Im einfachsten Fall beschreibt E_{stretch} die Energieänderung bei Dehnung und Stauchung einer chemischen Bindung analog zum Hooke'schen Gesetz nach:

$$E_{\text{stretch}} = \frac{1}{2} k_b (b - b_o)^2 \quad (13)$$

Hierbei ist k_b die Kraftkonstante und b_o ist die Gleichgewichts-, das heißt ideale Bindungslänge und b ist die tatsächliche Bindungslänge. In ausgefeilteren Kraftfeldmethoden werden zusätzliche Terme dritter oder vierter Ordnung berücksichtigt.

Die Energieänderung durch Winkeldeformation E_{bend} wird ebenfalls über einen harmonischen Term beschrieben nach:

$$E_{\text{bend}} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 \quad (14)$$

K_θ ist die Kraftkonstante der Winkeldeformation, θ_o ist der Gleichgewichtsbindungswinkel und θ ist der tatsächliche Bindungswinkel.

Die Änderung der Energie in Abhängigkeit des Torsionswinkels E_{tors} wird üblicher Weise über eine Cosinusfunktion beschrieben. Es gilt:

$$E_{\text{tors}} = \frac{1}{2} k_\varphi (1 + \cos(n\varphi - \varphi_o)) \quad (15)$$

K_φ ist die Torsionsbarriere, φ der tatsächliche Torsionswinkel, n die Periodizität, das heißt die Anzahl der Energieminima eines vollen Rotationszyklus und φ_o ist der Referenzwinkel.

Van der Waals Wechselwirkungen nicht direkt miteinander verbundener Atome werden in der Regel über ein Lennard Jones Potential gemäß Gleichung (10) beschrieben. Elektrostatische

Wechselwirkungen werden über einen Coulomb Term gemäß Gleichung (11) berechnet. Ladungen können entweder berechnet werden oder sind in Form von empirisch ermittelten Parametersets in den Kraftfeldern enthalten. Manche Kraftfelder enthalten darüber hinaus Kreuzterme, "out of plane"-Terme, Wasserstoffbrückenterme sowie differenzierte Funktionen zur Beschreibung der potentiellen Energie.

Außerdem unterscheidet man Geometrieoptimierungsmethoden erster und zweiter Ableitung. Eine Optimierungsmethode erster Ableitung ist die *Steepest Descent Methode*. Hierbei wird die Energie für eine Startgeometrie berechnet und dann wird Atom für Atom inkrementweise bewegt und die Energie erneut berechnet. Dieser Prozess wird wiederholt bis alle Atome neue Positionen im Sinne einer Bergabbewegung auf der Energiehyperfläche gefunden haben. Die Berechnung endet wenn ein vordefiniertes Minimumkriterium erreicht wird. Diese Berechnungsmethode ist sehr langsam, wenn man sich in der Nähe des Minimums befindet und wird in der Regel für ungenau definierte Ausgangsstrukturen oder zum Relaxieren gezeichneter Strukturen verwendet. Bei der *Conjugate Gradient Methode* wird die Information über die vorhergehende in die nächste Iteration mit ein. Dieser Ansatz eignet sich besonders für größere Systeme. Die *Newton-Raphson Minimiser Methode* ist eine Methode zweiter Ableitung. Hierbei wird die zweite Ableitung der Funktion benutzt, um vorherzusagen wann die Funktion ein Minimum durchläuft. Vorteil dieser Methode ist die Effizienz der Methode je näher man sich am Minimum befindet. Ein Nachteil liegt in ihrem erhöhten Rechenaufwand und möglicher Instabilität für rigide Moleküle [Höltje, 1996].

Wichtig bei der Verwendung von Kraftfeldmethoden ist auch die Berücksichtigung des Lösungsmittels. Wird das Lösungsmittel vernachlässigt und eine Geometrieoptimierung im Vakuum vorgenommen, um Rechenzeit einzusparen, dann können zum Beispiel intermolekulare Wasserstoffbrücken begünstigt sein, die in einem wässrigen System nicht realistisch sind. Außerdem ist die Auswahl der Startgeometrie äußerst wichtig. Ausgehend von einer ungünstigen Startgeometrie kann die Kraftfeldrechnung energetisch bergab in einem lokalen Minimum der Energiehyperfläche enden, das nicht dem globalen Minimum entspricht. Günstig ist daher immer eine Geometrieoptimierung ausgehend von unterschiedlichen Startgeometrien durchzuführen [Böhm, 1996].

Die Verlässlichkeit und Qualität von Kraftfeldern ist abhängig von ihrer Parametrisierung. Daher muss für jede Berechnung das geeignete Kraftfeld ausgewählt werden. Es gibt zahlrei-

che Kraftfelder für die Berechnung organischer Moleküle, während andere Programme besser geeignet sind für Proteine und andere Biopolymere. Typische Kraftfelder für große Moleküle sind zum Beispiel AMBER, GROMOS und CHARM. Kraftfelder für kleine Moleküle sind zum Beispiel, MM2, MM3 und MM4 nach Allinger, das Tripos Force Field und das Merck Molecular Force Field MMFF94 [Kunz, 1997; Höltje 1996].

2.3.4.3 Quantenmechanische Rechenverfahren

In *ab initio*-oder quantenmechanischen Berechnungsverfahren erfolgt die Geometrieoptimierung mit der Schrödinger Gleichung, die allerdings nur für triviale Fälle, wie z. B. für das Wasserstoffmolekül möglich ist. Für Mehrelektronensysteme ist man zur Lösung des quantenmechanischen Vielteilchensystems auf Näherungen angewiesen. Die am häufigsten benutzte Näherung ist das **Hartree-Fock Verfahren**. Hierbei wird das Vielteilchenproblem auf ein Einteilchenproblem zurückgeführt. Jedes Elektron sieht in diesem Modell neben dem Potential der Kerne das gemittelte Potential der übrigen Elektronen und der Zustand jedes Elektrons eines Moleküls wird durch eine Einteilchenfunktion, das Atom- bzw. Molekülorbital beschrieben. Die Wellenfunktion des gesamten Moleküls ergibt sich als antisymmetrisches Produkt der einzelnen Orbitale. Optimal gewählte Orbitale führen zu einer minimalen Energie. Der wesentliche Fehler des Hartree-Fock Ansatzes liegt in der Vernachlässigung der Elektronenkorrelation. Diese kann unter Zunahme der Rechenzeit durch weitergehende Verfahren korrigiert werden. Vorteil der quantenmechanischen Rechenverfahren ist, dass keine Annahmen nötig sind wie bei den Kraftfeldverfahren, wo man den Hybridisierungsgrad des Atoms vorher festlegen muss. Bei einer fehlerhaften Annahme liefert ein Kraftfeld kein sinnvolles Ergebnis. Quantenmechanische Berechnungen benötigen solche Annahmen nicht [Böhm, 1996].

Quantenmechanische Berechnungsverfahren unterscheiden sich in ihren Basissätzen. Der einfachste Basissatz STO-3G steht für Slater Type Orbitals. Die Orbitale werden hier näherungsweise durch jeweils 3 Gaussfunktionen beschrieben. Es handelt sich um einen minimalen Basissatz der die kleinstmögliche Anzahl an Atomorbitalen beinhaltet, die notwendig sind um alle Elektronen der Atome im Grundzustand zu berücksichtigen. Es wird eine kugelförmige Gestalt der Atome wird angenommen.

Bei den Split Valence Basissätze werden die Valenzorbitale über eine innere und äußere Basisfunktion beschrieben, was eine flexiblere Beschreibung des Aufenthaltsortes der Elektronen ermöglicht. Gängige Basissätze sind 3-21G, 4-31G und 6-31G. Sie unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der Gaußfunktionen zur Beschreibung der inneren und äußeren Hülle. 4-31G steht zum Beispiel für 4 Kernorbitale, 3 innere und 1 äußeres Valenzorbital.

Eine Weiterentwicklung liegt in der Berücksichtigung der Polarisierbarkeit. Zu allen nicht Wasserstoffatomen werden d-Orbitale hinzugefügt und es wird erlaubt, dass p-Orbitale sich vom Kern zu verschieben, was zu einer Polarisierung des Atoms führt. Dies ist wichtig für Verbindungen mit kleinen Ringen. Polarisierungsbasisätze sind gekennzeichnet mit einem Stern, z. B. 6-31G*. Dieser Basissatz benutzt 6 Gaussfunktionen für den Kern und einen Split von 3/1 für die inneren und äußeren Valenzorbitale. Darüber hinaus ein Satz von 6 d-Orbitalen, gekennzeichnet durch den Stern.

Quantenmechanische Verfahren sind im Vergleich zu Kraftfeldern sehr zeitaufwendig. Drastisch reduziert werden kann die Rechenzeit unter Verwendung semiempirischer Methoden, die einen Mittelweg zwischen einem empirischen und einem quantenmechanischen Ansatz wähle. Hierbei werden Näherungen eingeführt für die Lösung der Integrale, deren Berechnung für *ab initio*-Verfahren geschwindigkeitsbestimmend ist.

Hauptproblem für die quantenmechanischen Berechnungsmethoden liegt in der Dimensionalität. Diese kann reduziert werden durch nur teilweise explizite Berücksichtigung der Elektronen durch Beschränkung auf die Valenzelektronen. Semi-empirische Methoden unterscheiden sich darin, wo Näherungen vorgenommen werden. In Abhängigkeit vom betrachteten System können unterschiedliche Effekte vernachlässigt werden, z. B. kann für organische Moleküle der Einfluss von d-Orbitalen vernachlässigt werden, wenn keine Übergangsmetalle betroffen sind. Semiempirische Methoden eignen sich je nachdem welche Näherungen eingeführt werden für unterschiedliche Anwendungen. Semiempirische Methoden sind CNDO, MINDO, MNDO, AM1 und PM3 [Kunz, 1997].

2.3.4.4. Konformationsanalyse

Geometrische Optimierungen mittels molekülmechanischer oder quantenchemischer Methoden beinhalten die Optimierung von Bindungswinkeln und Längen, eine Konformationsanalyse der Moleküle muss jedoch separat durch systematisches Betrachten aller drehbaren Bindungen eines Moleküls erfolgen. Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Konformationsuche sind Moleküldynamiksimulationen und Monte Carlo Verfahren.

Ein systematisches Ausprobieren aller möglichen Konformationen ist extrem zeit- und rechenaufwendig. Die Monte Carlo Verfahren wählen daher die Startgeometrien nach dem Zufallsprinzip, wodurch das jeweilige Energieminimum mit geringerem Rechenaufwand gefunden wird. Hierbei werden die Koordinaten der Atome durch Zufallszahlen besetzt und die jeweilige Energie berechnet. Koordinatensätze mit tiefer Energie sind Kandidaten für lokale Minima und werden für weitere Bearbeitung ausgewählt. Vollständigkeit der Lösung ist ein unlösbares Problem. Methode hat größte Effizienz für kleine Moleküle. Große flexible Moleküle haben Potentialhyperflächen mit hohen Bergen und engen Tälern, die nicht immer erfolgreich gefunden werden [Kunze, 1997; Böhm, 1996].

Moleküldynamiksimulationen (MD) berücksichtigen die Bewegung der Moleküle in Abhängigkeit von der Temperatur indem die zeitabhängige Bewegung eines Moleküls simuliert wird. Ausgangspunkt ist eine geometrisch optimierte Struktur. Den einzelnen Atomen werden dann willkürlich Geschwindigkeiten zugeordnet, so dass eine vorher definierte interne Temperatur erreicht wird. In festgelegten Zeitabschnitten wird die neue Lage der Atome berechnet. So kann die Bewegung jedes einzelnen Kerns eines molekularen Systems in seiner zeitlichen Evolution verfolgt werden. Moleküldynamikrechnungen sind sehr zeitaufwendig und eignen sich besonders dafür den Konformationsraum kleiner Moleküle abzusuchen [Kunz, 1997; Böhm, 1996].

2.3.4.5. Weiterführende Ansätze

Liegen die dreidimensionalen Strukturen der Wirkstoffe vor, können verschieden Ansätze für ein wissensbasiertes Design neuer Wirkstoffe gewählt werden. Ist die Struktur des Proteintar-

gets bekannt, kann mit einem Dockingexperiment überprüft werden, ob ein beliebiger Ligand in die Bindetasche des Proteins hineinpasst. Auf diese Art und Weise können Datenbanken mit mehreren 100.000 Verbindungen auf in silico getestet werden. Neue, bisher nicht vorhandene Molekülkonstruktionen, werden mit so genannten De novo Design Methoden aus einem Pool von Fragmenten in der Bindetasche aufgebaut [Böhm, 1996].

Ist die Struktur des Targetproteins unbekannt, so erlaubt die genaue Betrachtung der Liganden und ihrer biologischen Aktivitäten ebenfalls Rückschlüsse auf die Bedingungen, die ein optimaler Ligand zu erfüllen hat. Durch Überlagerung der Moleküle anhand ihrer pharmakophoren Punkte lassen sich so genannte Pharmakophorhypothesen aufstellen. Auch lässt sich die maximale Ausdehnung der Bindetasche ableiten. Auch hier beschleunigen Datenbanksuchen nach Strukturen, die die entsprechenden pharmakophoren Bedingungen erfüllen, die Suche nach neuen Wirkstoffen [Böhm, 1996].

2.4. Statistische Methoden

Die beiden statistischen Methoden, die in der vorliegenden Arbeit Anwendung finden, sind die Partial Least Square Regression und Neuronale Netze nach Kohonen, deren theoretischer Hintergrund im Folgenden vorgestellt wird.

2.4.1. Künstliche Neuronale Netze

Künstliche bzw. Artifizielle Neuronale Netze (ANN) wurden ursprünglich entwickelt als ein Modell der Informationsverarbeitung durch das menschliche Gehirn. Heute werden solche Neuronale Netze zu unterschiedlichen Zwecken benutzt. Ein Ansatz liegt in der Aufklärung der Funktionsweise des menschlichen Nervensystems durch die möglichst genaue Imitation desselben. Der auch dieser Arbeit zugrunde liegende Ansatz liegt in der Anwendung des Berechnungsformalismus zur Lösung praktischer Rechenprobleme. Das Ziel ist hierbei die Ausnutzung des Konzepts zur Lösung von Problemen, nicht das bessere Verständnis der neurophysiologischen Funktion [Vandeginste, 1998].

Basiseinheit eines Artifiziiellen Neuronalen Netzwerkes ist das Neuron, das die Funktion einer Nervenzelle imitiert. Eine typische Nervenzelle besteht aus einem Zellkörper (Soma) und hat zwei Arten von Fortsätzen, die Dendriten und das Axon. Die Dendriten erhalten Signale von anderen Zellen und senden diese an das Soma. Das Axon leitet das Signal an andere Nervenzellen weiter. Für das Neuron als Basiseinheit wird daraus der in **Abbildung 5** dargestellte Aufbau abgeleitet.

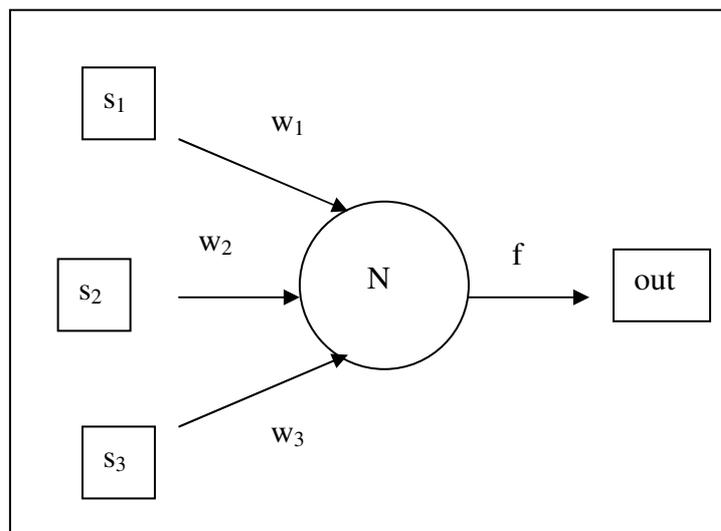


Abbildung 2.5: Aufbau eines künstlichen Neurons N mit Eingangssignalen s_1 bis s_3 , Gewichten w_1 bis w_3 , Transferfunktion f und Ausgangssignal out .

Ein artifizielles Neuron N ist eine Berechnungseinheit, die in diesem Beispiel die simultanen Eingangssignale s_1 bis s_3 erhalten kann. Diese werden über die zugehörigen Gewichte w_1 bis w_3 entsprechend Gleichung (16) zu einem Gesamteingangssignal zusammengefasst.

$$Net = w_1 s_1 + w_2 s_2 + w_3 s_3 \quad (16)$$

$$out = f(Net) \quad (17)$$

Diese werden dann mittels einer nichtlinearen Transferfunktion f in ein Ausgangssignal übersetzt gemäß Gleichung (17). Häufig verwendete Transferfunktionen sind Hard-Limiter Funktionen, Schwellenwert Logik und sigmoide Funktionen [Zupan, 1993].

Die Nervenzellen im menschlichen Nervensystem weisen alle den gleichen Aufbau auf. Abgesehen von Intensitätsunterschieden ist die Art des übertragenen Signals von Neuron zu Neuron ebenfalls identisch. Daher geht man davon aus, dass das Netzwerk als Ganzes bzw. die Art und Weise, wie die Neuronen miteinander verschaltet sind, die Funktionalität des Netzwerkes bestimmen. Anzahl, Ebenen und Verschaltung der Neuronen untereinander, sowie die Art des Trainingsprozesses stellen daher charakteristische Kenngrößen für die unterschiedlichen Arten von Artifizialen Neuronalen Netzen dar [Vandeginste, 2003; Zupan, 1993]

2.4.1.1. Neuronale Netzwerke nach Kohonen

In der vorliegenden Arbeit wurden neuronale Netze nach Kohonen eingesetzt. Hierbei erfolgt durch eine einfache Zuordnungsfunktion nach Ähnlichkeit eine Projektion einer dreidimensionalen Moleküloberfläche in Form ihrer x,y,z Koordinaten auf ein Neuronales Netzwerk, wobei die Dimensionalität des Datensatzes reduziert wird.

Kohonen Netzwerke gehören zu den "self organising maps" und sind geeignet für nicht überwachte Mustererkennungsaufgaben. Ein Kohonen Netzwerk besteht aus einer Schicht von Neuronen, in der Regel in einer zweidimensionalen Anordnung definierter Topologie, d.h. in diesem Zusammenhang mit einer definierten Anzahl von nächsten Nachbarn. In einer quadratischen Anordnung hat jedes Neuron zum Beispiel acht nächste Nachbarn, während sich bei einer hexagonalen Anordnung sechs nächste Nachbarn ergeben (**Abbildung 6**) [Vandeginste, 2003; Zupan, 1993].

Nach dem Kohonen Konzept werden die Eingabedaten so auf der Kohonen Map abgebildet, dass ähnliche Signale Neuronen anregen, die räumlich dicht beieinander liegen. Der Kohonen Lernprozess beinhaltet die Anpassung des Signalraumes auf das Neuronale Netz. Das Ziel des Kohonen Lernprozesses ist die Abbildung gleicher Signale auf gleichen Neuronen. Für die Nachbarschaftsbeziehung der Neuronen ist es wichtig, dass jedes Neuron gleich viele Nachbarn besitzt. Dies ist nicht der Fall für diejenigen Neuronen, die sich am Rande der zweidimensionalen Anordnung befinden. Dieses Problem kann gelöst werden, indem die Anordnung der Neuronen so gewählt wird, dass sich aus der zweidimensionalen Anordnung wie in **Abbildung 7** angedeutet ein Torus ergibt [Vandeginste, 2003; Zupan, 1993].

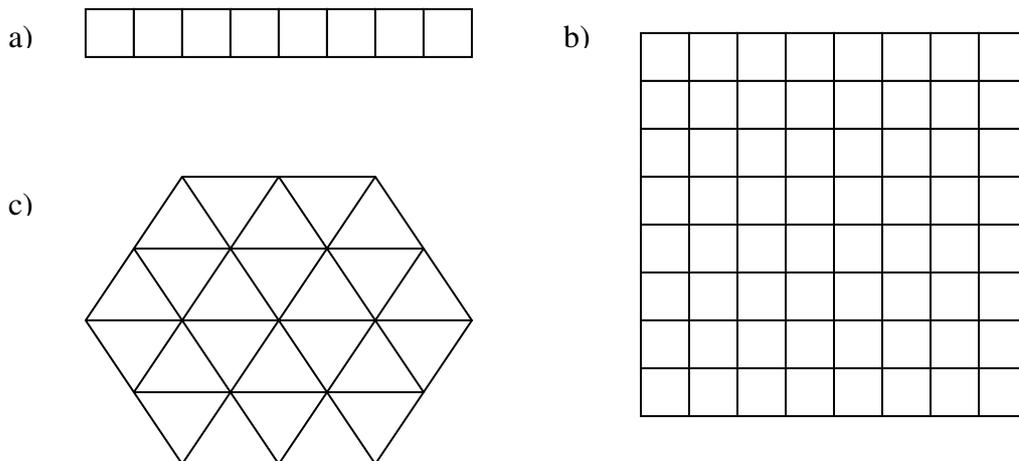


Abbildung 2.6: Typische Anordnungen von Neuronen in Kohonen Netzwerken. a) eindimensionale Anordnung von acht Neuronen. b) zweidimensionales rechteckiges Netzwerk, jedes Neuron, das sich nicht am Rand befindet hat acht Nachbarn c) zweidimensionales hexagonales Netzwerk, jedes Neuron, das sich nicht am Rande befindet hat sechs Nachbarn

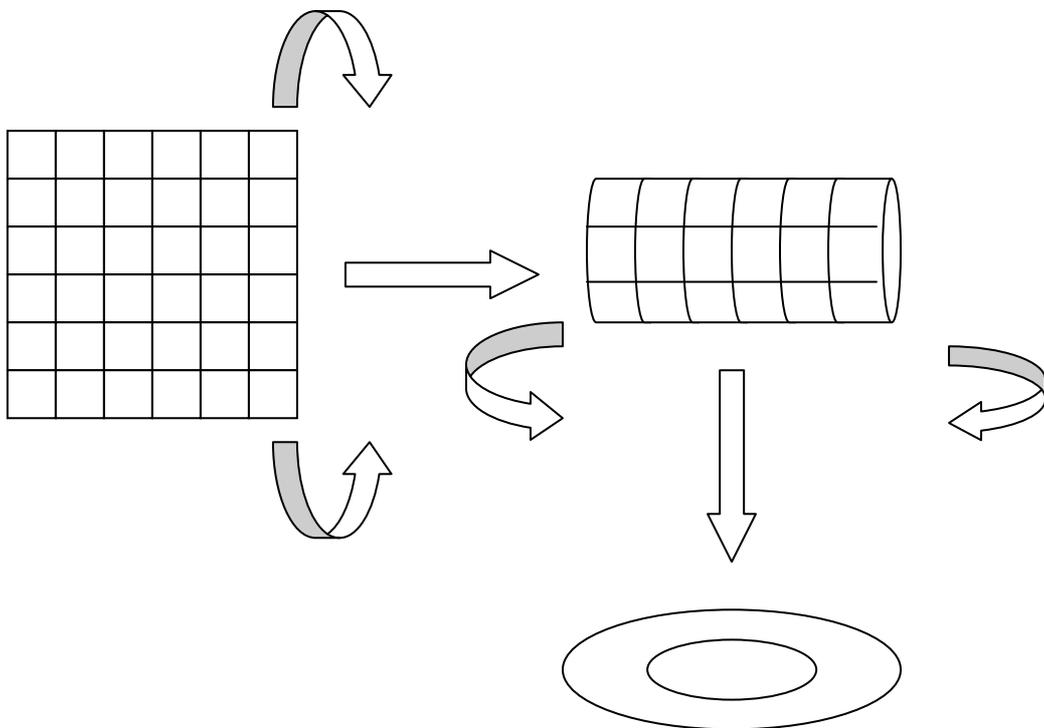


Abbildung 2.7: Torusartige Ausrichtung eines zweidimensionalen rechteckigen Neuronen Netzwerkes

Trainingsprozess

Bei einem kompetitiven Lernprozess wird nach Eingabe eines jeweiligen Inputvektors nur dasjenige Neuron aktiviert, das dem Eingabewert am Ähnlichsten ist. Diesem Neuron wird er Eingabewert zugeordnet, während alle anderen Neuronen, egal wie ähnlich sie dem Eingabewert sind, praktisch leer ausgehen. Diese Methode wird auch als "the winner takes it all" Methode bezeichnet. Nachdem das Gewinnerneuron definiert ist, wird sein Gewichtsvektor dem Eingabewert noch besser angepasst. Die Gewichte benachbarter Neuronen werden ebenfalls angepasst, aber in geringerem Ausmaß als das Gewinnerneuron selbst. Zusätzlich wird der Effekt mit jedem Iterationsschritt ebenfalls kleiner. Das Ausmaß der Korrektur benachbarter Neuronen wird durch eine so genannte Scaling Funktion bestimmt [Zupan, 1993].

Der Trainingsprozess kann folgt zusammengefasst werden: Anfangs haben alle Gewichtsvektoren Zufallswerte. Es wird ein Ähnlichkeitsmaß D zwischen jedem Gewichtsvektor und jedem Eingabemuster x berechnet. Das Neuron in der Kohonen Map, das dem Eingabevektor am ähnlichsten ist "gewinnt" und wird aktiviert. Die Gewichte des Gewinnerneurons werden wie folgt angepasst:

$$w(t+1) = w(t) + \eta(x - w(t)) \quad (18)$$

w ist der Gewichtsvektor und η ist die Lernrate. Die Gewichte der Einheiten in nächster Nachbarschaft werden ebenfalls angepasst und zwar gemäß:

$$w(t+1) = w(t) + \eta N(t,r)(x - w(t)) \quad (19)$$

$N(t,r)$ ist eine vordefinierte Nachbarschaftsfunktion in der r den Abstand zwischen dem angepassten Neuron und dem Gewinnerneuron beschreibt. Als Nachbarschaftsfunktionen kommen unter anderem Blockfunktionen, Triangelfunktionen, Gaußsche Glockenkurven in Frage. Das gemeinsame Prinzip aller Nachbarschaftsfunktionen ist, dass diejenigen Neuronen, die dem Gewinnerneuron am nächsten sind, am stärksten angepasst werden.

Diese Schritte werden für alle Eingabemuster wiederholt und der gesamte Zyklus mehrfach durchlaufen. Während des Trainingsprozesses wird die Nachbarschaftsfunktion üblicherweise eingeschränkt, so dass das Netzwerk konvergieren kann.

Resultat aus der Trainingsprozedur ist, dass die Gewichtsvektoren des Gewinnerneurons und seinen Nachbarn den Eingabevektoren immer mehr annähern. So werden ähnliche Eingabevektoren auf derselben Region abgebildet. Da keine abhängige Variable mit dem Ziel einer Korrelation in den Trainingsprozess eingeht, wird diese Art des Trainings als "nicht überwacht bezeichnet [Vandeginste, 2003]

2.4.1.2. Mögliche Darstellungen des Ergebnisses

Output Activity Maps

Ein trainiertes Kohonen Netzwerk gibt für einen Eingabevektor x_i ein Gewinnerneuron mit dem Gewichtsvektor w_w , der dem Eingabewert x_i am ähnlichsten ist. Die Darstellung der Ähnlichkeit der aller Gewichtsvektoren zum Gewinnervektor w_w mit einem Farbcode erlaubt die Inspektion von Regionen, die einen ähnlichen Gewichtsvektor haben wie ein gegebener Eingabevektor x_i . Für jeden Eingabevektor x ergibt sich ein andere Output Activity Map.

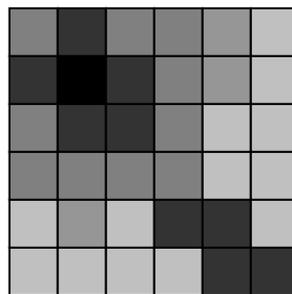


Abbildung 8: Beispiel für ein Output Activity Map für einen Eingabevektor. Das Gewinnerneuron ist schwarz markiert. Je dunkler der Farbcode der anderen Neuronen, desto ähnlicher sind ihre Gewichte dem Eingabevektor.

Belegungsdichtemaps (Counting Maps)

Hierbei wird die Anzahl der Objekte, die einem Neuron zugeordnet wurden über einen Farbcode dargestellt. Je mehr Objekte in einem Neuron enthalten sind, desto dunkler der Farbcode. Diese Darstellungsweise erlaubt die Identifikation von Clustern auf der Kohonen Netzwerkkarte gemäß **Abbildung 2.9**. In der vorliegenden Arbeit wurden Belegungsdichtedifferenzen für unterschiedliche Moleküle berechnet, um Bereiche maximaler Differenz in der Moleküloberfläche zu identifizieren.

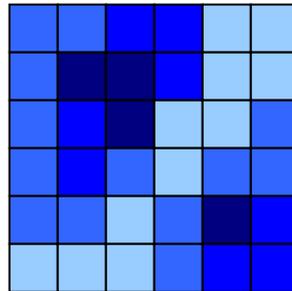


Abbildung 2.9: Belegungsdichtemap für einen kompletten Satz von Eingabevektoren. Je dunkler der Farbcode, desto mehr Eingabevektoren wurden dem betreffenden Neuron zugeordnet. In diesem Beispiel können zwei Cluster auf der Netzwerkkarte identifiziert werden.

Feature Maps

so genannte Feature Maps werden erhalten, wenn die Trainingsobjekte mit zusätzlichen Labels versehen werden, die dann als Farbcode oder Zahlencode auf der Kohonen Netzwerkkarte abgebildet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde zum Beispiel das mittlere Elektrostatische Potential für die in jedem Neuron enthaltenen Oberflächendatenpunkte als Farbcode auf die Kohonen Maps projiziert.

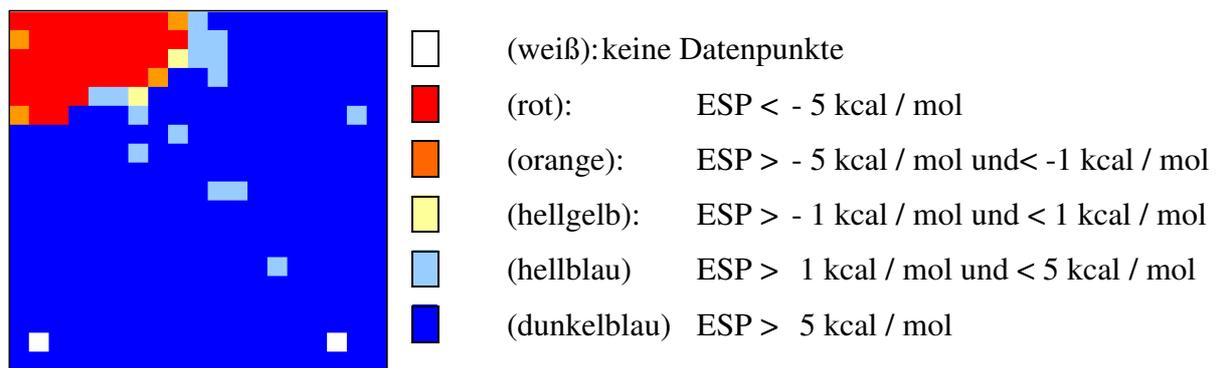


Abbildung 2.10: Beispiel für eine Kohonen Feature Map, bei der das Elektrostatische Potential (ESP) der enthaltenen Datenpunkte auf die Kohonen Map projiziert wurde.

2.4.1.3. Anwendung von Kohonen Netzwerken zum Vergleich von Moleküloberflächen

Bei der Anwendung von Kohonen Netzwerken zum Vergleich von Moleküloberflächen nach Gasteiger [Polanski, 1998; Gasteiger, 1994a] dienen die 3D-Koordinaten x_i einer Moleküloberfläche als Eingabevektoren für das Neuronale Netz (**Abbildung 2.11**). Jeder Eingabevektor wird jeweils dem Neuron zugeordnet, dessen Gewichtsvektor w_i dem Eingabevektor am Ähnlichsten ist. Dabei werden die Gewichtsvektoren der Neuronen den Eingabevektoren, hier den Koordinaten der Moleküloberfläche durch den Trainingsprozess angepasst. Werden die Gewichtsvektoren des Neuronalen Netzes in den dreidimensionalen Raum projiziert, so haben diese vor dem Training die Form eines Torus. Nach Abschluss des Trainings ähnelt diese eher dem Referenzmolekül. Um unterschiedliche Moleküle zu vergleichen müssen diese die gleiche räumliche Orientierung aufweisen, d.h. es muss eine sinnvolle Überlagerung generiert werden. Außerdem kann man einen Single- oder einen Multiple Template Approach verfolgen.

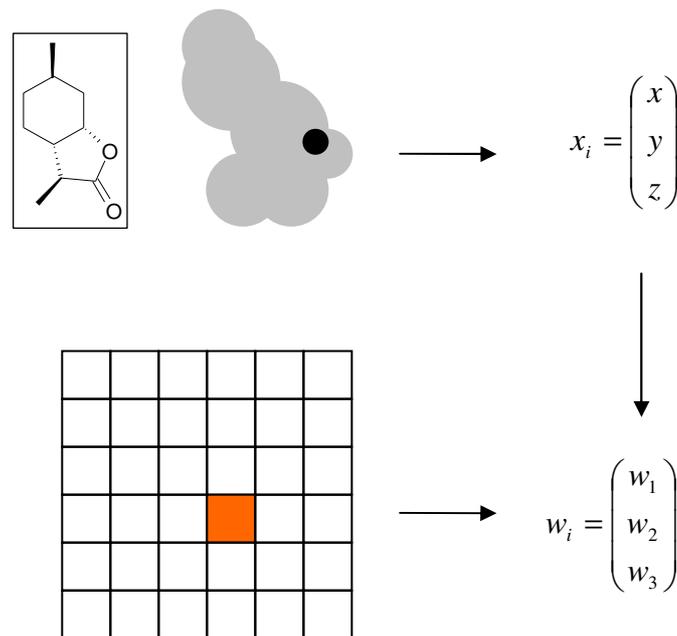


Abbildung 2.11: Projektion einer Moleküloberfläche auf ein Kohonen Netz

Bei dem so genannten Single Template Approach (**Abbildung 2.12**) wählt man dasjenige Molekül mit optimalen Eigenschaften zum Beispiel dem niedrigsten Geruchsschwellenwert aus, um ein Netzwerk zu trainieren. Anschließend werden nacheinander alle Testmoleküle auf das mit dem Referenzmolekül trainierte Netzwerk projiziert.

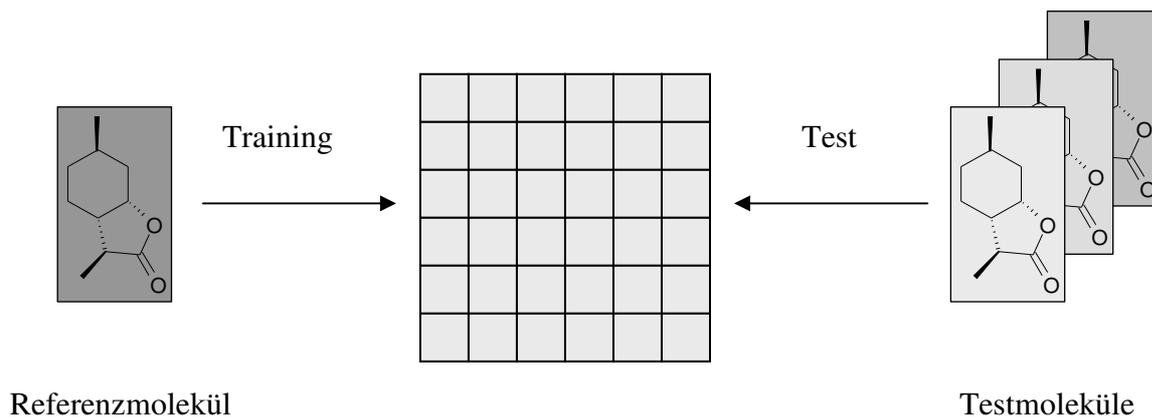


Abbildung 2.12: Single Template Approach

Die Wahl der Referenzstruktur hat entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis der Berechnung. Daher ist in manchen Fällen die Anwendung eines Multiple Template Approach (**Abbildung 2.13**) angemessen. Dabei wird für jedes Molekül des Datensatzes jeweils ein separates Netzwerk trainiert. Anschließend erfolgt die Projektion des Referenzmoleküls auf jedes einzelne dieser Netzwerke. Der Nachteil dieses Ansatzes liegt in seinem höheren Zeitaufwand, da für jedes Molekül des Datensatzes ein eigenes Netzwerk trainiert werden muss.

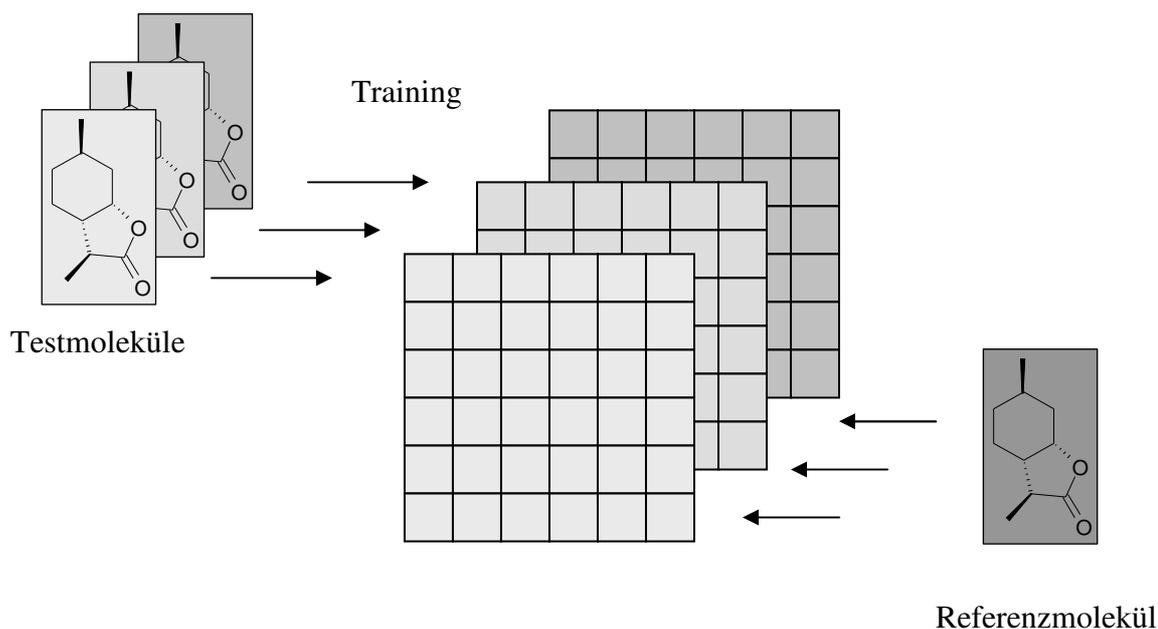


Abbildung 2.13: Multiple Template Approach

Die erhaltenen Kohonen Maps erlauben zunächst einen visuellen Vergleich der Moleküle. Die gesamte 3D Information ist auf den Kohonen Karten enthalten, man sieht das Molekül praktisch auf einen Blick von allen Seiten gleichzeitig. Auch chirale Informationen gehen hierbei nicht verloren. In der vorliegenden Arbeit wurde der numerische Output des Neuronalen Netzes einer Partial Least Square Regression zur Herstellung einer Korrelation mit den jeweiligen Geruchsschwellenwerten unterworfen. Das Prinzip dieser statistischen Methode wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

2.4.2. Partial Least Square Regression (PLS)

Die Partial Least Square Regression (PLS) ist eine Methode der Hauptkomponentenregression, und stellt eine Kombination aus der Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) und der Multiplen Linearen Regression (MLR) nach der Least Squares Methode dar [Danzer, 2001].

Ziel der klassischen Hauptkomponentenanalyse ist es, die Variablen einer Datenmatrix durch eine geringere Zahl von unkorrelierten Hauptkomponenten (Faktoren, latente Variablen) so darzustellen, dass die ursprüngliche Information der Variablen weitestgehend erhalten bleibt. Voraussetzung hierfür ist, dass ein Teil der Variablen miteinander korrelieren und damit redundante Information enthalten. Dabei kann man zwei Extremfälle unterscheiden: Wenn alle Variablen unkorreliert sind, dann ist eine Dimensionsreduktion ohne Informationsverlust unmöglich. Der andere Extremfall tritt ein, wenn alle Variablen vollständig untereinander korreliert sind. In diesem Fall lässt sich die Information auf eine Dimension reduzieren [Danzer, 2001].

Geometrisch kann man die Hauptkomponentenanalyse als Rotation des m-dimensionalen Koordinatensystems der Originalvariablen in das neue Koordinatensystem der Hauptkomponenten interpretieren. Die neuen Achsen werden dabei so aufgespannt, dass die erste Hauptkomponente (PC1) in Richtung der maximalen Varianz der Daten zeigt. Die weiteren Hauptkomponenten stehen jeweils senkrecht dazu und weisen in Richtung der jeweils verbleibenden maximalen Varianz. Dieses Verfahren wird solange durchgeführt, bis eine vorher festgesetzte Anzahl von Faktoren extrahiert wurde oder ein anderes Abbruchkriterium erfüllt wurde [Danzer, 2001; [5]].

Das Ziel der Partial Least Square Regression ist nun die latenten Faktoren / Hauptkomponenten so zu definieren, dass sie Vorhersagekraft für die abhängige Variable besitzen und die unabhängigen Variablen effektiv beschreiben. Die Hauptkomponenten einer PLS stellen modifizierte PCA-Hauptkomponenten dar. Ihre Abweichung von den PCA-Komponenten dient der Verbesserung der Korrelation mit der vorherzusagenden Variablen auf Kosten der Varianz der Faktoren [Danzer, 2001]

Für eine ausführliche Herleitung der mathematischen Grundlagen, die den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würden, sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen [Danzer, 2001; Field, 2000; Massart, 1997; Vandeginste, 1998; [4-7]]

2.5. Struktur-Geruchsbeziehungen, Stand der Forschung

Versuche, die Zusammenhänge zwischen Struktur und Geruch zu erklären, gehen über ein Jahrhundert zurück. Bereits 1918 hat der Chemie Nobelpreisträger Leopold Ruzicka beschrieben, dass die geruchlichen Eigenschaften einer Substanz von der Form des Moleküls bestimmt wird, während die osmophoren (funktionellen) Gruppen lediglich Variationen der geruchlichen Eigenschaften hervorrufen [Boehlens, 2003a].

Eine der ersten umfassenden Theorien zum Thema Struktur Geruchsbeziehungen wurde in den 70er Jahren von John E. Amoore aufgestellt. In seiner "Stereochemischen Geruchstheorie" korreliert er die spezifische Geruchsqualität einer chemischen Verbindung mit ihrem Klotzenmodell. Dabei definiert er zunächst die fünf Primärgerüche camphrig, moschusartig, blumig, minzig und etherisch. Nach seiner Theorie wird der camphrige Geruch von kugelförmigen Molekülen ausgelöst, während eine moschusartige Geruchsqualität eine scheibenförmige Anordnung erfordert. Auch stellt er Hypothesen über die räumlichen Dimensionen der Rezeptorbindestelle auf und definiert zum Beispiel eine Länge von 11,5 Å, eine Breite von 9 Å und eine Tiefe von 4 Å für den Moschusrezeptor. Mischgerüche sollen dadurch zustande kommen, dass ein Riechstoff in der Lage ist, an mehrere Rezeptorstellen zu binden. Später dehnt Amoore seine Theorie aus und definiert weitere Primärgerüche, die er aus dem Auftreten spezifischer Anosmien ableitet [Ohloff, 1990; Amoore, 1977].

Seitdem hat es zahlreiche Veröffentlichungen zum Thema Struktur-Geruchsbeziehungen gegeben, Übersichtsartikel wurden zum Beispiel veröffentlicht von [Boelens 2003a und 2003b; Kraft, 2000, Frater 1998; Chastrette 1997; Rossiter 1996b].

Die meisten Arbeiten stellen Fallstudien dar, die sich auf die Beschreibung statistischer Zusammenhänge zwischen ausgewählten Deskriptoren und der Geruchsqualität beschränken. Geruchsintensitäten in Form von Geruchsschwellenwerten sowie stereochemische Aspekte werden in den meisten Arbeiten nicht berücksichtigt.

2.5.1 Beispiele für Fallstudien

Einer der ersten Fallstudien wurde 1977 von Lemont B. Kier veröffentlicht. Er korreliert molekulare Konnektivitätsindizes erfolgreich mit Literaturdaten zur Odor Similarity (OS) von etherischen, blumigen und benzaldehydartigen Riechstoffen, sowie zur spezifischen Anosmie gegenüber Fettsäuren [Kier, 1977]. Eine der ersten Arbeiten, die die Erzeugung dreidimensionaler Strukturmodelle beinhaltet, ist die Studie von Paul E. Edwards, die eine Korrelation der Geruchsschwellenwerte von 59 Verbindungen unterschiedlicher Geruchsqualität mit einer Reihe von strukturellen, topologischen und geometrischen Deskriptoren herstellt. Fragwürdig ist in diesem Zusammenhang die Ausdehnung der Korrelation auf Verbindungen höchst unterschiedlicher Geruchsqualität und Einbeziehung von Nicht-Aromastoffen, wie zum Beispiel Pyridin und Acetonitril [Edwards, 1989]. Chirale Aspekte werden in beiden Arbeiten nicht berücksichtigt.

M. Chastrette veröffentlichte 1992 eine Reihe von Fallstudien unter Berücksichtigung der Stereochemie. Mit dem Softwarepaket Alchemy II wurden dreidimensionale Molekülmodelle von 16 Enantiomerenpaaren generiert und anhand deren Überlagerungen Rückschlüsse über den Einfluss der Stereochemie auf die Ausprägung einer campherartigen, urinartigen, amberartigen bzw. nootkatonartigen Geruchsqualität diskutiert. Chastrette unterscheidet hierbei drei Kategorien von stereochemischen Effekten. 1. Der Geruch zweier Enantiomere unterscheidet sich weder in Geruchsqualität noch in Geruchsintensität, wie zum Beispiel für die beiden Enantiomere des Campher. 2. Enantiomere besitzen dieselbe Hauptnote bezüglich ihrer Geruchsqualität, unterscheiden sich aber in ihren Nebentonalitäten und ihrer Geruchsintensität, wie für das urinartig riechende 2-Methyl-4-(5,5,6-exo-trimethyl-2-exo-norbornyl)-cyclohexanon beschrieben. 3. Die geruchlichen Eigenschaften zweier Enantiomere unterscheiden sich in Geruchsqualität und Intensität, wie zum Beispiel beim Nootkaton, dessen (+)-Enantiomer einen grapefruitartigen Geruch aufweist, während das (-)-Enantiomer eine holzige Note besitzt. Als kritischer Schritt für die Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen wird die Wahl des Referenzmoleküls und die Art der Überlagerung herausgestellt, da diese allein auf empirischen Regeln und dem Sachverständnis des Chemikers beruht. Da bei insgesamt 16 Enantiomerenpaaren und vier verschiedenen Geruchsqualitäten nur drei bis sechs Enantiomerenpaare berücksichtigt wurden, besitzt diese Studie leider nur eingeschränkte statistische Relevanz [Chastrette, 1992]

Neueste Fallstudien mit begrenzter statistischer Relevanz haben zur erfolgreichen Synthese neuer spirocyclischer Ether mit amberartigem Geruch [Winter, 2004], sowie den neuen proprietären Geruchstoffen Fleuranil[®] und Khusinil[®] als funktionelle Riechstoffe geführt [Narula, 2004]. Weitere Studien werden weiter unten im Zusammenhang mit einzelnen Geruchsqualitäten besprochen.

2.5.2 Olfaktophorhypothesen

Ein weiterer Ansatz besteht in der Entwicklung von Olfaktophorhypothesen. Analog zu Pharmakophorhypothesen im Wirkstoffdesign werden durch die Überlagerung aktiver Moleküle so genannte pharmakophore bzw. olfaktophore Features definiert, die allen aktiven Molekülen gemeinsam sind. Nicht aktive Verbindungen geben Aufschluss über verbotene Bereiche, die sich negativ auf die Geruchsintensität bzw. Qualität auswirken.

Basierend auf der entwickelten Hypothese ermöglichen Datenbanksuchen ein systematisches, virtuelles Screening nach Verbindungen, die die gleichen Eigenschaften erfüllen und für das anschließende Laborexperiment priorisiert werden. Für die Geruchstoffchemie krankt dieser Ansatz an der Verfügbarkeit analoger Datenbanken sowie der Überprüfbarkeit des Modells mit ausreichend diversen Strukturen. Im Jahr 2002 hat Fumiko Yoshii zum Beispiel eine Datenbank für Geruchstoffe vorgestellt, die insgesamt 1205 Chemikalien und 287 Geruchstoffe enthält [Yoshii, 2002]. Vergleichbare Datenbanken in der Medizinalchemie besitzen bis zu einer Million Strukturen und darüber.

Beispiele für Olfaktophorhypothesen

Eine der ersten Arbeiten, die eine solche Olfaktophorhypothese für Monoterpenlactone aufstellt, wurde 1990 von Hideki Tabeta veröffentlicht. Es wird eine Dreipunktinteraktion mit der Carbonylgruppe, der Hydroxygruppe und einer Alkylgruppe mit einem korrespondierenden Wasserstoffdonor, einem Protonenakzeptor und einer hydrophoben Tasche auf der Seite des Rezeptorproteins vorgeschlagen. Die Arbeit basiert auf zwölf Monoterpenlactonen nicht nur unterschiedlicher Geruchsintensität sondern auch -qualität. Da Geruchstoffe unterschiedlicher Geruchsqualität unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen mit den Geruchsre-

zeptoren aufweisen, ist die Ableitung eines einheitlichen Interaktionsmodells fraglich. Auch wurde der Einfluss der Stereochemie nicht berücksichtigt [Tabeta, 1990]

Chastrette stellt 1998 ein Interaktionsmodell für minzige Geruchstoffe vor. Für insgesamt 150 Verbindungen, davon 68 mit minzeartigem und 82 mit nicht minzeartigem Geruch, wurden unter Verwendung des Softwarepakets Sybyl dreidimensionale Molekülmodelle generiert und nach Überlagerung mit einem Referenzmolekül anhand eines Root Mean Square Distance Parameters verglichen. Die Untersuchungen führten zur Ableitung eines "Mintyphores", das aus einem alicyclischen Ring, einer oxygenierten funktionellen Gruppe, einem equatorialen Alkylsubstituenten und einem weiteren Wasserstoffatom oder Alkylsubstituenten besteht. Auch werden Distanz- und Volumenkriterien für die unterschiedlichen Features aufgestellt [Chastrette, 1998].

Ein weiteres Beispiel für eine Olfaktophorhypothese stammt von Jerzy A. Bajgrowicz. Unter Verwendung des Softwarepaketes Catalyst und unter ausdrücklicher Berücksichtigung der Stereochemie leitet er aus 18 Verbindungen hoher und mittlerer Geruchsintensität und 19 Verbindungen schwacher bis nicht vorhandener Geruchsintensität ein Sandelholz Olfaktophor ab, das aus einem Wasserstoffbrückendonator und vier hydrophoben Regionen in festgelegten interfunktionellen Abständen besteht [Bajgrowicz, 2000]. Weitere Olfaktophorhypothesen aus dem Hause Givaudan wurden von Philip Kraft in einem Übersichtsartikel zusammengefasst und umfassen die Geruchsqualitäten Birne, Galbanum, Maiglöckchen, Ambra und Moschus [Kraft, 2000].

2.5.3 Ligandenbasierte und strukturbasierte Ansätze

Da die dreidimensionale Struktur des Geruchsrezeptors und die Beschaffenheit der Bindestelle weitgehend unbekannt sind, erfolgt die Entwicklung solcher Olfaktophorhypothesen in der Geruchstoffchemie weitgehend ligandenbasiert. Die untersuchten Liganden sind sich in der Regel sehr ähnlich und stammen häufig aus ein und derselben Substanzklasse. Die Abdeckung des gesamten Rezeptorraums ist in diesen Fällen eher unwahrscheinlich.

Ist die dreidimensionale Struktur des Rezeptors bekannt, kann ein strukturbasierter Ansatz unter Einbeziehung des Zielproteins durchgeführt werden. Das strukturbasierte Design geht davon aus, dass ein Wirk- oder Aromastoff an ein definiertes Zielprotein bindet, wobei eine

weitgehende strukturelle und chemische Komplementarität zwischen Zielprotein und Ligand Voraussetzung ist für eine starke und selektive Bindung an das Zielprotein. Die Suche nach einem Molekül, das möglichst perfekt in die Bindetasche des Zielproteins hineinpasst, nennt man strukturbasiertes Design [Böhm et al. 1996].

Strukturbasierte Ansätze können beispielsweise zur Untersuchung Wechselwirkungen von Aromastoffen mit der Lebensmittelmatrix dienen. Für viele Lebensmittelproteine wie β -Lactoglobulin und Bovine Serumalbumin ist die dreidimensionale Struktur des Proteins bekannt, so dass theoretische Docking Experimente durchgeführt werden können [Guth, 2004].

Für die Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen mangelt es an der Verfügbarkeit dreidimensionaler Strukturen des jeweiligen Rezeptorproteins. Mittels Homologiemodelling können aus der Aminosäuresequenz bekannter Geruchrezeptoren Hypothesen für dreidimensionale Strukturen zwar theoretisch berechnet werden, doch sind diese nicht am Experiment überprüfbar [Hummel, 2005; Hall, 2004].

2.5.4 Beispiele für einzelne Geruchsqualitäten

Im Folgenden werden beispielhaft einige Arbeiten im Zusammenhang mit ihren Geruchsqualitäten bzw. Substanzklassen zusammengefasst.

Zahlreiche Studien beziehen sich auf einen Datensatz über die Substanzklasse der Alkylpyrazine mit nussigem, erdigem, süßem und erbsigem Geruch. Die Geruchschwellenwerte von 80 Alkylpyrazinen wurden vorgestellt und die Zusammenhänge zwischen Substitutionsmuster und Geruchsintensität herausgearbeitet. Auch wurde analog zu den oben diskutierten Olfaktophorhypothesen eine Rezeptorhypothese für Pyrazine mit erdigem Geruch abgeleitet [Wagner, 1999].

2.5.4.1 Untersuchung unterschiedlicher statistischer Verfahren für die Anwendung von Struktur-Geruchsbeziehungen bei Pyrazinen:

Gerhard Buchbauer stellte unter Verwendung von Literaturdaten unterschiedlicher Quellen eine schwellenwertbasierte Studie vor. Die Korrelation der Geruchsschwellenwerten von 46 Pyrazinen gleicher Geruchsqualität mittels QSAR und CoMFA lieferten beide zufrieden stellende Resultate bezüglich statistischer Signifikanz und Vorhersagekraft. Eine Kombination der klassischen CoMFA Felder mit einer separaten multiplen linearen Regression lieferte hierbei die besten Ergebnisse [Buchbauer, 2000].

Außerdem wird der Einsatz eines Neuronalen Netzwerkes nach Multilayer Perceptron Methode erfolgreich für die Korrelation von Geruchsqualität und -intensität von 98 Pyrazinen der Geruchsqualität grün, paprika und nussig eingesetzt [Wailzer 2001]. In einer weiteren Studie wird das Multilayer Perceptron Netzwerk und die Self-Organising Molecular Field Analysis (SOMFA) erfolgreich zur Klassifizierung von 50 Pyrazinen eingesetzt, die erdigen, grünen oder einen Mischgeruch aufweisen [Klocker 2002b]. Zuletzt wurde die Einsetzbarkeit von Bayesian Neural Networks ebenfalls erfolgreich anhand von 133 Pyrazinen dargestellt [Klocker 2002a]. Ovidiu Ivanciuc setzte so genannte Vektor Maschinen zur Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen bei Pyrazinen ein [Ivanciuc, 2002].

2.5.4.2 Stand der Forschung auf dem Gebiet der amberartigen Geruchstoffe

Günther Ohloff fasste Olfaktion als Mehrpunktwechselwirkung zwischen Stimulus und aktiver Stelle eines Rezeptormoleküls auf und entwickelte die "triaxiale Regel der Geruchsensation" für amberartigen Geruch. Demnach ist ein trans-Dekalinsystem mit drei axialen Gruppen in 1,2,4 Position notwendig für die Ausprägung einer amberartigen Geruchsqualität. Die Substituenten in 1 und 2 Position könne Wasserstoffe sein, ihre Funktion liegt lediglich darin, dass eine trans-Konfiguration des Dekalinsystems sichergestellt ist. Die funktionelle Gruppe in Position 4 sollte einen Sauerstoff in Form einer Alkohol-, Ether- oder Estherfunktion sein [Rossiter, 1996b; Ohloff 1990].

Die Entdeckung von Cyclohexyltetrahydrofuran als einem neuen amberartigen Geruchstoff führte unter Verwendung eines elektronisch topologischen Ansatzes zur Entwicklung des Amberdreiecks. Ausgehend von dem Postulat, dass Struktur und Stereochemie ausgedrückt in Bindungswinkeln, Bindungslängen und Abständen zwischen spezifischen funktionellen Gruppen nicht genügen, sondern dass elektronische Eigenschaften wie die Atombeiträge zum höchsten besetzten und niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (HOMO und LUMO) berücksichtigt werden müssen, kombiniert der so genannte elektronisch-topologische Ansatz (ET) die molekulare Konformation (Topologie) und die elektronische Struktur eines Moleküls zur Erklärung von Struktur Geruchsbeziehungen [Rossiter 1996b; Ohloff, 1990]

Ein neuerer elektronisch-topologischer Ansatz stellen die elektronentopologischen Nachbarschaftsmatrizen (Electronic-Topological Matrices of Contiguity, ETMC) nach Shvets und Dimoglo dar. Die Anwendung dieser Matrizes führte zur Ableitung zweier notwendiger Fragmente für amberartigen Geruch. Das erste Fragment enthält ein Sauerstoffatom und vier Kohlenstoffatome definierten Abstands. Das zweite Fragment enthält zwei Methylgruppen in definiertem Abstand. Eine weitere Bedingung für amberartigen Geruch ist die sterische Verfügbarkeit des Sauerstoffs von 6 \AA^2 [Shvets, 1998; Rossiter, 1996b; Bersuker, 1991].

Die sterische Verfügbarkeit des Sauerstoffs steht im Einklang mit Arbeiten von Winter, die sich ausschließlich auf die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Sauerstoffatoms konzentriert. Dieser Ansatz wurde unter Verwendung des Softwarepakets MacroModel wieder aufgegriffen und führte, obwohl lediglich Razemate untersucht wurden, zum Design neuer spirocyclischer Ether mit Ambergeruch [Winter, 2004; Rossiter 1996b].

Bajgrowicz und Broger führten unter Verwendung des Softwarepakets CATALYST eine dreidimensionale QSAR Studie unter Berücksichtigung einer Reihe von energetisch erlaubten Konformationen von Ambergeruchstoffen durch. Es wurde eine Olfaktophorhypothese abgeleitet auf vier hydrophoben Regionen, einem gerichteten Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor und sechs Ausschlussvolumina beruht. Außerdem wurden die Dimensionen der Rezeptorbindetasche eingegrenzt. Dieses Modell wurde erfolgreich zum Design und zur Optimierung eines spirocyclischen Campherderivats als neuem Ambergeruchstoff eingesetzt [Kraft, 2000; Rossiter, 1996b].

Eine neuere Studie unter Verwendung elektronentopologischer Nachbarschaftsmatrizen führt zur Definition eines aktiven Ambergris Fragmentes (AAF), das die An- bzw. Abwesenheit eines amberartigen Geruchs von 181 Geruchstoffen korrekt beschreibt. Das AAF besteht aus einem Sauerstoffatom und drei Kohlenstoffatomen in definierten Abständen und definierten Atomladungen [Gorbachov, 1999].

Alle vorgestellten Studien über Ambergeruchstoffe klassifizieren lediglich die Anwesenheit und Abwesenheit eines amberartigen Geruchs. Die Geruchsintensität ausgedrückt in Geruchsschwellenwerten wird nicht berücksichtigt.

2.5.4.3 Stand der Forschung auf dem Gebiet der Ester mit fruchtigen Geruch.

Karen Rossiter hat die Hansch Analyse, CoMFA und Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis) angewendet auf einen Datensatz aus 27 Estern. Die Geruchsintensität von 10%igen Lösungen der Analyten in Diethylphtalat wurde im Vergleich zu Ethylpentanoat als Standard bestimmt. Alle drei Methoden lieferten ein Modell, das die fruchtige Geruchsintensität der Ester mit einer begrenzten Anzahl von molekularen Deskriptoren korrelieren konnte. Vorteile und Grenzen der einzelnen Methoden werden ausführlich diskutiert [Rossiter 1996a]. Topologischer Indizes wurden ebenfalls erfolgreich als Deskriptoren zur statistischen Korrelation und Vorhersage des fruchtigen Geruchs eingesetzt [Amboni, 2000].

2.5.4.4 Stand der Forschung auf dem Gebiet der Lactone

Für eine ausführliche Übersicht über Wichtigkeit und Vorkommen von Lactonen in Lebensmitteln, ihre Geruchsqualitäten und Geruchsschwellenwerte in Wasser und Öl sei verwiesen auf Maga [Maga, 1976] und Dufossé [Dufossé, 1994]. Mosandl beschreibt darüber hinaus die Geruchsqualitäten und -intensitäten von γ - und δ -Lactonen unter Berücksichtigung der Stereochemie [Mosandl, 1988 und 1989]. Zur Bestimmung der geruchlichen Eigenschaften wurden 1%ige Lösungen der betreffenden Lactone in Propylenglykol aufgebracht auf Riechstreifen, so dass eine Vortäuschung anderen Geruchsqualität oder zu niedriger Geruchsschwellenwerte durch Spuren eines geruchsintensiveren Stereoisomers nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann. Geruchsschwellenwerte enantiomerenreiner γ - und δ -Lactone, die mittels chiraler GC-Olfaktometrie bestimmt wurden, sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die unter 2.5.2 bereits erwähnten Olfaktophorhypothese für Monoterpenlactone lässt stereochemische Aspekte ebenfalls unberücksichtigt [Tabeta, 1990].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese von Modellverbindungen. Konformationsanalyse

3.1.1. Modellverbindungen

Die in den **Abbildungen 3.1 bis 3.4** aufgeführten Verbindungen wurden zur Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen herangezogen. Arbeitsvorschriften für die selbst synthetisierten Lactone, sowie Bezugsquellen für kommerziell erhältliche Verbindungen finden sich im Experimentellen Teil (Verweis dieser Arbeit).

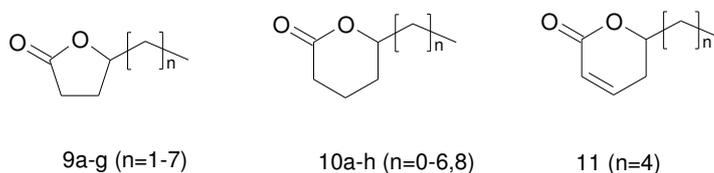


Abbildung 3.1: Modellverbindungen. Monocyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig und pfirsichartig

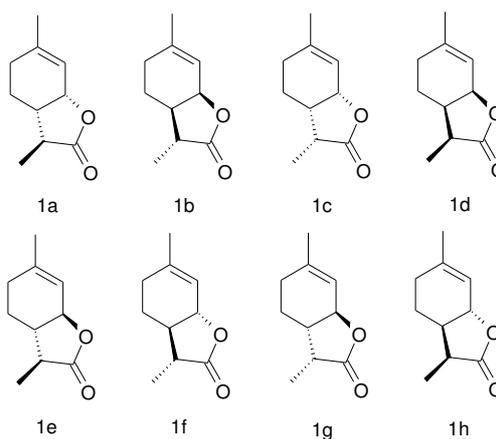


Abbildung 3.2: Modellverbindungen. Ungesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig.

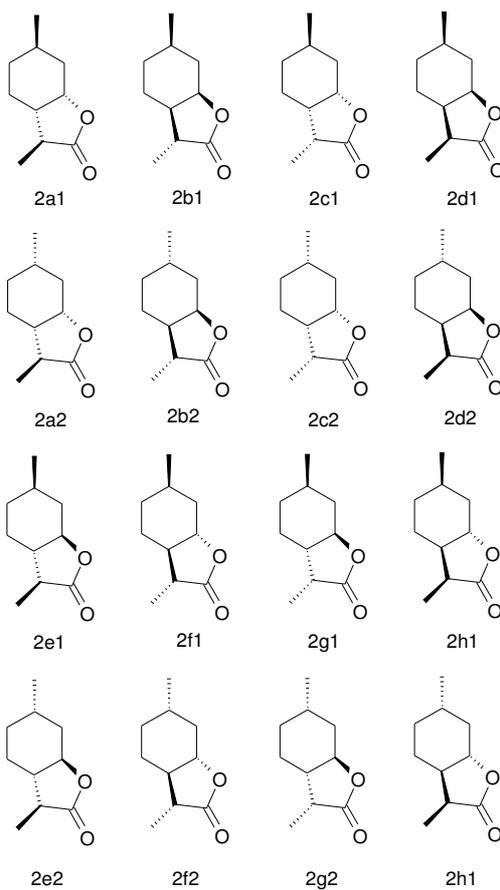


Abbildung 3.3: Modellverbindungen. Gesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig

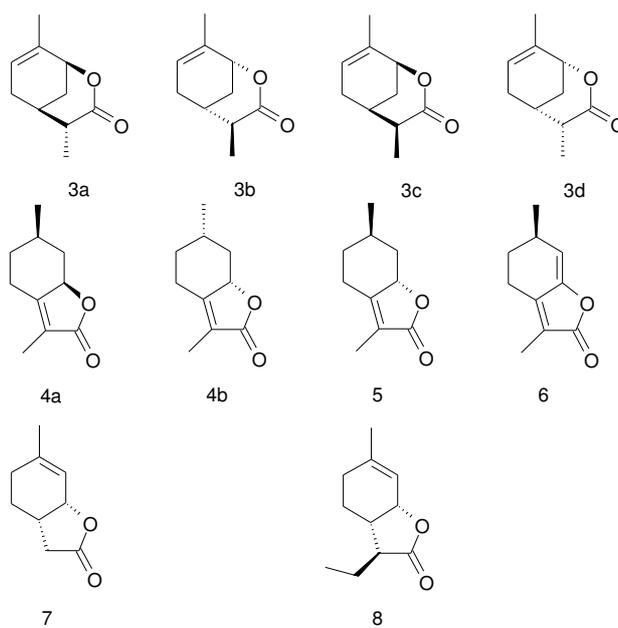


Abbildung 3.4: Modellverbindungen. Weitere bicyclische Lactone unterschiedlicher Geruchsqualität

3.1.1 Enantioselective Synthese der 8 Stereoisomere von 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon.

Die enantioselective Synthese der acht Stereoisomeren des 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranons (Abbildung 1, 1a-h) erfolgte nach Guth (1996) entsprechend dem in **Abbildungen 3.5a** und **3.5b** gezeigten Reaktionsschema. Arbeitsvorschriften der einzelnen Reaktionschritte finden sich in Anhang dieser Arbeit.

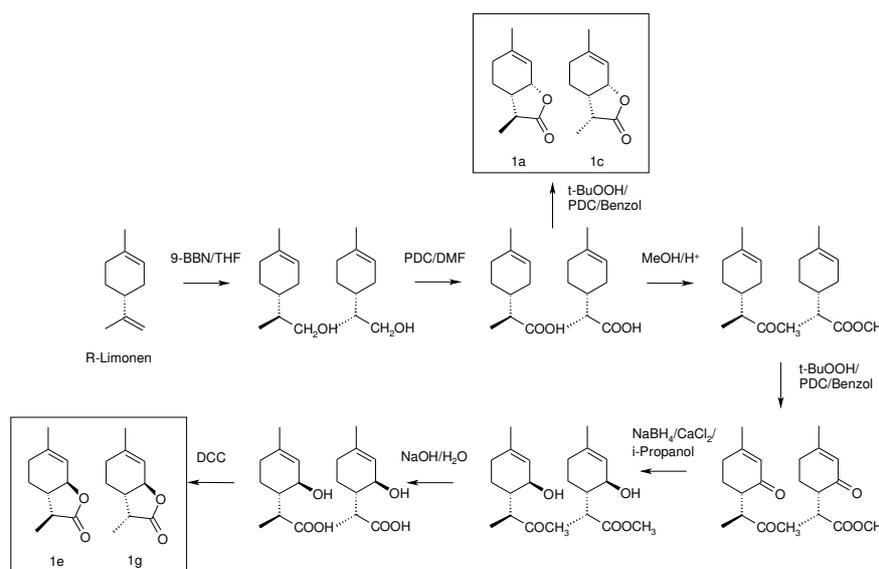


Abbildung 3.5a: Reaktionsschema für die enantioselective Synthese der bicyclischen Lactone 1a, 1c, 1e und 1g nach Guth (1996).

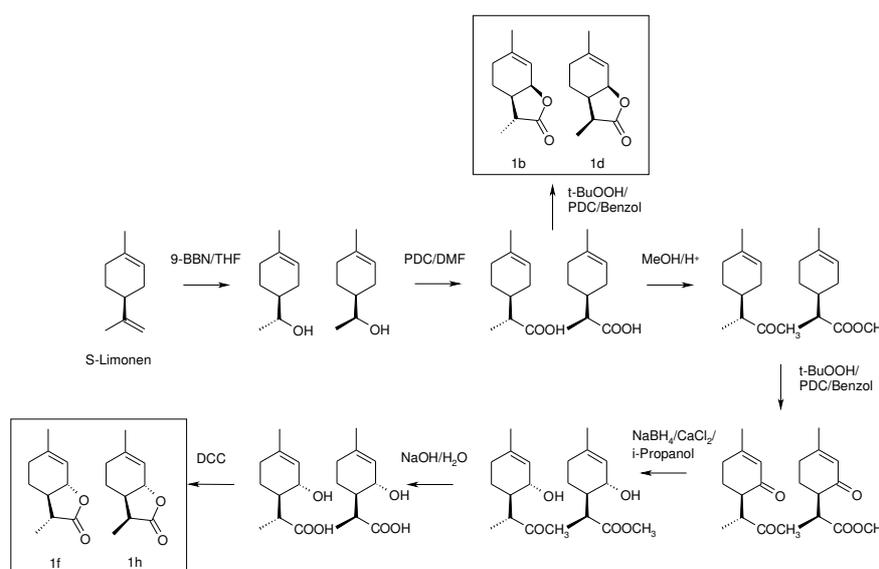


Abbildung 3.5b: Reaktionsschema für die enantioselective Synthese der bicyclischen Lactone 1b, 1d, 1f und 1h nach Guth (1996).

3.1.2 Enantioselektive Synthese der 16 Stereoisomere (2a₁₋₂-2h₁₋₂) von Dimethylhexahydrobenzofuranon

Die 16 Isomere der Dimethylhexahydrobenzofuranone (2a₁₋₂-2h₁₋₂) wurden entsprechend dem in **Abbildung 3.6** dargestellten Syntheschema durch selektive Hydrierung über Rhodium aus den acht enantiomerenreinen 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranonen 1a-h synthetisiert.

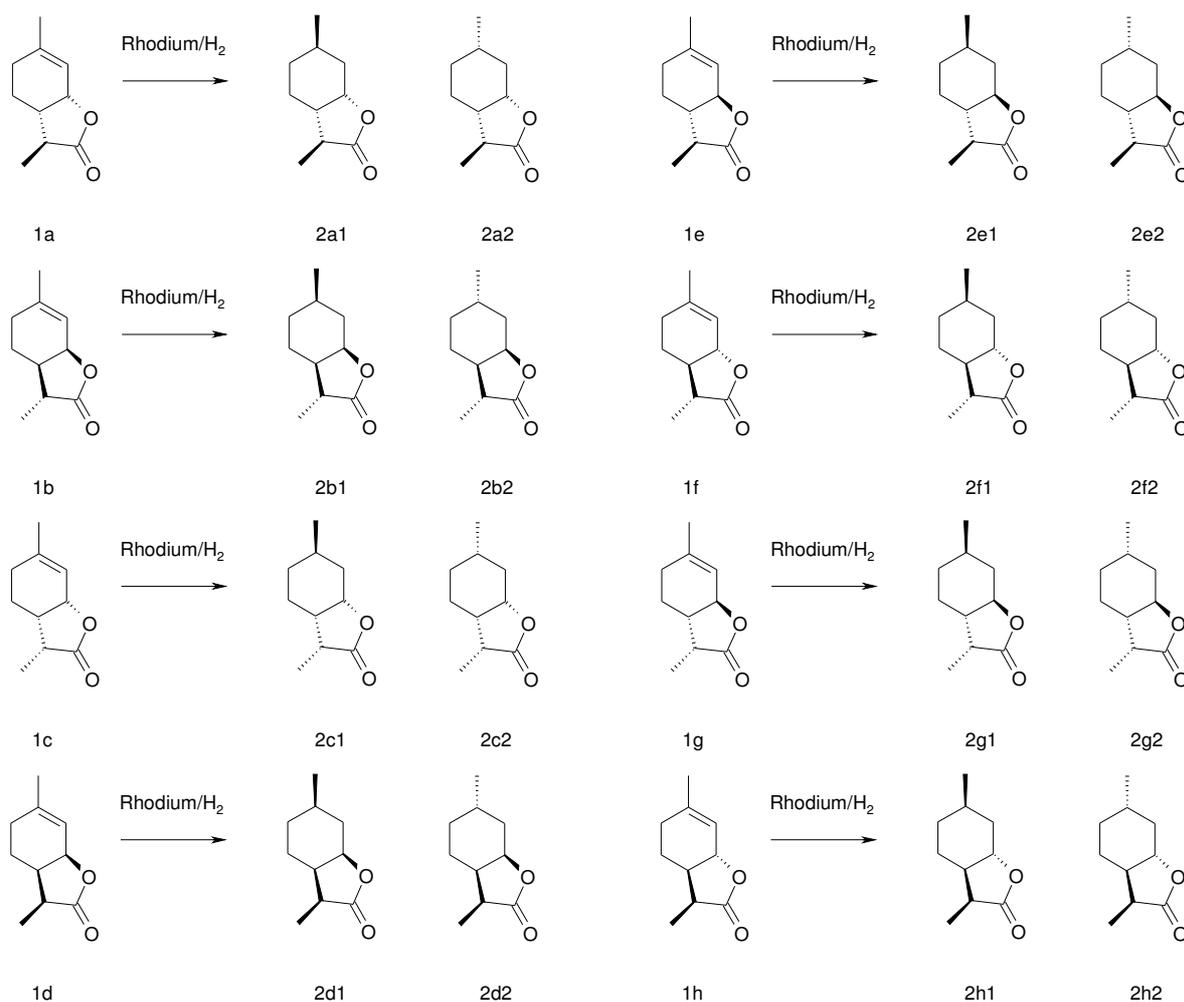


Abbildung 3.6: Selektive Hydrierung von 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon 1a-h zu Dimethylhexahydrobenzofuranon (2a₁₋₂-2h₁₋₂)

3.1.3 Synthese weiterer Modellverbindungen

a) Dehydromintlacton

Mintlacton 4a ist kommerziell in 90%iger Reinheit erhältlich. Die verbleibenden 10% entfallen auf das Enantiomer des Mintlactons 4b, im folgenden e-Mintlacton genannt sowie isomintalacton 5. Die drei Verbindungen können erfolgreich an der chiralen Phase BGB 174 getrennt und so ihre Geruchsschwellenwerte bestimmt werden. Dehydromintlacton (**6**) wurde entsprechend dem in **Abbildung 3.7** dargestellten Syntheschema selbst synthetisiert.

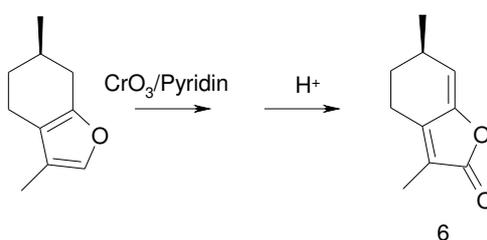


Abbildung 3.7: Synthese von Dehydromintlacton 5

b) Synthese der bicyclischen Lactone 7 und 8:

Die Synthesesequenz für die bicyclischen Lactone 7 und 8 ist in **Abbildung 3.8** dargestellt. Ausgehend von einem chiralen Acrylsäuremethylester wurde eine stereospezifisch induzierte Diels-Alder-Reaktion durchgeführt. Bei der Reaktion wurde das Diastereomer 1 zu 70% und das Diastereomere 2 zu 30% gebildet. Dies stimmt gut mit der theoretisch zu erwartenden Diastereomerenzusammensetzung von 65:35 überein, die sich aus den mittels Hyperchem 5.0 berechneten Energieberechnungen ergibt. Die eindeutige Bestimmung der absoluten Stereochemie des 6-Methyltetrahydrobenzofuranons (Lacton 7) erfolgte durch Überführung in das Weinlacton 1a, dessen absolute Konfiguration bekannt ist [Guth, 1996].

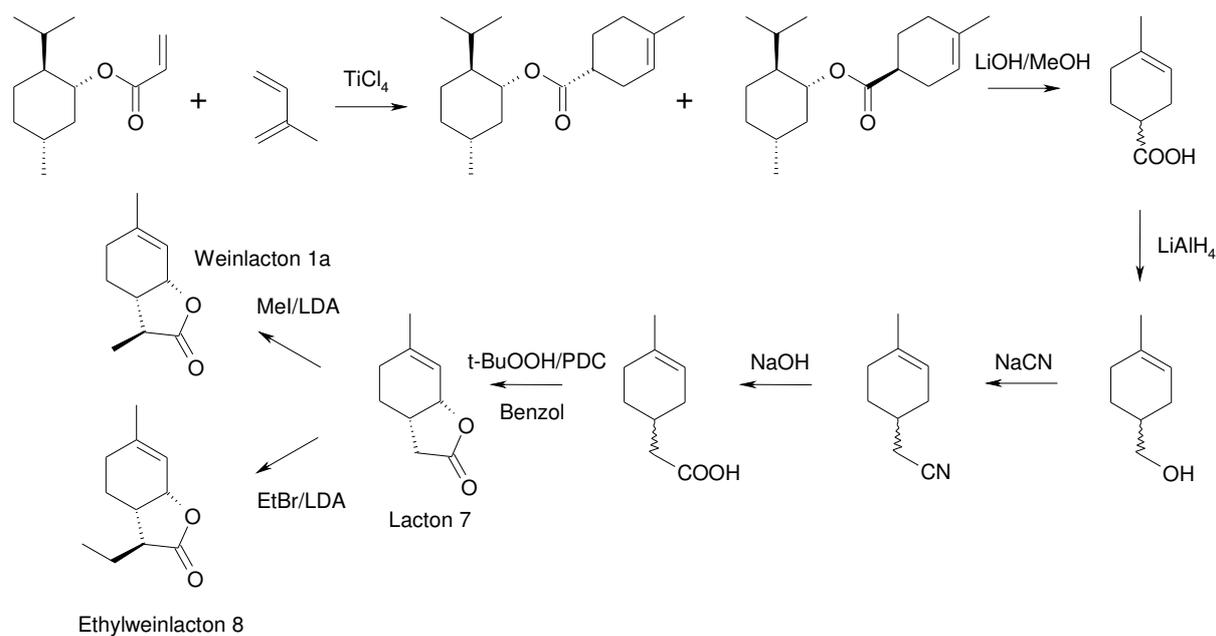


Abbildung 3.8: Synthese der bicyclischen Lactone 7 und 8.

c) Bicyclen 3a-d

In **Abbildung 3.9** ist die Synthese der vier 4,8 Dimethyl-oxabicyclo [3.3.1] non-7-en-3-one (3a-3d) ausgehend von Carvylacetat beschrieben. Auch entstehen diese bicyclischen Lactone als Nebenprodukte bei der Synthese der bicyclischen Lactone 1 e, 1 g, 1 f und 1 h und können säulenchromatographisch von diesen getrennt werden. Die relative Konfiguration der Methylgruppe (C-4) wurde mittels NMR-Methoden bestimmt.

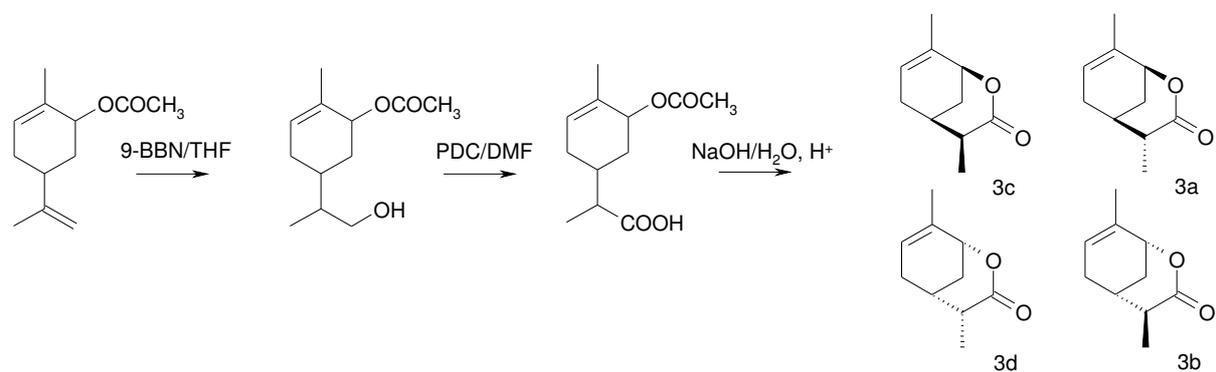


Abbildung 3.9: Synthese der bicyclischen Lactone 3a-3d

3.1.2. Konformationsanalyse

Die synthetisierten Verbindungen wurden mittels Massenspektrometrie (MS) und ein- bzw. zweidimensionaler NMR-Methoden identifiziert. Zur Klärung von konformativen Aspekten wurden die bicyclischen Lactone **1a**, **2a1** und **2a2** in unterschiedlichen Lösungsmitteln (C_6D_6 , D_2O , $CDCl_3$) mittels NMR untersucht. Die Bestimmung der Konformation erfolgte durch Ermittlung der Kopplungskonstanten (3J , Hz) der Protonen H-3 und H-3a im Lacton. Die ermittelten Kopplungskonstanten $^3J_{3,3a}$ stehen in direktem Zusammenhang mit den Diederwinkeln und somit mit den Konformationen der Lactone. Mit Ausnahme von (3aS, 3S, 7aR) 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (**1a**) lagen die untersuchten Lactone **2a1**, **2a2**, **2e1**, **2e2**, **1c** und **1e** in einer bevorzugten Konformation vor (**Abbildung 3.10** und **Tabelle 3.1**) So wurden zum Beispiel für die Verbindungen **2a1** und **2a2** in den untersuchten Lösungsmitteln für das Proton H-3a eine quasi axiale Ausrichtung im Lacton **2a1** und eine quasi-äquatoriale Stellung im Lacton **2a2** ermittelt (**Tabelle 3.1** und **Abbildung 3.11**). Die bevorzugten Konformationen der Lactone **2a1** und **2a2** sind in **Abbildung 3.11** dargestellt.

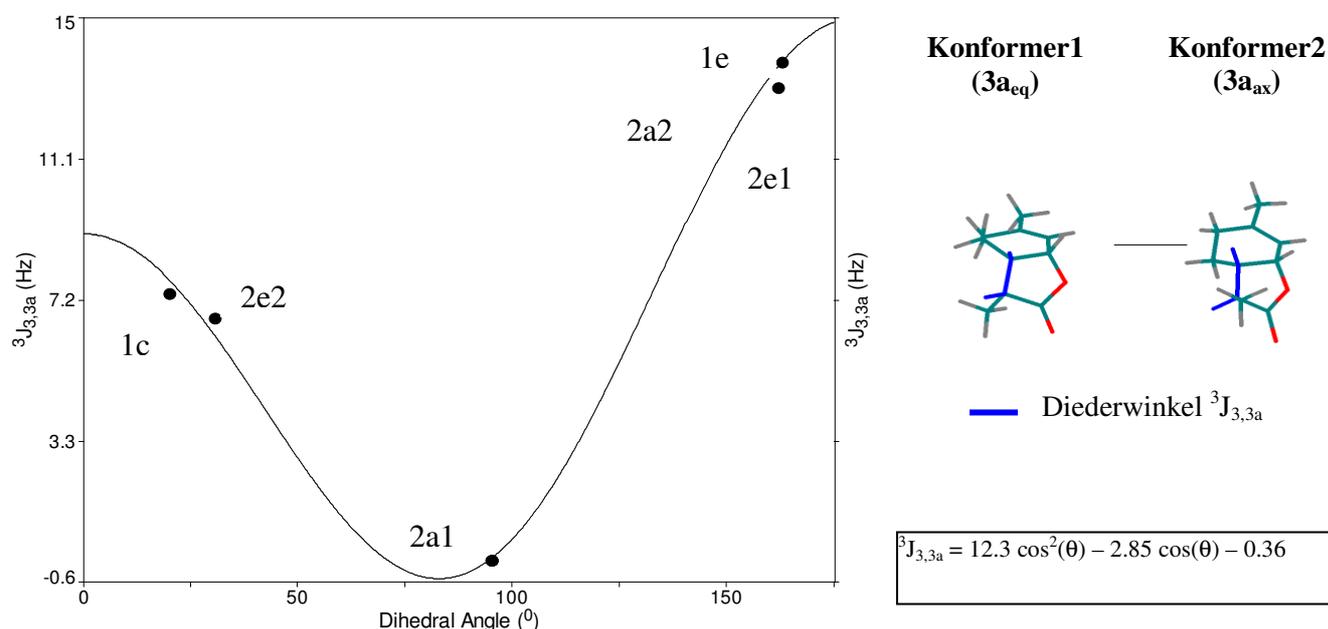


Abbildung 3.10: Abhängigkeit der Kopplungskonstante $^3J_{3,3a}$ (Hz) bei bicyclischen Lactonen (C_6D_6 : **1e** 13.1 Hz, **1c** 7.6 Hz, **2a1** 0 Hz 95° , **2a2** 12.9 Hz, **2e2** 6.7 Hz) vom Diederwinkel (**1e** 162° , **1c** 20° , **2a1** 95° , **2a2** 163° , **2e2** 31°). Der Diederwinkel wurde aus der in HYPERCHEM (MM+) bzw. Gaussian 98 (Basissatz: 6-31G*) optimierten Struktur ermittelt.

| Verbindung | 1a (Konf. 1) | 1a (Konf. 2) | 2a1 (Konf. 2) | 2a2 (Konf. 1) |
|--|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Diederwinkel ($^{\circ}$) ^{a)} | 164 (3a _{eq}) | 123 (3a _{ax}) | 95 (3a _{ax}) | 159 (3a _{eq}) |
| $^3J_{3,3a}$ (Hz) ^{b)} | 13.7 | 4.9 | - | - |
| Exp. $^3J_{3,3a}$ (Hz) C ₆ D ₆ | 9.2 | | <1 | 12.9 |
| Exp. $^3J_{3,3a}$ (Hz) CDCl ₃ | 8.9 | | - | - |
| Exp. $^3J_{3,3a}$ (Hz) D ₂ O | 7.2 | | 1.5 | 13.3 |
| Exp. Konformer (%) C ₆ D ₆ ^{c)} | ~48 | ~52 | ~100 | ~100 |
| Exp. Konformer (%) CDCl ₃ ^{c)} | ~45 | ~55 | - | - |
| Exp. Konformer (%) D ₂ O ^{c)} | ~26 | ~74 | ~100 | ~100 |
| Kalk. Konformer (%) H ₂ O Meth.: MOPAC97 (Tomasimodell, MNDO) | 61 | 39 | - | - |
| Kalk. Konformer (%) H ₂ O Meth.: Gaus98 (CPCM, Tomasimodell, 6-31G*) | 33 | 67 | - | - |
| Kalk. Konformer (%) H ₂ O Meth.: Gaus98 (SCRf, Onsager Dipolmodell, Freq, 6-31G**) | 67 | 34 | - | - |
| Kalk. Konformer (%) C ₆ H ₁₂ Meth.: MOPAC97 (Tomasimodell, MNDO) ^{d)} | 53 | 47 | - | - |
| Kalk. Konformer (%) C ₆ H ₁₂ Meth.: Gaus98 (CPCM, Tomasimodell, 6-31G*) | 45 | 55 | - | - |
| Kalk. Konformer (%) C ₆ H ₁₂ Meth.: Gaus98 (SCRf, Onsager Dipolmodell, Freq, 6-31G**) | 75 | 25 | - | - |

- a) Der Diederwinkel wurde aus der in HYPERCHEM (MM+) bzw. Gaussian 98 (Basissatz: 6-31G*) optimierten Struktur ermittelt.
- b) Die Kopplungskonstanten der Konformere wurde in Anlehnung an die Karplus-Beziehung für bicyclische Lactone entwickelt. Die Kopplungskonstante $^3J_{3,3a}$ (Hz) wurde nach folgender Gleichung ermittelt: $^3J_{3,3a} = 12.3 \cos^2(\theta) - 2.85 \cos(\theta) - 0.36$ (θ = Diederwinkel), bzw. aus dem Graphen in **Abb. 6** entnommen.
- c) Die Anteile der Konformere in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität wurden aus den experimentell ermittelten $^3J_{3,3a}$ (Hz) Kopplungskonstanten und den Kopplungskonstanten der einzelnen Konformere errechnet.
- d) Parameter (cf. Tab.) für das Lösungsmittel Cyclohexan wurden in dieser Arbeit entwickelt.

Tabelle 3.1: Konformationsanalyse der Lactone **1a**, **2a1** und **2a2** mittels $^1\text{H-NMR}$ und Molecular Modelling Methoden.

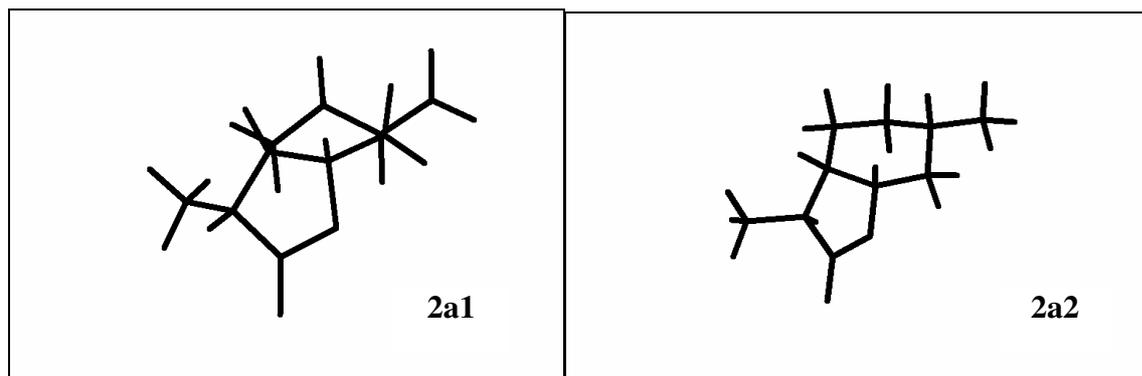


Abbildung 3.11: Bevorzugte Konformationen der Lactone **2a1** und **2a2**

Die Abhängigkeit der Kopplungskonstanten ${}^3J_{3,3a}$ (Hz) von Diederwinkel wurde für die untersuchte Verbindungsklasse gemäß Abbildung 10 entwickelt und zur Bestimmung der Gleichgewichtsverteilung der beiden Konformere 1 und 2 des Weinlactons 1a eingesetzt

Für das Weinlacton 1a bzw. der dazu enantiomeren Verbindung 1b wurden die in der **Tabelle 3.1** für die unterschiedlichen Lösungsmittel gefundenen prozentualen Zusammensetzungen der Konformere 1 und 2 (**Abbildung 3.10**) aufgeführt. Die Gleichgewichtszusammensetzung der Konformere 1 und 2 des Weinlactons 1a ist hier abhängig von der Polarität des Lösungsmittels. In einem polaren Lösungsmittel wie z.B. Wasser wurde ein Konformer 1/Konformer 2-Verhältnis von 26/74 festgestellt (**Tabelle 3.1**). Dagegen liegt in einem unpolaren Lösungsmitteln wie z.B. Benzol ein Konformer 1/Konformer 2-Verhältnis von ca. 48/52 vor. Für die weiteren Untersuchungen zu den Struktur-Geruchsbeziehungen von Lactonen wurden beide Konformere des Weinlactons berücksichtigt.

Zur Vorhersage von Konformationen von Lactonen in unterschiedlichen Lösungsmitteln wurden Molecular Modelling Methoden eingesetzt. Als Softwarepakete kamen hier **Gaussian98** und **MOPAC97** bzw. die darin eingebunden Lösungsmittelmodelle zum Einsatz. Zur Erzeugung der unterschiedlichen Konformationen der Verbindungen mittels Molecular Dynamic- und Monte-Carlo- Simulationen wurde **HYPERCHEM5.0** (Kraftfeld MM+) verwendet.

In **Tabelle 3.1** sind die mittels Molecular Modelling ermittelten Gleichgewichtszusammensetzungen der Lacton-Konformere in den untersuchten Lösungsmitteln denen der

experimentellen Daten gegenübergestellt. Die Bestimmung erfolgte mittels **MOPAC97** und für das Lösungsmittel Cyclohexan wurden die dazu nötigen Parameter in der vorliegenden Arbeit entwickelt. Ein Vergleich der experimentellen Daten mit denen der über Molecular Modelling bestimmten Daten zeigt (**Tabelle 3.1**), dass die eingesetzte *ab initio* (Basissatz 6-31G*) Methode **CPCM** in der Lage ist, die bevorzugten Konformationen von bicyclischen Lactonen in den untersuchten Lösungsmitteln sehr genau vorherzusagen. Die semi-empirische **MNDO** Methode dagegen ergab nur für das unpolare Lösungsmittel eine den experimentellen Daten ähnliche Vorhersage des Konformer-Verhältnisses.

3.2 Charakterisierung der geruchlichen Eigenschaften

3.2.1. Bestimmung der Geruchschwellenwerte mittels chiraler GC/Olfaktometrie

Die Charakterisierung der geruchlichen Eigenschaften der Lactone erfolgte durch Bestimmung ihrer Geruchschwellenwerte mittels chiraler GC / Olfaktometrie an 2,3-Diacetyl-6-tert-butyltrimethylsilyl- β -cyclodextrin (BGB 174, BGB Analytik AG, Schweiz) bzw. Octakis-(2,6-di-O-pentyl-3-O-butyryl)- γ -cyclodextrin (Lipodex E, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Durch den Einsatz von chiralen stationären Phasen kann die Vortäuschung zu niedriger Schwellenwerte durch Verunreinigung mit einem geruchsintensiveren Stereoisomer ausgeschlossen werden.

Unter dem Geruchschwellenwert versteht man die niedrigste Konzentration in ng/l Luft, bei der der entsprechende Aromastoff noch wahrgenommen wird. Zunächst erfolgt eine Eingrenzung des jeweiligen Geruchschwellenwertes durch sukzessive Verdünnung der Messlösungen um den Faktor 1:10. Anschließend erfolgt die genaue Bestimmung des Geruchschwellenwerts in Verdünnungsschritten von 1:2. Die Geruchschwellenwerte wurden durch ein Panel von 5 Personen bestimmt und über trans-2-Decenal als Referenzsubstanz normiert [Ullrich, 1987].

3.2.2. Ergebnisse und Diskussion zur Bestimmung der Geruchschwellenwerte

3.2.2.1. Bicyclische Lactone

Die betrachteten bicyclischen Lactone weisen bis auf wenige Ausnahmen die gleiche süße, kokosnussartigen Geruchsqualität auf. Ausnahmen bilden die vier geruchlosen Stereoisomere von 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7-en-3-on (**3a-d**) sowie 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3-ethyl-6-methyl-2(3H)-benzofuranon (Ethylweinlacton, **8**). Letzteres hat mit 50 ng/l Luft einen um sieben Zehnerpotenzen höheren Geruchschwellenwert als sein methylsubstituiertes Analog (Weinlacton, **1a**) bei gleichzeitiger Verschiebung der Geruchsqualität zu terpenartig. Die niedrigsten Geruchschwellenwerte wurden gefunden für (3S, 3aS, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (**1a**, 10^{-5} ng/l Luft) und seine gesättigten Derivate (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (**2a1**, $1 \cdot 10^{-6}$ ng/l

Luft) und (3S, 3aS, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (**2a2**, $7 \cdot 10^{-6}$ ng/l Luft). Dies sind mit Ausnahme von p-Methen-8-thiol ($2 \cdot 10^{-8}$ mg/l Wasser) die niedrigsten in der Literatur beschriebenen Geruchsschwellenwerte [Belitz, 1992; Quadbeck-Seger, 1999]. **Tabelle 3.2** zeigt eine Auflistung der mittleren Geruchsschwellenwerte für die bicyclischen Lactone.

3.2.2.2. Monocyclische Lactone

Die monocyclischen Lactone wiesen entweder kokosnussartigen oder pfirsichartigen Geruch auf. In der homologen Reihe der γ -Lactone besitzen die Lactone mit sechs bis zehn Kohlenstoffatomen einen kokosnussartigen Geruch, während beide Enantiomere des γ -Undeca- und γ -Dodecalactons einen pfirsichartigen Geruch aufweisen.

In der homologen Reihe der δ -Lactone besitzen die Lactone mit sechs bis neun Kohlenstoffatomen, sowie R- δ -Decalacton einen kokosnussartigen Geruch, während die Geruchsqualität für S- δ -Decalacton bereits nach pfirsichartig verschoben ist. Beide Enantiomere des δ -Undeca- und δ -Dodecalactons haben einen pfirsichartigen Geruch. Für die monocyclischen Lactone mit kokosnussartigem Geruch wurden keine Unterschiede in den Geruchsschwellenwerten gefunden. Für die längerkettigen monocyclischen Lactone mit pfirsichartigem Geruch weisen die jeweiligen Enantiomerenpaare unterschiedliche Geruchsschwellenwerte auf.

Die niedrigsten Geruchsschwellenwerte unter den monocyclischen Lactonen wurden gefunden für R- δ -Decalactone (kokosnussartig, 0,6 ng/l Luft) sowie S- δ -Undecalactone (pfirsichartig, 0,4 ng/l Luft) und R- γ -Dodecalacton (pfirsichartig, 0,8 ng/l Luft). Auffällig ist, dass die Enantiomere der γ - und δ -Lactone mit 11 und 12 Kohlenstoffatomen unterschiedliche Schwellenwerte besitzen. Beide Enantiomere des δ -Tetradecalacton weisen aber einer gleichzeitigen Verschiebung zu einer fettigen Geruchsqualität den gleichen Schwellenwert von 188 nl/l Luft auf. Die mittleren Geruchsschwellenwerte für die monocyclischen Lactone sind im Folgenden in **Tabelle 3.3** aufgelistet.

| Nr | Verbindung | Geruchschwellenwert [ng/l Luft] | Geruchsqualität |
|----|---|------------------------------------|-----------------|
| 1 | (3S, 3aS, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1a) | $1 \cdot 10^{-5}$ | kokosnussartig |
| 2 | (3R, 3aR, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1b) | > 100 | - |
| 3 | (3R, 3aS, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1c) | 0,25 | kokosnussartig |
| 4 | (3S, 3aR, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1d) | 80 | kokosnussartig |
| 5 | (3S, 3aS, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1e) | $7 \cdot 10^{-3}$ | kokosnussartig |
| 6 | (3R, 3aR, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1f) | 14 | kokosnussartig |
| 7 | (3R, 3aS, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1g) | 8 | kokosnussartig |
| 8 | (3S, 3aR, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1h) | 0,05 | kokosnussartig |
| 9 | (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a1) | $1 \cdot 10^{-6}$ | kokosnussartig |
| 10 | (3S, 3aS, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a2) | $7 \cdot 10^{-6}$ | kokosnussartig |
| 11 | (3R, 3aR, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2b1) | > 100 | - |
| 12 | (3R, 3aR, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2b2) | > 100 | - |
| 13 | (3R, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2c1) | 7,5 | kokosnussartig |
| 14 | (3R, 3aS, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2c2) | $7,5 \cdot 10^{-3}$ | kokosnussartig |
| 15 | (3S, 3aR, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2d1) | 30 | kokosnussartig |
| 16 | (3S, 3aR, 6S, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2d2) | > 100 | - |

Tabelle 3.2: Gaschromatographisch-olfaktometrisch bestimmte Geruchschwellenwerte [ng/l Luft] bicyclischer Lactone

Fortsetzung Tabelle 3.2: Gaschromatographisch-olfaktometrisch bestimmte Geruchschwellenwerte [ng/l Luft] bicyclischer Lactone

| Nr | Verbindung | Geruchschwellenwert [ng/l Luft] | Geruchsqualität |
|----|---|------------------------------------|-----------------|
| 17 | (3S, 3aS, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2e1) | 0,15 | kokosnussartig |
| 18 | (3S, 3aS, 6S, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2e2) | 0,5 | kokosnussartig |
| 19 | (3R, 3aR, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2f1) | 0,4 | kokosnussartig |
| 20 | (3R, 3aR, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2f2) | $3 \cdot 10^{-3}$ | kokosnussartig |
| 21 | (3R, 3aS, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2g1) | > 100 | kokosnussartig |
| 22 | (3R, 3aS, 6S, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2g2) | > 100 | - |
| 23 | (3S, 3aR, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2h1) | > 100 | - |
| 24 | (3S, 3aR, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2h2) | > 100 | - |
| 25 | 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7-en-3-on (3a-d) | > 100 | - |
| 26 | Mintlacton (4a) | 4,5 | kokosnussartig |
| 27 | E-Mintlacton (4b) | 6,0 | kokosnussartig |
| 28 | Iso-mintlacton (5) | 4,5 | kokosnussartig |
| 29 | Dehydromintlacton (6) | 1,0 | kokosnussartig |
| 30 | 3a,4,5,7a-Tetrahydro-6-methyl-2(3H)-benzofuranon (7) | 0,25 | kokosnussartig |
| 31 | 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3-ethyl-6-methyl-2(3H)-benzofuranon (Ethylweinlacton) | 50 | terpenartig |

Tabelle 3.2: Gaschromatographisch-olfaktometrisch bestimmte Geruchschwellenwerte [ng/l Luft] bicyclischer Lactone

| Nr | Verbindung | Geruchschwellenwert [ng/l Luft] | | Geruchsqualität |
|----|--|------------------------------------|----------|---------------------------|
| | | R | S | |
| 32 | (R/S)- γ -Hexalacton (RG6, SG6) | R: 375 | S: 375 | kokosnussartig |
| 33 | (R/S)- γ -Heptalacton (RG7, SG7) | R: 5,0 | S: 5,0 | kokosnussartig |
| 34 | (R/S)- γ -Octalacton (RG8, SG8) | R: 1,8 | S: 1,8 | kokosnussartig |
| 35 | (R/S)- γ -Nonalacton (RG9, SG9) | R: 4,5 | S: 4,5 | kokosnussartig |
| 36 | (R/S)- γ -Decalacton (RG10, SG10) | R: 12,5 | S: 12,5 | pfirsichartig |
| 37 | (R/S)- γ -Undecalacton (RG11, SG11) | R: 0,8 | S: 4,5 | pfirsichartig |
| 38 | (R/S)- γ -Dodecalacton (RG12, SG12) | R: 0,8 | S: 6,0 | pfirsichartig |
| 39 | (R/S)- δ -Hexalacton (RD6, SD6) | R: > 100 | S: > 100 | - |
| 40 | (R/S)- δ -Heptalacton (RD7, SD7) | keine Trennung | | kokosnussartig |
| 41 | (R/S)- δ -Octalacton (RD8, SD8) | R: 12,5 | S: 12,5 | kokosnussartig |
| 42 | (R/S)- δ -Nonalacton (RD9, SD9) | R: 1,3 | S: 2,0 | kokosnussartig |
| 43 | (R/S)- δ -Decalacton (RD10, SD10) | R: 0,6 | S: 2,0 | kokosnussartig / pfirsich |
| 44 | (R/S)- δ -Undecalacton (RD11, SD11) | R: 60 | S: 0,8 | pfirsich |
| 45 | (R/S)- δ -Dodecalacton (RD12, SD12) | R: 12 | S: 0,4 | pfirsich |
| 46 | (R/S)- δ -Tetradecalacton (RD14, SD14) | R: 188 | S: 188 | fettig |

Tabelle 3.3: Gaschromatographisch-olfaktometrisch bestimmte Geruchschwellenwerte [ng/l Luft] monocyclischer Lactone

3.2.2.3 Diskussion der gemessenen geruchlichen Eigenschaften

Maga beschreibt in Übereinstimmung mit dieser Arbeit die Geruchsqualitäten von γ -Nonalacton als kokosnussartig und die von γ -Decalacton und γ -Dodecalacton als pfirsichartig. Die Geruchsqualität von γ -Undecalacton wird abweichend als lakritzartig beschrieben. In Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode, auf die hier nicht näher eingegangen wird, ist eine Vortäuschung einer lakritzartigen Note durch geruchsaktivere Verunreinigungen nicht auszuschließen [Maga, 1976]

Neben zahlreichen anderen Deskriptoren beschreibt Mosandl für die monocyclischen γ -Lactone ebenfalls eine mit zunehmender Kohlenstoffzahl schwächer werdende kokosartige Note und eine stärker werdende fruchtige Note. Eine eindeutige Beschränkung der Geruchsqualität auf einen Deskriptor sowie eine klare Abgrenzung zwischen kokosnussartigem und pfirsichartigem Geruch ist nicht beschrieben. Die Bestimmung der Geruchsqualitäten erfolgte an 1%igen Lösungen in Propylenglykol, die auf Riechstreifen aufgebracht wurde. Daher ist eine Vortäuschung anderer Geruchsqualitäten durch Spuren an anderen geruchsaktiven Substanzen nicht zweifelsfrei auszuschließen [Mosandl, 1989].

Die Geruchsqualitäten der δ -Lactone werden bei Maga für δ -Octa bis δ -Decalacton ebenfalls mit kokosnussartig angegeben und stimmen mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein. Eine Unterscheidung der beiden Enantiomere des δ -Decalactons war zum Zeitpunkt der Veröffentlichung noch nicht möglich. Der niedrigere Schwellenwert für R- δ -Decalacton (0,6 ng/l Luft, kokosartig) im Vergleich zum S- δ -Decalacton (2 ng/l Luft, pfirsichartig) führt möglicher Weise zu einem kokosnussartigen Geruchseindruck bei der Beurteilung des Raze-mates. Für δ -Undecalacton finden sich bei Maga sowohl die Deskriptoren pfirsichartig als auch kokosnussartig, möglicherweise auch hier ein Artefakt der Bestimmungsmethode, bei der Verunreinigungen nicht ausgeschlossen werden können [Maga, 1976].

Mosandl findet für die beiden Enantiomere δ -Octalacton unterschiedliche Geruchsintensitäten für den kokosnussartigen Geruchseindruck. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Für δ -Decalacton wird in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit eine höhere Intensität der pfirsichartigen Note für das S-Enantiomer beschrieben. Das R-Enantiomer von δ -Decalacton wird allerdings abweichend von der vorliegenden Arbeit als

fruchtig-süß und milchig beschrieben. Die Enantiomere der δ -Dodecalactone werden in Übereinstimmung mit dieser Arbeit beide als fruchtig, aprikosenartig beschrieben, wobei dem S-Enantiomer die höhere Intensität zugeordnet wird. Abweichungen liegen möglicher Weise in der Verwendung eines proprietären Flavourvokabulars (Dragoco Sensorik Panel) bzw. der Beurteilung 1%iger Lösungen in Propylenglykol an Riechstreifen ohne chromatographische Auftrennung der Stereoisomere sowie Abtrennung sonstiger Verunreinigungen [Mosandl, 1989].

3.2.2.4 Vorläufige Ableitung von Zusammenhängen für Lactone mit pfirsichartiger Geruchsqualität

Aus den vorliegenden Daten lassen sich neben der für den pfirsich bzw. kokosnussartigen Geruch essentiellen Lactonfunktion bereits die folgenden Parameter für ein Interaktionsmodell mit dem Geruchsrezeptor ableiten. Der optimale Abstand des letzten C-Atoms der Alkyl-Seitenkette vom Sauerstoffatom der C=O Funktion beträgt für die beiden Referenzmoleküle R- δ -Dodecalacton und S- γ -Dodecalacton 10,73 Å bzw. 12,34 Å. Für δ -Tetradecalacton mit einer Seitenkettenlänge von 13,24 Å verschiebt sich der Geruch bereits zu einer fettigen Geruchsqualität. Ist die Seitenkettenlänge kürzer als 9 Å, wie zum Beispiel beim γ -Nonalacton mit 8,89 Å und beim δ -Decalacton mit 8,43 Å, verschiebt sich die Geruchsqualität zugunsten eines kokosnussartigen Geruchseindrucks. Die Seitenkettenlänge kann unterschiedliche Geruchsqualitäten und Intensitäten jedoch nicht erklären. Auch der Winkel, in dem die Seitenkette (letztes Kohlenstoffatom) zu der Ebene stehen, die vom Lactonring (O=C-O-) aufgespannt wird, führt nicht zum Ziel. Die Gegenüberstellung dieses Torsionswinkels mit den Geruchsschwellenwerten der vier Dodecalactone (R- δ -Dodecalacton: Torsionswinkel: $-20,2^\circ$; OTV 12 ng/l Luft; S- δ -Dodecalacton: Torsionswinkel: $20,2^\circ$, OTV 0,4 ng/l Luft; R- γ -Dodecalacton: Torsionswinkel: $-55,2^\circ$, OTV 0,8 ng/l Luft; S- γ -Dodecalacton: Torsionswinkel: $55,5^\circ$, OTV 6 ng/l Luft) zeigt, dass ein Zusammenhang für pfirsichartigen Geruch nicht über einfache Distanz- und Winkelparameter abgeleitet werden kann.

Abbildung 3.11b

3.3 Einsatz von Molecular Modelling und statistischen Methoden zur Aufklärung von Struktur-Geruchsbeziehungen in der Verbindungsklasse der Lactone

3.3.1 Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen mono- und bicyclischer Lactone der Geruchsqualität kokosartig.

3.3.1.1 Molecular Modelling

3.3.1.1.1 Generierung dreidimensionaler Molekülmodelle

Der erste Schritt in der Aufklärung von Struktur-Geruchsbeziehungen besteht in der Berechnung dreidimensionaler Molekülmodelle. Diese wurden mittels des Softwarepakets Hyperchem 5.0 sowie der dazugehörigen Erweiterung Chemplus 1.0 berechnet. Eine Kombination von Moleküldynamiksimulation und Konformationsuche nach dem Monte Carlo Prinzip und anschließender MM+ Kraftfeldminimierung nach Allinger liefert mit Ausnahme des Weinlactons jeweils eine energetisch günstigste Molekülkonformation. Eine ausführliche Erläuterung der Berechnungsmethode befindet sich im Experimentellen Teil dieser Arbeit unter **Kapitel 5.6**. **Abbildung 3.12** zeigt als Beispiel zwei Perspektiven für die energetisch günstigste Konformation **1a1** von (3aS, 3S, 7aR) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (Weinlacton), die mittels dieser Berechnungsmethode erhalten und durch NMR Analysen bestätigt wurden (siehe **Kapitel 3.1.2**)

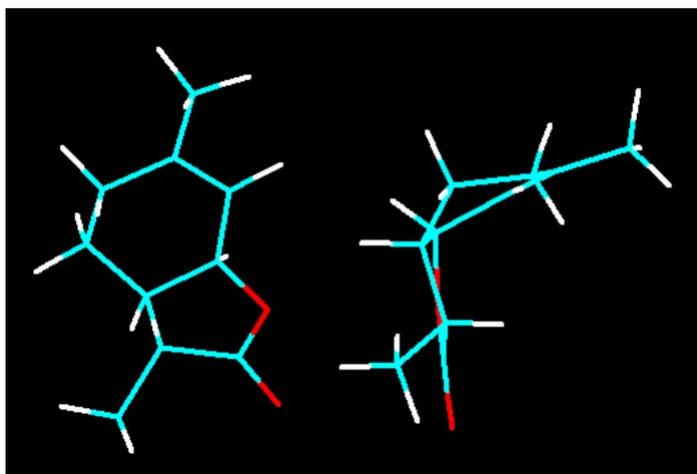


Abbildung 3.12: Energetisch günstigste Konformation **1a1** von (3aS, 3S, 7aR) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (Weinlacton) in zwei Perspektiven.

3.3.1.1.2. Moleküloberflächen

Die obigen Berechnungsmethoden liefern dreidimensionale Strukturmodelle, die als Skelett des Moleküls betrachtet werden können. Die Wechselwirkung mit den Rezeptorproteinen findet jedoch auf der Ebene von schwachen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen statt. Daher hat sich für die Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen die Betrachtung der Moleküloberfläche bewährt. In diesem Fall wurde eine Connolly Oberfläche im zweifachen van-der Waals Radius und einer Dichte von 2 Punkten pro Å berechnet. Außerdem erlaubt die Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP) auf der Moleküloberfläche die Identifizierung nucleophil und elektrophil zugänglicher Bereiche. Die Berechnung der MEP erfolgte nach dem Orozco Luque Modell und der semiempirischen Berechnungsmethode AM1 in WinMopac2.0. Eine ausführliche Beschreibung der Berechnungsmethode befindet sich in **Kapitel 5.6** des Experimentellen Teils. **Abbildung 3.13** zeigt eine graphische Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP) für (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**).

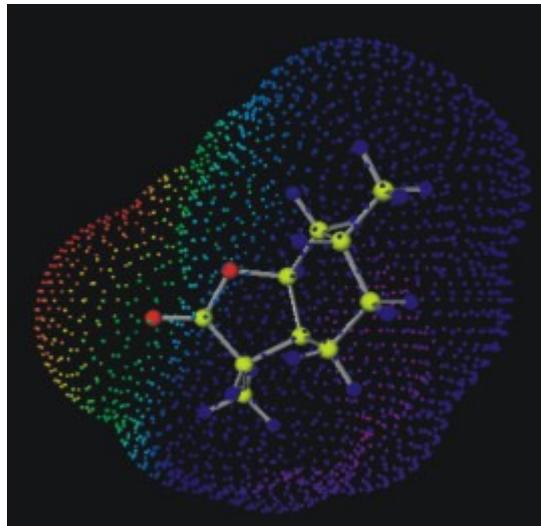


Abbildung 3.13: Molekulares Elektrostatisches Potential auf der Connolly Oberfläche für (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**).

Stark negative Regionen sind mit einer roten Farbkodierung versehen und finden sich bei den beiden Sauerstoffatomen des Lactonrings. Dieser elektrophile Bereich kommt somit als Wasserstoffakzeptor in Frage. Bei einer Wechselwirkung mit dem Geruchsrezeptor kann hier eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rezeptorprotein ausgebildet werden.

Darüber hinaus finden sich für die ungesättigten bicyclischen Lactone leicht negative Regionen im Bereich der Doppelbindungen. Stark positive Bereiche fehlen bei den untersuchten Molekülen. Neutrale Bereiche (blaue Farbkodierung) können einen entropischen Beitrag zur Bindungsenergie durch Freisetzung von Wassermolekülen aus der Bindetasche des Rezeptorproteins leisten.

3.3.1.2. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen:

3.3.1.2.1. Methodenentwicklung mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-hexahydrobenzofuran-2-on und unter Berücksichtigung eines Teildatensatzes.

Zur weiteren Berechnung wird die der dreidimensionalen Moleküloberfläche zugrunde liegende numerische Information, nämlich die Oberflächenpunkte ausgedrückt in Form ihrer x,y,z Koordinaten verwendet. Ein neuronales Netzwerk nach Kohonen wird mit den Daten des Referenzmoleküls, d.h. der Leitstruktur mit „optimalen Eigenschaften“, trainiert. Anschließend werden die Moleküloberflächen der zu vergleichenden Verbindungen auf dasselbe Netzwerk projiziert. Diese Berechnung dient dem Vergleich der Moleküloberflächen. Dabei wird die dreidimensionale Information über die Moleküloberfläche in eine zweidimensionale Information überführt und damit vereinfacht. Eine ausführliche Erläuterung des Prinzips der Vorgehensweise findet sich in Kapitel xy des Experimentellen Teils.

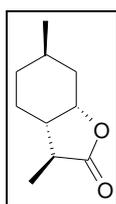
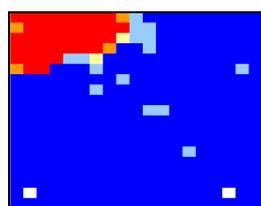
Zunächst wird eine Ähnlichkeitstudie nach dem Single Template Approach (siehe **Kapitel 2.4.1.3**) mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Leitstruktur mit dem niedrigsten Geruchschwellenwert durchgeführt (Vgl. **Tabelle 2.2**). Die anschließende Projektion eines Farbcodes für das molekulare elektrostatische Potential auf das Netzwerk liefert die in **Abbildung 3.14** dargestellten zweidimensionalen Karten (Kohonen Maps). Diese Karten erlauben einen schnellen visuellen Vergleich der Moleküloberflächen, da sie alle Seiten der gesamten Moleküloberfläche in einer Ebene abbildet.

Kohonen Maps mit abgebildetem molekularem elektrostatischen Potential (ESP)

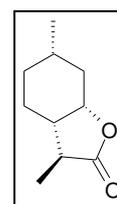
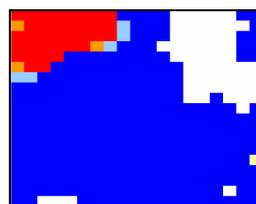
Im Folgenden sind beispielhaft die erhaltenen Kohonen Maps für das Referenzmolekül **2a1** und die Stereoisomere **2a2**, **2b1** und **2b2** abgebildet. Die Kohonen Maps für die weiteren Lactone finden sich im Anhang dieser Arbeit in **Kapitel 7.6.1.1**.

Farbkodierung für das abgebildete ESP

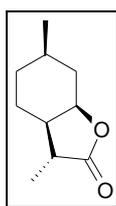
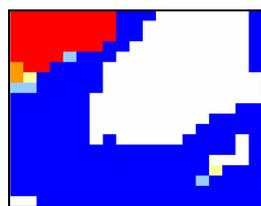
-  (weiß): keine Datenpunkte, daher kein ESP abgebildet
-  (rot): ESP kleiner als -5 kcal / mol
-  (orange): ESP zwischen -5 kcal / mol und -1 kcal / mol
-  (hellgelb): ESP zwischen -1 kcal / mol und +1 kcal / mol
-  (hellblau) ESP zwischen + 1 kcal / mol und + 5 kcal / mol
-  (dunkelblau) ESP größer als + 5 kcal / mol



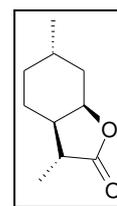
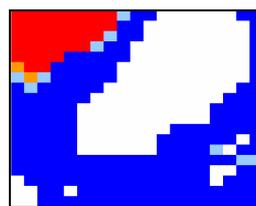
ESP Map Lacton **2a1** (Referenz)



ESP Map Lacton **2a2**



ESP Map Lacton **2b1**



ESP Map Lacton **2b2**

Abbildung 3.14: Ausgewählte Kohonen Feature Maps für einen Single Template Approach mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül. Das mittlere elektrostatische Potential der jedem Neuron zugeordneten Datenpunkte ist entsprechend dem oben definierten Farbcode auf den Netzwerkkarten dargestellt.

Oben links sind die Sauerstoffatome der Lactonfunktion (roter Farbcode) abgebildet. Für die ungesättigten bicyclischen Lactone findet sich im rechten mittleren Bereich ein weiteres rotes Segment, das den schwach negativen Bereich der Doppelbindung darstellt. Der blaue Farbcode stellt die neutralen Bereiche der Lactone dar. Weiße Bereiche stellen unbelegte Bereiche dar, d.h. räumliche Regionen, die vom Referenzmolekül, nicht aber vom Testmolekül ausgefüllt werden.

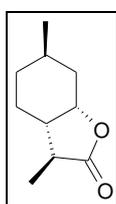
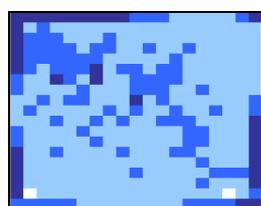
Allen Molekülen des Datensatzes ist die Lactonfunktion gemeinsam, darüber hinaus liegen keine weiteren funktionellen Gruppen vor, so dass die Unterschiede im molekularen elektrostatischen Potential nicht signifikant sind. Die Lactonfunktion ist zur Ausprägung der kokosnussartigen Geruchsqualität ein notwendiges, aber kein hinreichendes Kriterium. Zur Ausprägung eines besonders niedrigen Geruchsschwellenwertes ist daher die Geometrie des Moleküls ausschlaggebend.

Statt des elektrostatischen Potentials wird daher im Folgenden die Belegungsdichte, das heißt die Anzahl der Datenpunkte pro Neuron als Farbcode auf dem neuronalen Netz abgebildet. Dunkelblaue Bereiche stellen Neuronen mit mehr als 10 Datenpunkten dar, mittelblaue Bereiche besitzen 6-10 und hellblaue Bereich 1-5 Datenpunkte. Weiße Bereiche sind unbelegt. **Abbildung 3.15** zeigt beispielhaft die erhaltenen Belegungsdichtemaps für die Lactone **2a1**, **2a2**, **2b1** und **2b2**. Die Belegungsdichtemaps der anderen Lactone finden sich in **Kapitel 7.6.1.2.** im Anhang dieser Arbeit.

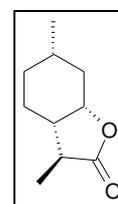
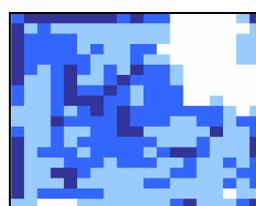
Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte

Farbkodierung für die abgebildete Belegungsdichte

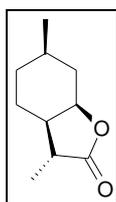
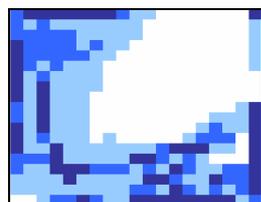
- (weiß): keine Datenpunkte
- (hellblau): 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron
- (mittelblau) 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron
- (dunkelblau) mehr als 10 Datenpunkte pro Neuron



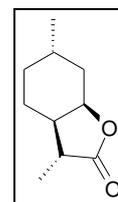
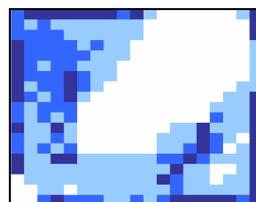
Belegungsdichte Map Lacton **2a1** (Referenz)



Belegungsdichte Map Lacton **2a2**



Belegungsdichte Map Lacton **2b1**



Belegungsdichte Map Lacton **2b2**

Abbildung 3.15: Kohonen Belegungsdichtemaps für einen Single Template Approach mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül. Die Anzahl der Oberflächenpunkte pro Neuron ist entsprechend der oben definierten Farbkodierung auf den Netzwerkkarten abgebildet.

Diese Darstellungsweise hat den Vorteil, dass geometrische Unterschiede im Vergleich zum Referenzmolekül durch einen anderen Farbkode erkennbar sind. Nicht nur weiß markierte, leere Neuronen werden sichtbar, sondern auch Neuronen, die eine höhere Belegungsdichte aufweisen als das Referenzmolekül. Ungenutzte Neuronen stellen räumliche Bereiche dar, die das Referenzmolekül ausfüllt, nicht aber das jeweilige Testmolekül. Umgekehrt weisen höhere Belegungsdichten auf Molekülregionen des Testmoleküls hin, die vom Referenzmolekül

nicht ausgefüllt werden. Die Projektion dieser Bereiche auf den räumlich naheliegendsten Oberflächenbereich des Referenzmoleküls führt zu einer stärkeren Belegung dieser Neuronen.

Differenzspektren

Eine objektivere Möglichkeit zum Vergleich der Moleküle sowie zur Identifizierung der Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz ist die Darstellung von Differenzspektren (**Abbildung 3.16**). Hierbei wird die Neuron Nummer auf der x-Achse aufgetragen gegen die Belegungsdichtedifferenz zwischen Test- und Referenzmolekül. Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz entsprechen einer Region maximaler Differenz auf der Moleküloberfläche. Rückprojektion auf die Moleküloberfläche mittels IRIS Explorer 3.5 erlaubt die Identifizierung dieser Bereiche am dreidimensionalen Molekülmodell (**Abbildung 3.17**).

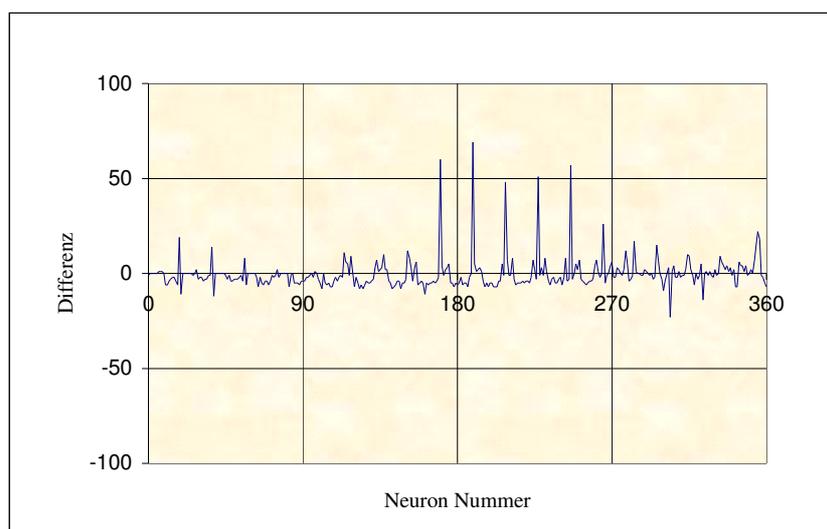


Abbildung 3.16: Differenzspektrum der Neuronenbelegungsdichte für (3aR, 3R, 7aS) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (**1b1**) im Vergleich zum Referenzmolekül (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**).

Bereiche maximaler Abweichung finden sich in den Neuronen 189 (+69), 170 (+60), 246 (+57), 227 (+51) und 208 (+48). Negative Abweichungen finden sich in den Neuronen 304 (-23), 323, (-14), 38 (-12), 19 (-11) und 161 (-11). **Abbildung 6** zeigt als Beispiel die Lage des Neurons 189 auf der Kohonen Map sowie die Rückprojektion der in diesem Neuron enthaltenen Oberflächenpunkte auf der Oberfläche des Referenzmoleküls **2a1**.

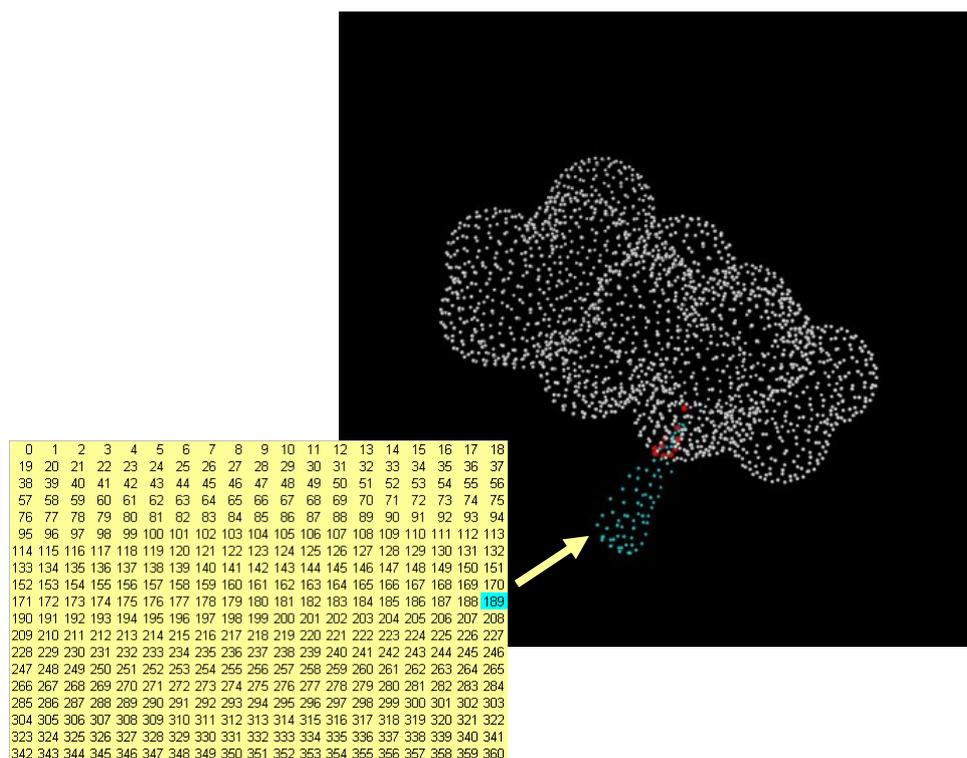


Abbildung 3.17: Rückprojektion der Datenpunkte des Neurons Nr. 189 von (3aR, 3R, 7aS) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon **1b1** (türkise Farbkodierung und 3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on **2a1** (rote Farbkodierung) auf die Oberfläche des Referenzmoleküls **2a1** (weiße Farbkodierung)

Auswahl einer geeigneten Leitstruktur

Der wichtigste Schritt bei der Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ist die Auswahl einer geeigneten Leitstruktur, die optimale Eigenschaften, d. h. im vorliegenden Fall einen möglichst niedrigen Geruchsschwellenwert, besitzt. In den oben vorgestellten Berechnungen wurde (3S, 3aS, **6R**, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als dasjenige bicyclische Lacton mit dem niedrigsten Geruchsschwellenwert von 1×10^{-6} ng/l Luft ausgewählt. Daneben besitzen das Diastereomer (3S, 3aS, **6S**, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a2**) mit 7×10^{-6} ng/l sowie das ungesättigte Analog (3aS, 3S, 7aR) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (Weinlacton, **1a**) mit 1×10^{-5} ng/l Luft ähnlich niedrige Geruchsschwellenwerte. Unter Berücksichtigung von individuellen Unterschieden bei der Wahrnehmung von Geruchsstoffen und der daraus resultierenden Schwankungsbreiten der bestimmten Geruchsschwellenwerte kann man annehmen, dass alle drei Varianten quasi „optimale Eigenschaften“ besitzen. Daher wurde eine Überlagerung dieser drei Moleküle, einschließlich beider Konformere 1a1 und 1a2 des Weinlactons erzeugt und als Leitstruktur für

weitere Berechnungen zugrunde gelegt. Die Moleküle wurden anhand der ihnen gemeinsamen Lactonfunktion überlagert, wie in **Abbildung 3.18** dargestellt.

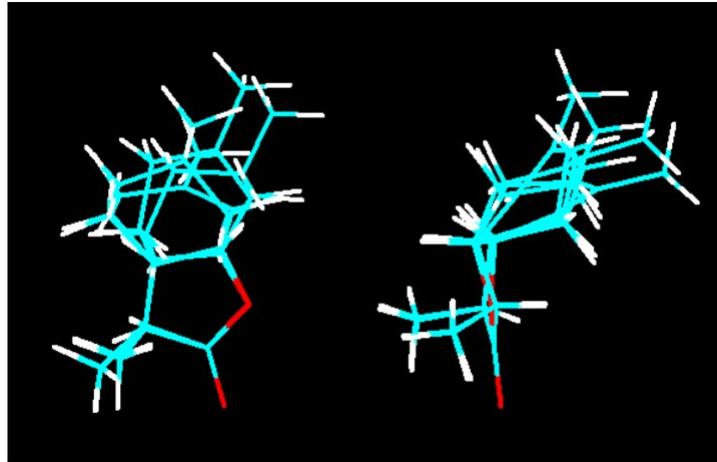


Abbildung 3.18: Überlagerung der bicyclischen Lactone **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a1** als Leitstruktur mit niedrigstem Geruchsschwellenwert.

Kalkulation einer Moleküloberfläche mittels IRIS Explorer 3.5

Die Kalkulation einer gemeinsamen Moleküloberfläche nach Connolly für das überlagerte Molekülmodell (**Abbildung 3.19**), sowie der mit diesem Referenzmolekül zu vergleichenden Strukturen, erfolgt mit dem Softwarepaket IRIS Explorer 3.5. Die genaue Vorgehensweise zur Berechnung findet sich in **Kapitel 5.8** des Experimentellen Teils. Resultat dieser Berechnung ist eine Moleküloberfläche wie in **Abbildung 8** für das Referenzmolekül graphisch dargestellt. Gleichzeitig wird die numerische Information in Form von x, y, z-Koordinaten in einem entsprechende Textfile abgelegt, das nach Import und Bearbeitung in Microsoft Excel 2000 als Input für weitere Berechnungen mit Neural Connection 2.0 verwendet wird.

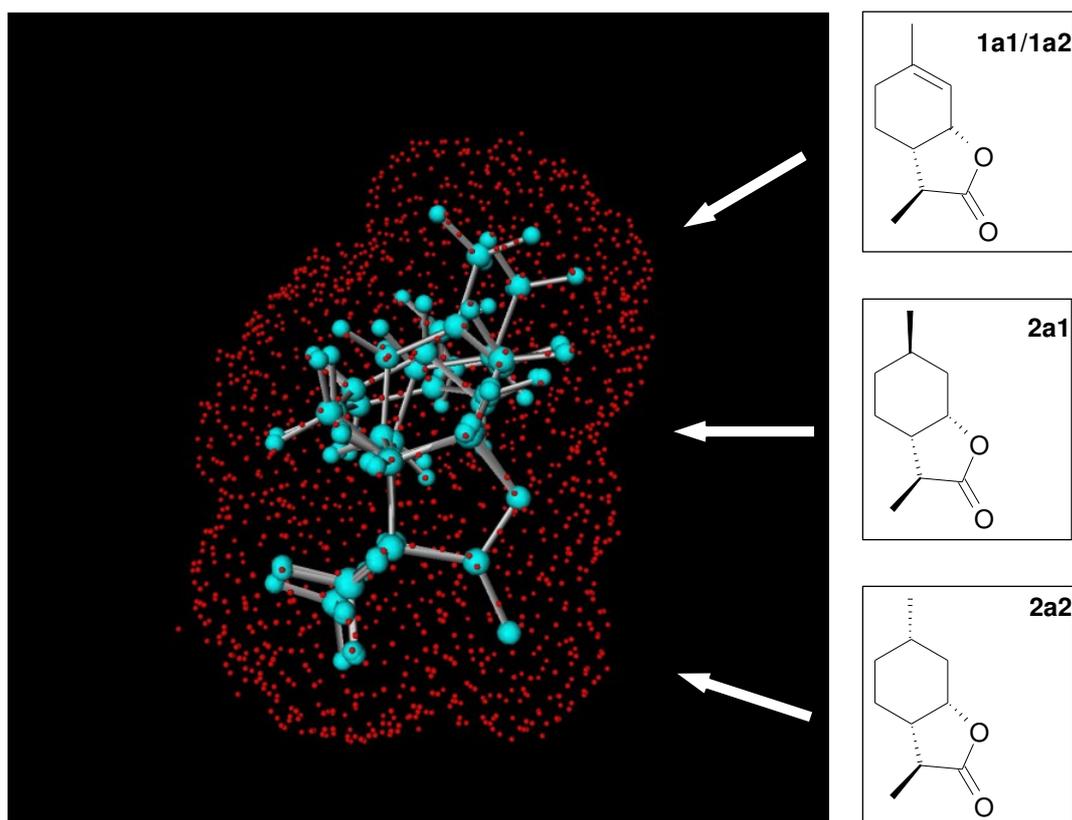
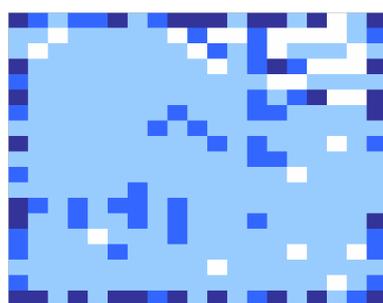


Abbildung 3.19: Graphische Darstellung einer Conolly Oberfläche über der Referenzstruktur aus den vier Bicyclen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**, generiert mittels IRIS Explorer 3.5

3.3.1.2.2. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen mit Leitstruktur aus vier überlagerten bicyclischen Lactonen und unter Berücksichtigung des gesamten Datensatzes.

Die mit IRIS Explorer 3.5 erzeugten Oberflächendaten werden mit einem Neuronalen Netzwerk nach Kohonen verglichen (siehe **Kapitel 5.8** und **5.9** des Experimentellen Teils dieser Arbeit) Es wird ein Single Template Approach mit der in **Abbildung 3.20** abgebildeten Referenzstruktur durchgeführt.

Die folgende Darstellung (**Abbildung 3.20**) zeigt die erhaltenen Kohonen Map für die in **Abbildung 3.19** abgebildete Leitstruktur. Hier zeigt der Farbcode die Belegungsdichte der einzelnen Neuronen an. Hellblau markierte Neuronen enthalten weniger als 5 Oberflächenpunkte, mittelblaue enthalten 5-10 Oberflächenpunkte und dunkelblaue Neuronen sind mit mehr als 10 Datenpunkten belegt. Weiße Bereiche sind unbenutzt.



Farbkodierung für die Belegungsdichte

- (weiß): keine Datenpunkte
- (hellblau): 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron
- (mittelblau) 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron
- (dunkelblau) > 10 Datenpunkte pro Neuron

Abbildung 3.20: Belegungsdichte Map für die chemische Leitstruktur aus den 4 bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**, weiß = 0 Datenpunkte / Neuron, hellblau = 1-5 Datenpunkte / Neuron, mittelblau = 6-10 Datenpunkte pro Neuron, dunkelblau > 10 Datenpunkte / Neuron.

Zur Überprüfung der Berechnungen in Neural Connection 2.0 sowie zur Klärung welche molekularen Bereiche wo auf der Netzwerkkarte abgebildet sind, werden die in den jeweiligen Neuronen enthaltenen Oberflächendaten auf die Moleküloberfläche zurückprojiziert. Dazu wird die Kohonen Map wie in Abbildung 10 dargestellt in 4 Teilbereiche eingeteilt. Die in diesen Teilbereichen enthaltenen Oberflächenpunkte werden dann mittels IRIS Explorer 3.5 separat auf die Moleküloberfläche abgebildet (**Abbildungen 3.22-3.26**).



Abbildung 3.21: Viertelung der Kohonen Map zur Rückprojektion und Identifizierung der molekularen Bereiche auf der zweidimensionalen Karte

Rückprojektionen

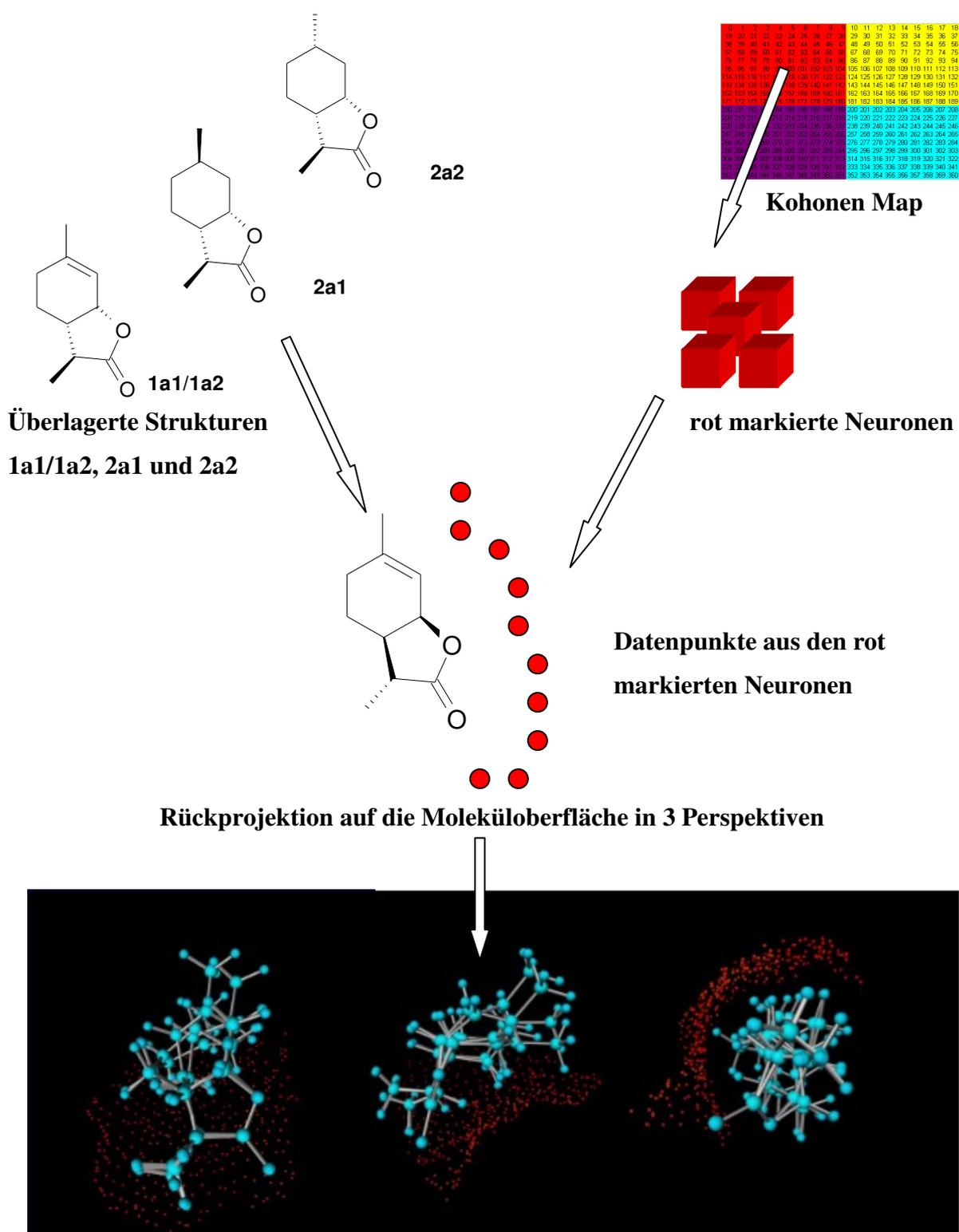


Abbildung 3.22: Rückprojektion der Datenpunkte, die in den Neuronen 0-8, 19-26, 38-47, 57-66, 95-104, 114-123, 133-142, 152-161 und 171-180 (in **Abbildung 3.21** rot markierter Bereich auf der Kohonen Map) enthalten sind, auf die molekulare Oberfläche des Referenzmoleküls. Als Referenz dient eine Überlagerung aus den vier bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**, hier in 3 verschiedenen Perspektiven dargestellt.

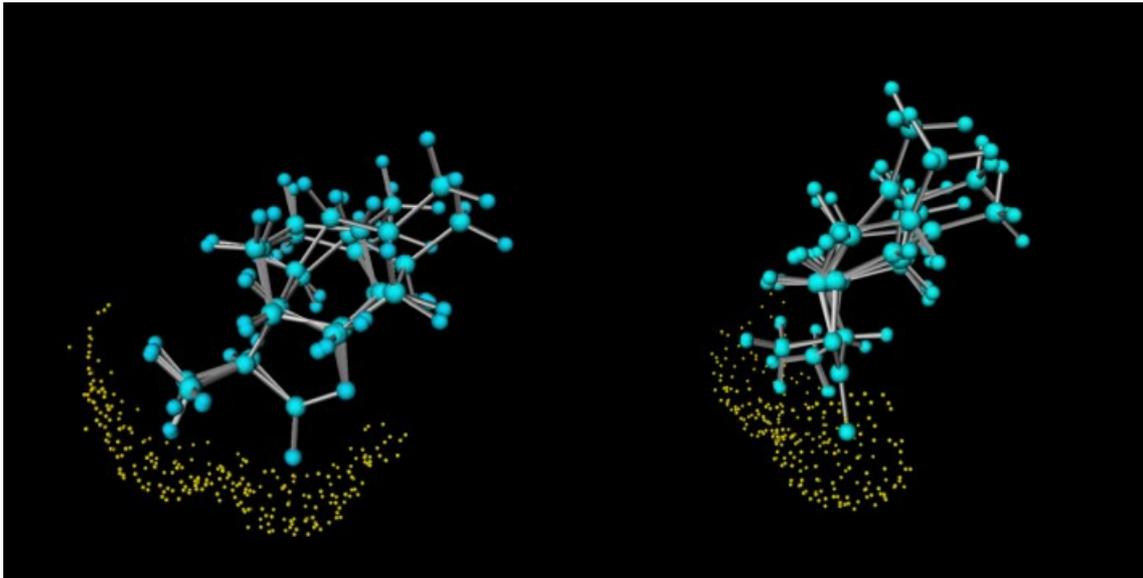


Abbildung 3.23: Rückprojektion der den Neuronen 10-18, 29-37, 48-56, 67-75, 86-94, 105-113, 124-132, 143-151, 162-170, 181-189 (gelbe Farbkodierung in **Abbildung 3.21**) zugeordneten Datenpunkte auf die Oberfläche des Referenzmoleküls. Rückprojektion analog zu **Abbildung 3.22**, abweichend hier gelb markierte Neuronen, 2 Perspektiven.

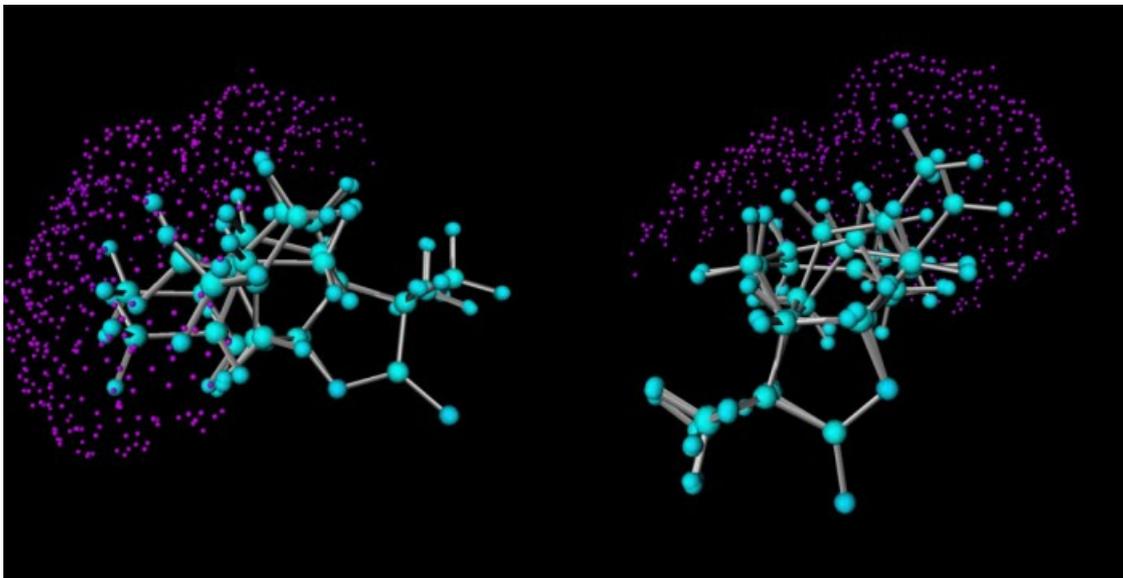


Abbildung 3.24: Rückprojektion der den Neuronen 190-199, 209-218, 228-237, 247-256, 266-275, 285-294, 304-313, 323-332 und 342 bis 351 (violette Farbkodierung in **Abbildung 3.21**) zugeordneten Datenpunkte auf die Oberfläche des Referenzmoleküls. Rückprojektion analog zu **Abbildung 3.22**, abweichend hier violett markierte Neuronen, 2 Perspektiven.

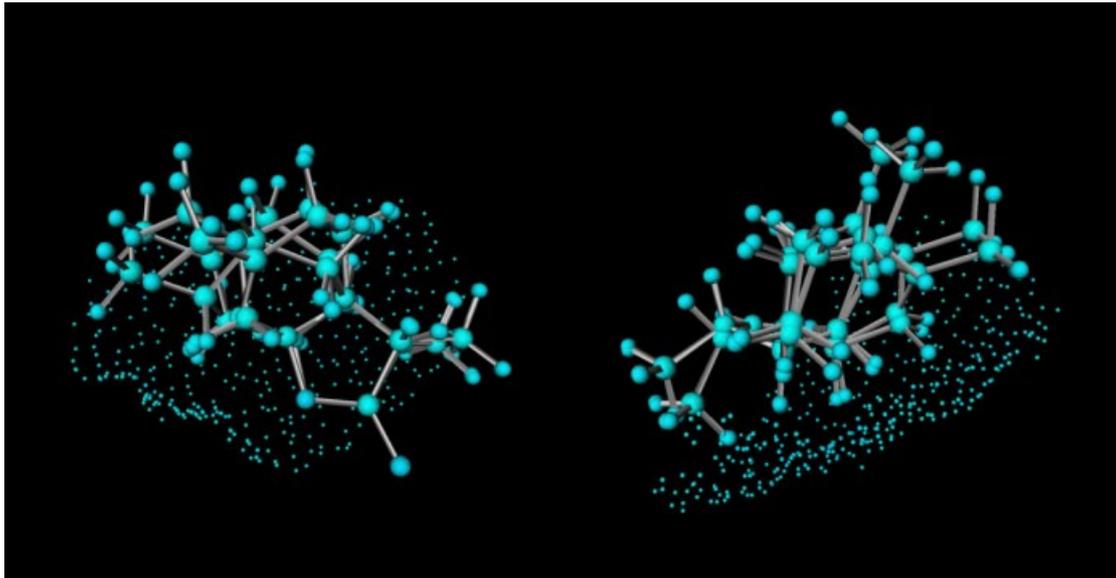


Abbildung 3.25: Rückprojektion der den Neuronen 200-208, 219-227, 238-246, 257-265, 276-284, 295-303, 314-322, 333-341 und 352-360 (türkisfarbene Farbkodierung in **Abbildung 3.21**) zugeordneten Datenpunkte auf die Oberfläche des Referenzmoleküls. Rückprojektion analog zu **Abbildung 3.22**, abweichend hier türkis markierte Neuronen, 2 Perspektiven.

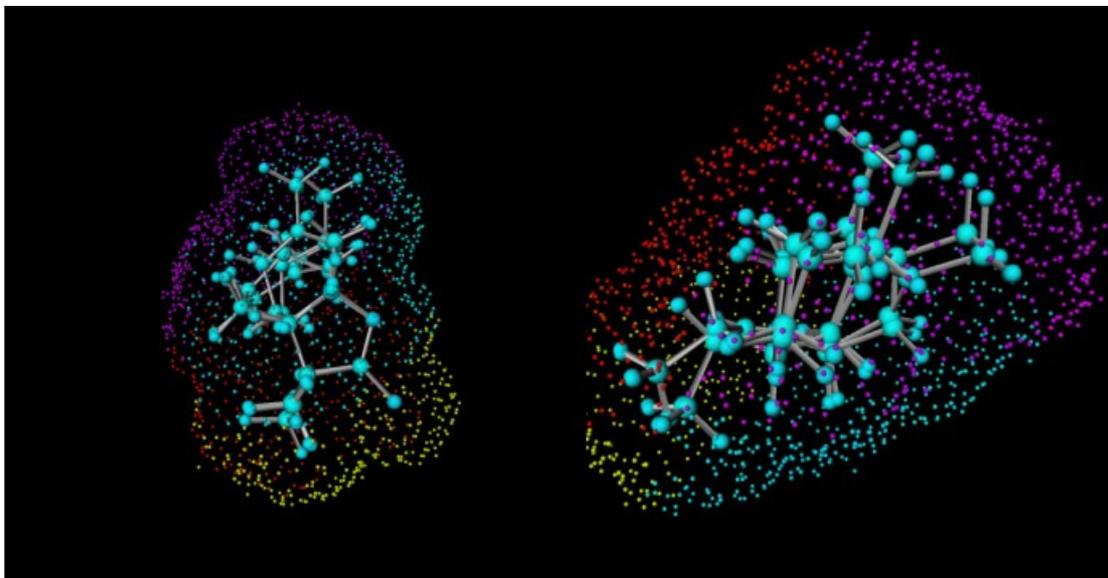


Abbildung 3.26: Rückprojektion der vier Teilbereiche aus Kohonen Map (**Abbildung 3.21**) auf die Oberfläche des Referenzmoleküls. Rückprojektion analog zu **Abbildung 3.22**, abweichend hier aller Neuronen, 2 Perspektiven.

Die vier farblich unterschiedlich kodierten Teilbereiche auf der Kohonen Netzwerkkarte (**Abbildung 3.21**) stellen räumlich zusammenhängende Bereiche auf der Moleküloberfläche dar. Dies bestätigt die erfolgreiche Zuordnung der Oberflächendatenpunkte nach dem Prinzip der Ähnlichkeit: Benachbarte Koordinaten auf der Moleküloberfläche finden sich auch in benachbarten Regionen auf der Kohonen Map.

In dem jeweils rot und gelb kodierten Quadrant auf der Kohonen Map ist die Lactonfunktion der Moleküle abgebildet. Da dieser Bereich allen Molekülen des Datensatzes gemeinsam ist, ist zu erwarten, dass diese molekulare Region und damit die Neuronen, die diese Region auf der Kohonen Netzwerkkarte repräsentieren, keinen signifikanten Einfluss auf den Geruchsschwellenwert zeigen. Die Lactonfunktion ist zwar notwendig für die Geruchsqualität kokosnussartig, aber nicht hinreichend für die Ausprägung eines besonders niedrigen Geruchsschwellenwertes.

Die violett und türkis markierten Bereiche liegen überwiegend um den elektrostatisch neutralen und damit hydrophoben Molekülregionen. Da sich die Moleküle des vorliegenden Datensatzes vor allem in diesem Bereich unterscheiden, ist hier ein signifikanter Einfluss auf die Ausprägung eines besonders niedrigen Geruchsschwellenwertes zu erwarten.

Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsichte

Es folgt eine Zusammenstellung der Belegungsichtekarten für ausgewählte Moleküle des Datensatzes. Eine Übersicht über die Belegungsichtekarten des gesamten Datensatzes befinden sich im Anhang dieser Arbeit unter **Punkt 7.6.2**.

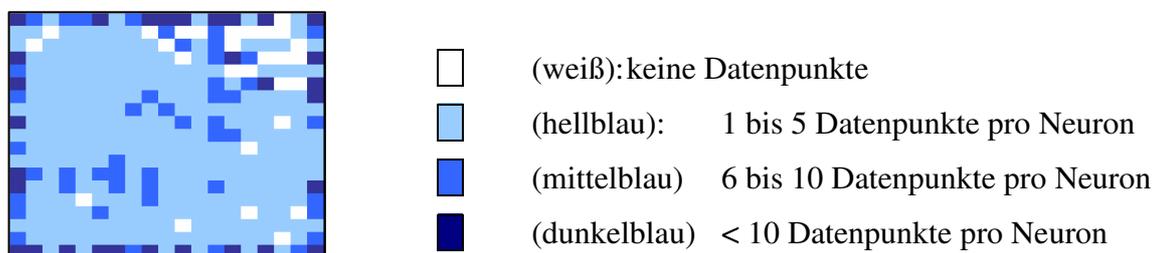


Abbildung 3.27: Belegungsichte Map nach Kohonen für die Leitstruktur aus den 4 bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**.

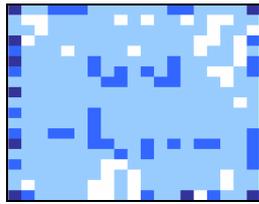
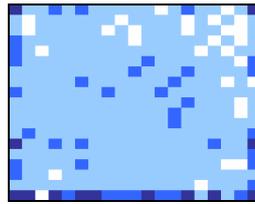
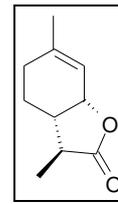
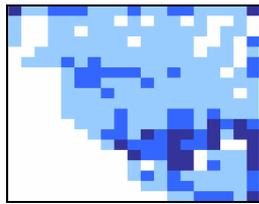
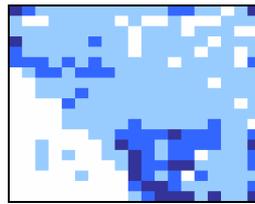
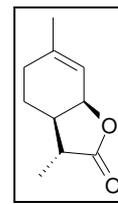
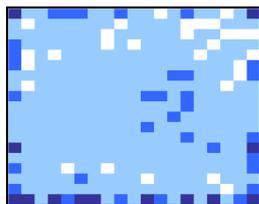
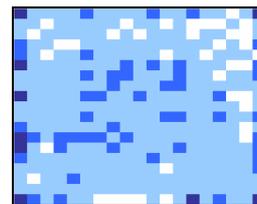
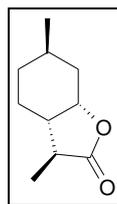
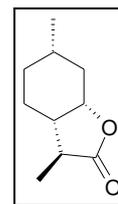
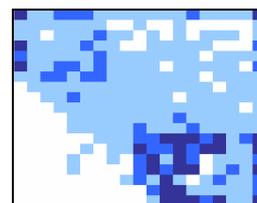
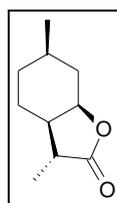
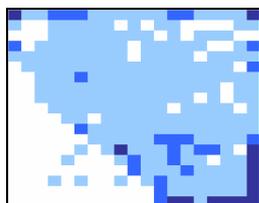
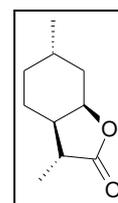
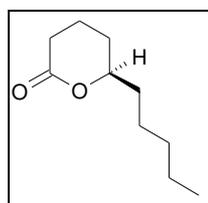
Konformer 1 (**1a1**)Konformer 2 (**1a2**)Belegungs-dichte Maps Lacton **1a**Konformer 1 (**1b1**)Konformer 2 (**1b2**)Belegungs-dichte Maps Lacton **1b**Belegungs-dichte Map Lacton **2a1**Belegungs-dichte Map Lacton **2a2**Belegungs-dichte Map Lacton **2b1**Belegungs-dichte Map Lacton **2b2**Belegungs-dichte Map R- δ -Decalacton (**RD10**)

Abbildung 3.28: Belegungs-dichte Maps nach Kohonen für ausgewählte Lactone des Datensatzes. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 3.27**

Identifikation von Bereichen maximaler Differenz und Rückprojektion auf die molekulare Oberfläche für ausgewählte Lactone.

Unbelegte Bereiche

Zahlreiche Kohonen Maps in der linken unteren Ecke eine unbelegte Region, die näherungsweise dem violetten Bereich in **Abbildung 3.21** entspricht. In **Abbildung 3.24** wurde bereits gezeigt, dass dieser Bereich die molekulare Region des Cyclohexanrings repräsentiert. Testmoleküle, für die dieser Bereich weiß bleibt, besitzen keine funktionelle Gruppe in dieser Region, wie in **Abbildung 3.29** am Beispiel der Stereoisomere **1a1** (türkis) und **1b1** (weiß) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon sowie R- δ -Decalacton (rot) gezeigt. Die Moleküle wurden anhand ihrer Lactonfunktion überlagert, die zwischen den beiden Sechsringen senkrecht aus der Papierebene herausragt. Die Cyclohexenringe der beiden bicyclischen Lactone zeigen in dieser Perspektive in entgegengesetzte Richtungen nach rechts (**1a1**) und links (**1b1**), während die Seitenkette des R- δ -Decalactons senkrecht nach oben zeigt. Die Oberflächenpunkte des Referenzmoleküls sind in violett dargestellt und umgeben den Cyclohexenring von **1a1**. **1b1** und R- δ -Decalacton besitzen keine molekularen Regionen innerhalb dieses Hüllenbereichs, daher bleiben die Neuronen, die diesen Oberflächenbereich repräsentieren leer.

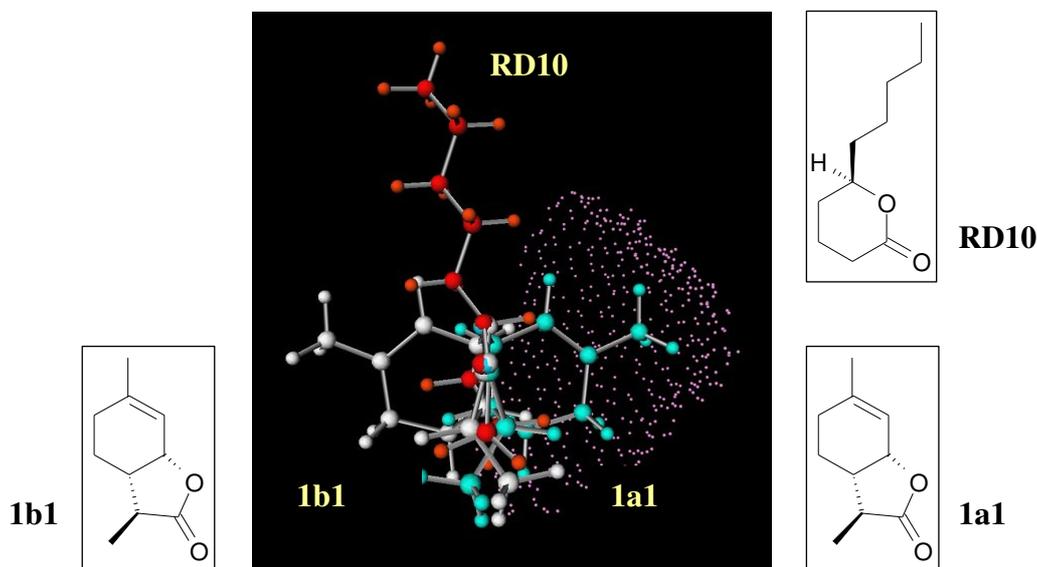


Abbildung 3.29: Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) und **1b1** (weiß) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon sowie R- δ -Decalacton **RD10** (rot) anhand ihrer Lactonfunktion zur Lokalisierung ungenutzter Bereiche auf den Kohonen Maps.

Bereiche höherer Belegungsdichte auf den Kohonen Maps

Abweichungen hin zu höheren Belegungsdichten finden sich überwiegend im mittleren bis rechten unteren Bereich der Kohonen Maps. Dort finden sich für viele Testmoleküle mehr dunkelblau gefärbte Neuronen als beim Referenzmolekül. Molekulare Regionen der Testmoleküle, für die das Referenzmolekül keinen entsprechenden Bereich besitzt, werden also vorzugsweise in diesem Bereich der Kohonen Map abgebildet. Dieser Bereich wird näherungsweise von dem in **Abbildung 3.21** türkisfarbenen Bereich der Kohonen Map repräsentiert. Zur genaueren Identifizierung, um welche molekularen Bereiche es sich handelt, wurde in den folgenden Abbildungen eine Rückprojektion auf die molekularen Oberflächen vorgenommen.

Abbildung 3.30 zeigt eine Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) und **1b1** (weiß) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon ihrer Lactonfunktion, sowie die dazugehörigen Oberflächendaten, die in diesem Quadranten der Kohonen Map abgebildet werden. Der Cyclohexenring des Testmoleküls ragt über den Bereich des Referenzmoleküls hinaus. Auf der Kohonen Map werden diese Oberflächenpunkte (weiß) auf den räumlich nächstliegenden Oberflächenbereich des Referenzmoleküls (türkis) projiziert. Folglich erscheint für diesen Bereich auf der Kohonen Map eine höhere Belegungsdichte für das Testmolekül 1b1 im Vergleich zum Referenzmolekül.

Ebenso ragt die Seitenkette von R- δ -Decalacton, wie in **Abbildung 3.31** gezeigt, über den räumlichen Bereich des Referenzmoleküls hinaus. Die Projektion erfolgt ebenfalls auf die räumlich nächstliegenden Oberflächenbereiche des Referenzmoleküls und resultiert in einer höheren Belegungsdichte der betreffenden Neuronen auf der Kohonen Map.

Stellvertretend für die Leitstruktur aus den vier Bicyclen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2** wurde in den **Abbildungen 3.30** und **3.31** nur **1a1** als eines der Referenzmoleküle abgebildet, um die Übersichtlichkeit zu erleichtern

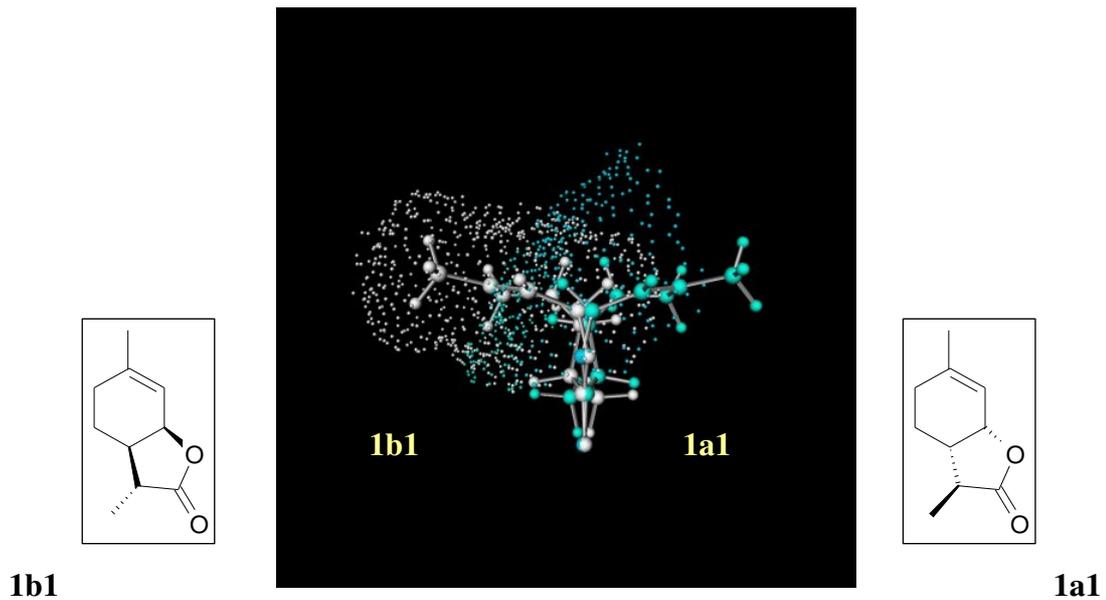


Abbildung 3.30: Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) und **1b1** (weiß) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon ihrer Lactonfunktion und Rückprojektion der in den in **Abbildung 3.21** türkis markierten Neuronen enthaltenen Daten auf die molekulare Oberfläche.

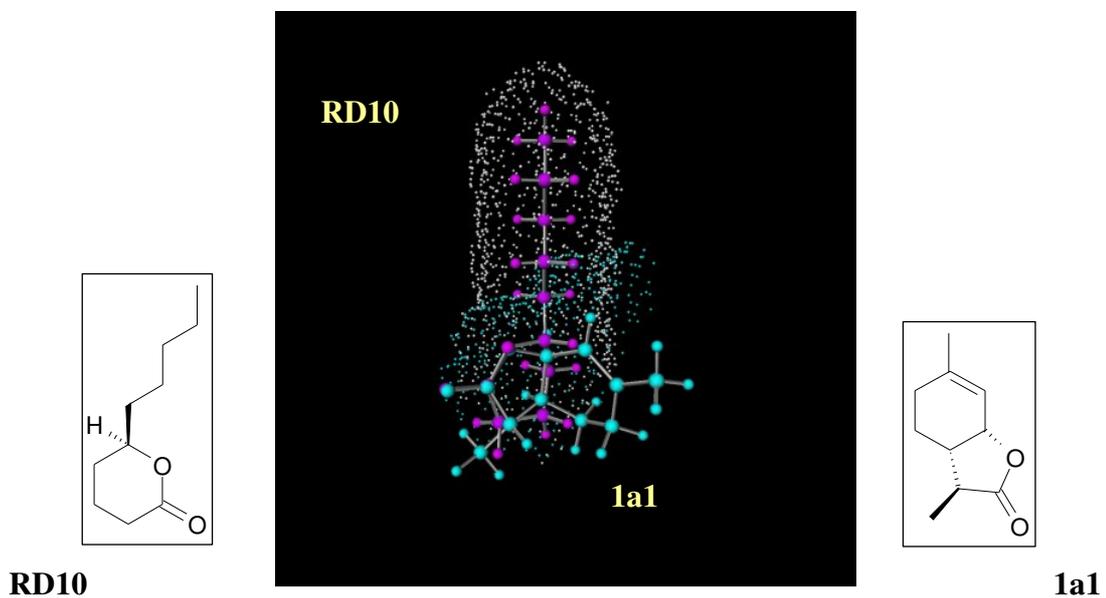


Abbildung 3.31: Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon und R- δ -Decalacton **RD10** anhand ihrer Lactonfunktion und Rückprojektion der in den in **Abbildung 3.21** türkis markierten Neuronen enthaltenen Daten auf die molekulare Oberfläche.

Differenzspektren

Die **Abbildungen 3.32** und **3.33** stellen die Unterschiede der beiden Testmoleküle **1b1** und R- δ -Decalacton **RD10** im Vergleich zur Leitstruktur anhand eines Differenzspektrums dar. Die für die Testmoleküle ungenutzten Neuronen (weiße Bereiche auf der Kohonen Map) entsprechen negativen Abweichungen in der Belegungsdichte. Positive Abweichungen entsprechen stärker belegten Neuronen (dunkelblaue Bereiche auf der Kohonen Map).

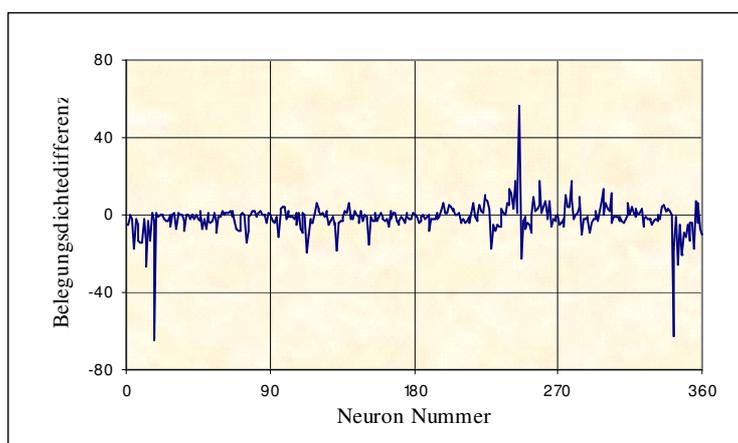


Abbildung 3.32: Neuronenbelegungsdichtedifferenz für das Testmolekül **1b1** im Vergleich zur Leitstruktur (Überlagerung von **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**) zur Identifizierung von Bereichen maximaler Differenz

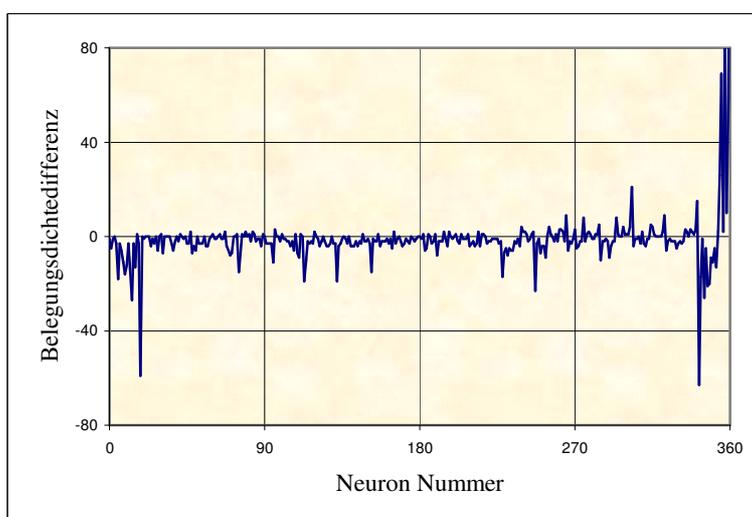


Abbildung 3.33: Neuronenbelegungsdichtedifferenz für das Testmolekül R- δ -Decalacton **RD10** im Vergleich zur Leitstruktur (Überlagerung von **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**) zur Identifizierung von Bereichen maximaler Differenz.

Neuronen mit maximaler positiver Abweichung für das Testmolekül **1b1** sind Neuron 246 (+56), 243 (+17), 259 (+17), 278 (+17), 240 (+13), 298 (+13), 241 (+11), 224 (+10), 275 (+10). Negative Abweichungen finden sich in den Neuronen 18 (-65), 342 (-63), 13 (-27), 345 (-26), 247 (-23), 347 (-21), 348 (-20), 113 (-19), 132 (-18) und 5 (-17).

Für das Testmolekül R- δ -Decalacton **RD10** liegen die größten positiven Abweichungen in den Neuronen 360 (+221), 357 (+85), 355 (+69), 359 (+59), 354 (+26), 303 (+21), 341 (+15), 358 (+10). Negative Abweichungen zeigen die Neuronen 342 (-63), 18 (-59), 13 (-27), 345 (-26), 247 (-23), 347 (-21), 348 (-20), 113 (-19), 132 (-19) und 5 (-18).

Die folgenden Abbildungen lokalisieren die Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz auf der Kohonen Map, und zeigen die Lage der in dem Neuron mit maximaler positiver bzw. negativer Abweichung enthaltenen Punkte auf der Moleküloberfläche. **Abbildung 3.34** zeigt die Lage der in den Neuronen 246 und 18 enthaltenen Oberflächendatenpunkte für das Referenzmolekül und das Testmolekül **1b1**. Neuron 246 enthält mehr Datenpunkte für das Testmolekül als für das Referenzmolekül. Das Referenzmolekül belegt diesen räumlichen Bereich nicht, daher werden zahlreiche Oberflächenpunkte auf den nächstgelegenen Punkt auf der Referenzoberfläche projiziert. Das gleiche gilt im Fall von R- δ -Decalacton für das Neuron 360, das die Oberflächendaten der beim Referenzmolekül nicht vorhandenen Seitenkette entspricht (**Abbildung 3.35**). Hier spiegelt die Belegungsdichtedifferenz des neuronalen Netzes tatsächlich einen Bereich maximaler Unterschiedlichkeit der molekularen Oberfläche dar. Neuronen mit maximaler positiver Abweichung in der Belegungsdichtedifferenz weisen auf molekulare Bereiche hin, in denen das Testmolekül über das Referenzmolekül hinausragt, wodurch sterische Hinderungen bei der Ausbildung des Rezeptor-Ligand Komplexes resultieren können.

Neuron 18 zeigt eine maximale negative Abweichung des Testmoleküls vom Referenzmolekül. In diesem Neuron sind für das Referenzmolekül 98 Datenpunkte und für das Testmolekül **1b1** nur 33 Datenpunkte gespeichert. Die Region, die dieses Neuron repräsentiert, liegt in der Nähe des Ringsauerstoffs der Lactonfunktion. Referenz- und Testmolekül wurden anhand dieser Funktion überlagert und sollten in dieser Region keine Unterschiede aufweisen. Die Rückprojektion der Oberflächendatenpunkte bestätigt, dass die in diesem Neuron enthaltene Oberflächeninformation sich nicht unterscheidet (**Abbildung 3.34** oben). Es handelt sich hier um ein Artefakt der Berechnungsmethode, das daraus resultiert, dass es sich bei dem Referenz-

renzmolekül um eine Überlagerung von vier Moleküle handelt. Die Connolly Oberfläche wird berechnet, indem eine Kugel bestimmten Durchmessers über die Oberfläche des Moleküls gerollt wird. Alle von dieser Kugel erreichbaren Punkte ergeben die Moleküloberfläche. Bei einer Überlagerung von vier Molekülen werden Oberflächenpunkte im Verhältnis zu allen vier Molekülen generiert. Die Kugel, die anschließend über die Oberfläche gerollt wird, erreicht keine Punkte zwischen den Molekülen, so dass sich eine gemeinsame Oberfläche ergibt. In den Regionen, in denen die Moleküle genau überlagert sind, erreicht die Kugel die Oberflächenpunkte für alle vier Moleküle, so dass diese Datenpunkte numerisch vierfach repräsentiert sind. Dies führt zu einem scheinbaren Unterschied zwischen Referenz- und Testmolekül in dieser Region. Die Rückprojektion bestätigt, dass hier kein tatsächlicher Unterschied vorliegt. Dies gilt für alle Testmoleküle im Vergleich zum Referenzmolekül. Dieser Effekt ist folglich über den gesamten Datensatz konstant und hat daher keinen Einfluss auf die Vorhersage von Geruchsschwellenwerten im nächsten Abschnitt.

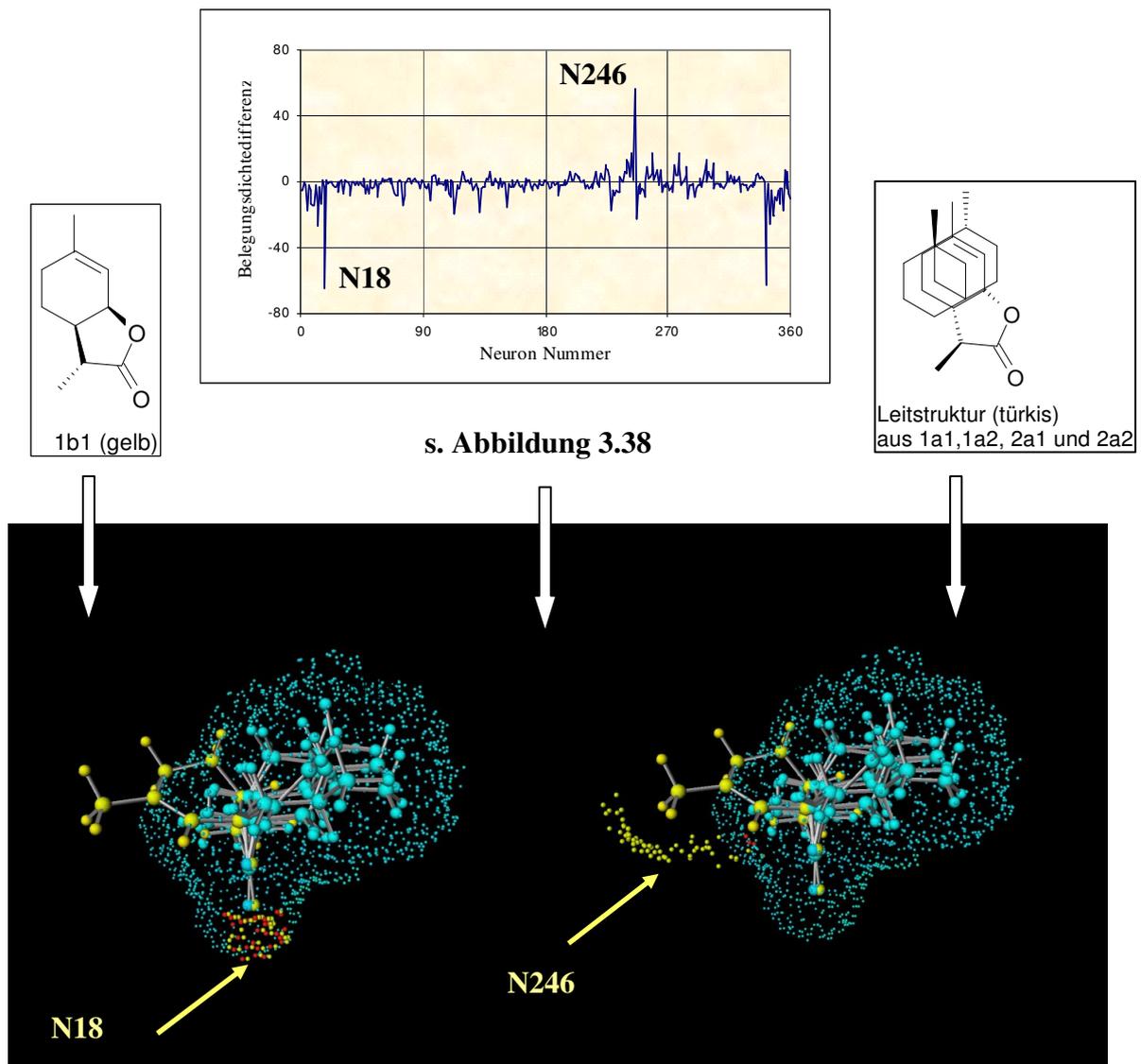
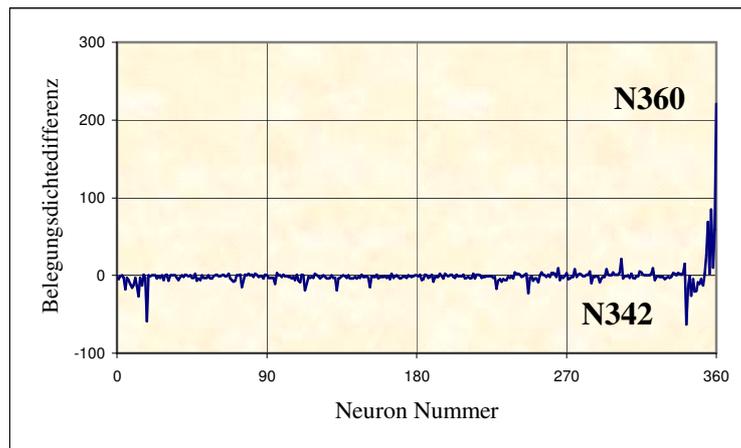


Abbildung 3.34: Lokalisierung der Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz auf der Kohonen Map sowie auf der Moleküloberfläche für das Testmolekül **1b1** im Vergleich zur Leitstruktur (Überlagerung aus **2a1**, **2a2**, **1a1**, **1a2**). hellblau: Referenzmolekül und Referenzoberfläche, rot: Oberflächendatenpunkte in Neuron 18 und 246 für Leitstruktur, gelb: Oberflächendatenpunkte in Neuron 18 und 246 für Testmolekül **1b1**



s. Abbildung 3.39

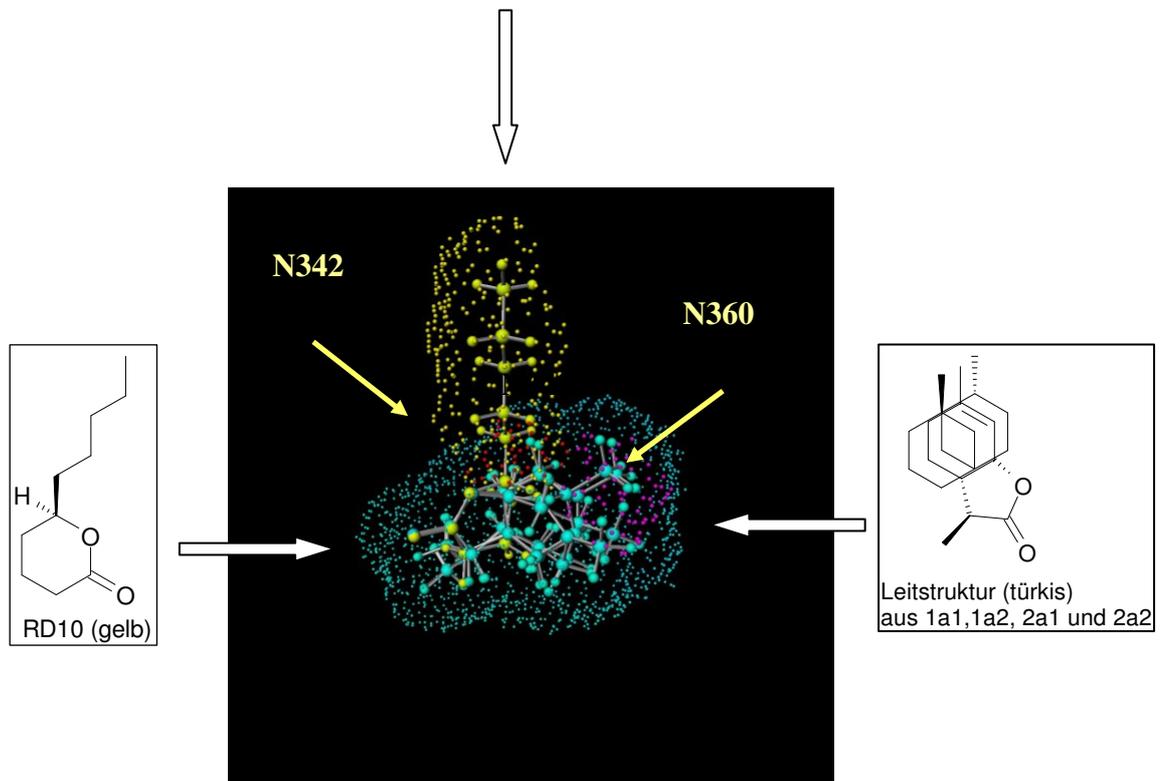


Abbildung 3.35: Lokalisierung der Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz auf der Kohonen Map sowie auf der Moleküloberfläche für das Testmolekül R- δ -Decalacton **RD10** im Vergleich zur Leitstruktur (**2a1, 2a2, 1a1, 1a2**), türkis: Referenzmolekül und Referenzoberfläche, rot: Oberflächendatenpunkte in Neuron 360 für Leitstruktur, gelb: Oberflächendatenpunkte in Neuron 360 für Testmolekül **RD10**, violett: Oberflächenpunkte für Neuron 342 für Leitstruktur.

3.3.1.2.3. Vorhersage von Geruchsschwellenwerten mittels Partial Least Square Regression

Bereiche maximaler Differenz geben lediglich Aufschluss über räumliche Bereiche, in denen sich die betrachteten Moleküle unterscheiden. Maximale strukturelle Unterschiede bedingen nicht automatisch einen maximalen Einfluss auf die geruchlichen Eigenschaften des Moleküls. Die Geruchsschwellenwerte sind in die bisherigen Berechnungen nicht einbezogen worden. Diese werden in der folgenden abschließenden Berechnung berücksichtigt. Mit dem Softwarepaket Unscrambler 7.5 wird eine Partial Least Square (PLS) Regression zur Vorhersage der Geruchsschwellenwerte abgeleitet. Die Belegungsdichte der Neuronen 0-360 gehen als x-Variablen in die Berechnung ein. Der Geruchsschwellenwert (**Tabellen 3.2 und 3.3**) stellt die vorherzusagende y-Variable dar. Aus den Faktoren für die einzelnen Variablen lässt sich ihr Einfluss auf die Ausprägung eines besonders niedrigen Geruchsschwellenwertes ableiten. Eine Erläuterung des statistischen Prinzips findet sich in **Kapitel 2.4.2.** dieser Arbeit.

Modelle zur Vorhersage von Geruchsschwellenwerten für die Geruchsqualität kokosartig; Korrelation zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Geruchsschwellenwert:

Vorhersagemodell K1:

Datensatz: Lactone Nr. 1-35,40-42 und R- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.2 und 3.3**

20 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibriergerade: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,96 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,75 | Achsabschnitt: 0,06 | q^2 : 0,57 |

Vorhersagemodell K2: (ohne Ethylweinlacton)

Datensatz: Lactone Nr. 1-30,32-35, 40-42 und R- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.2 und 3.3**

20 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|----------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,97 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: -0,02 | q^2 : 0,70 |

Vorhersagemodell K3:

Datensatz: Lactone Nr. 1-30,32-35, 40-42 und R- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.2 und 3.3**
 7 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|----------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,97 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: -0,02 | q^2 : 0,70 |

Vorhersagemodell K4:

Datensatz: Lactone Nr. 1-30,32-35, 40-42 und R- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.2 und 3.3**
 7 Hauptkomponenten und 65 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|-----------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 0,80 | Achsabschnitt: 0,01 | r^2 : 0,90 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,60 | Achsabschnitt: - 0,08 | q^2 : 0,74 |

Vorhersagemodell K5:

Datensatz: Lactone Nr. 1-30,32-35, 40-42 und R- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.2 und 3.3**
 20 Hauptkomponenten und 349 x-Variablen (Neuronen)
 ohne Neuronen 246, 342, 345-348, 352-355, 357, 359,360

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 0,82 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,91 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,55 | Achsabschnitt: 0,04 | q^2 : 0,72 |

Zunächst werden alle mono- und bicyclischen Lactone des Datensatzes mit maximaler Anzahl an Hauptkomponenten (20) zur Entwicklung von **Vorhersagemodell K1** herangezogen. Dieses Modell erreicht bereits eine sehr gute Korrelation für die Kalibriergerade ($r^2 = 0,96$), die Korrelation für die Validierung nach dem Leave-one-out Prinzip liefert aber nur eine mäßige Korrelation ($q^2 = 0,56$). Durch Ausschluss von Ethylweinelacton wurde die Korrelation in **Vorhersagemodell K2** mit $r^2 = 0,97$ und $q^2 = 0,70$ erheblich verbessert. Ethylweinelacton besitzt als einziges Lacton innerhalb des Datensatzes eine von kokosnussartig abweichende Geruchsqualität. Vermutlich aktiviert Ethylweinelacton einen anderen Rezeptor bzw. eine andere Gruppe von Rezeptoren als die restlichen in dieser Arbeit untersuchten Lactone. Daher ist es sinnvoll dieses Molekül bei der Entwicklung eines Vorhersagemodells nicht einzubeziehen.

Die innerhalb von Unscrambler 7.5 vorgeschlagene Anzahl an Hauptkomponenten in **Vorhersagemodell K2** beträgt 7. **Vorhersagemodell K3** (r^2 : 0,97 und q^2 : 0,70) bestätigt, dass auf der Basis von 7 Hauptkomponenten eine ebenso gute Korrelation zwischen Vorhersage und tatsächlichem Geruchsschwellenwert erzielt wird, wie unter Berücksichtigung von 20 Hauptkomponenten in **Vorhersagemodell K2** ($r^2 = 0,97$ und $q^2 = 0,70$).

Eine Reduktion der x-Variablen, hier Neuronen, auf diejenigen mit dem größten Einfluss auf den ersten 6 Hauptkomponenten führt in **Vorhersagemodell K4** zu keiner Verbesserung der Korrelation ($r^2 = 0,90$ $q^2 = 0,74$).

Um den Einfluss der höheren Hauptkomponenten mitzuberechnen, beruht die weitere Darstellung und Diskussion der Ergebnisse auf **Vorhersagemodell K2**, das unter Weglassen von Ethylweinalacton mit 20 Hauptkomponenten und allen 361 Variablen berechnet wurde.

3.3.1.2.4. Diskussion der Vorhersagemodelle

Varianzen, Sample Scores und Important Variables

Explained Variance auf den Hauptkomponenten gemäß Vorhersagemodell K2

Unter Berücksichtigung von 7 Hauptkomponenten liegt die erklärte x-Varianz bei 87,15% und die erklärte y-Varianz bei 88,11%. Erst für PC 10 wird eine erklärte y-Varianz von > 95% erreicht.

Sample Scores und Important Variables

Die folgenden Abbildungen zeigen die Sample Scores für 47 Lactone auf den Hauptkomponenten 1 (**Abbildung 3.36**) und 2 (**Abbildung 3.37**). Die Proben mit stark positiven Scores haben einen starken positiven Einfluss auf der jeweiligen Hauptkomponente und sind mit einem hohen Geruchsschwellenwert korreliert. Proben mit hohen negativen Scores sind mit einem niedrigen Geruchsschwellenwert korreliert.

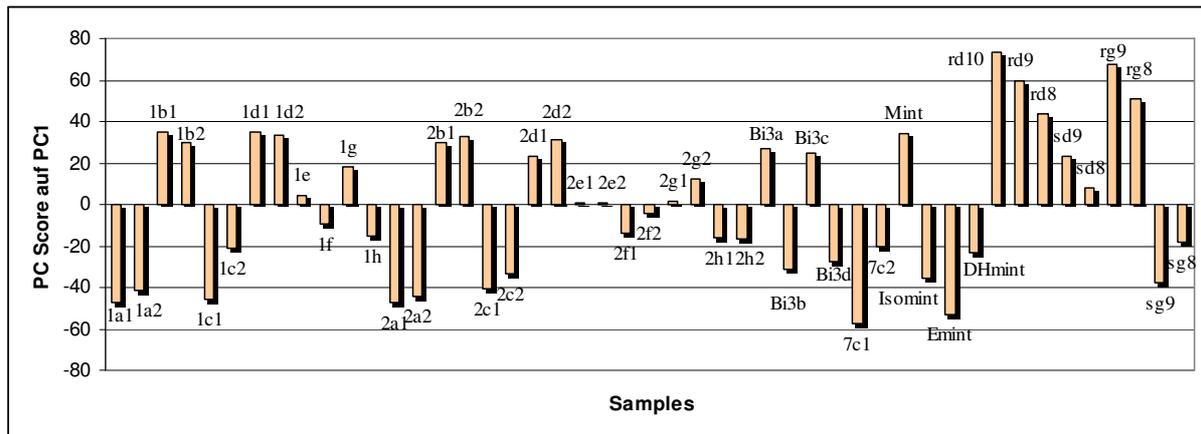


Abbildung 3.36: Sample Scores für mono- und bicyclische Lactone auf der ersten Hauptkomponente (PC1) in **Vorhersagemodell 2**

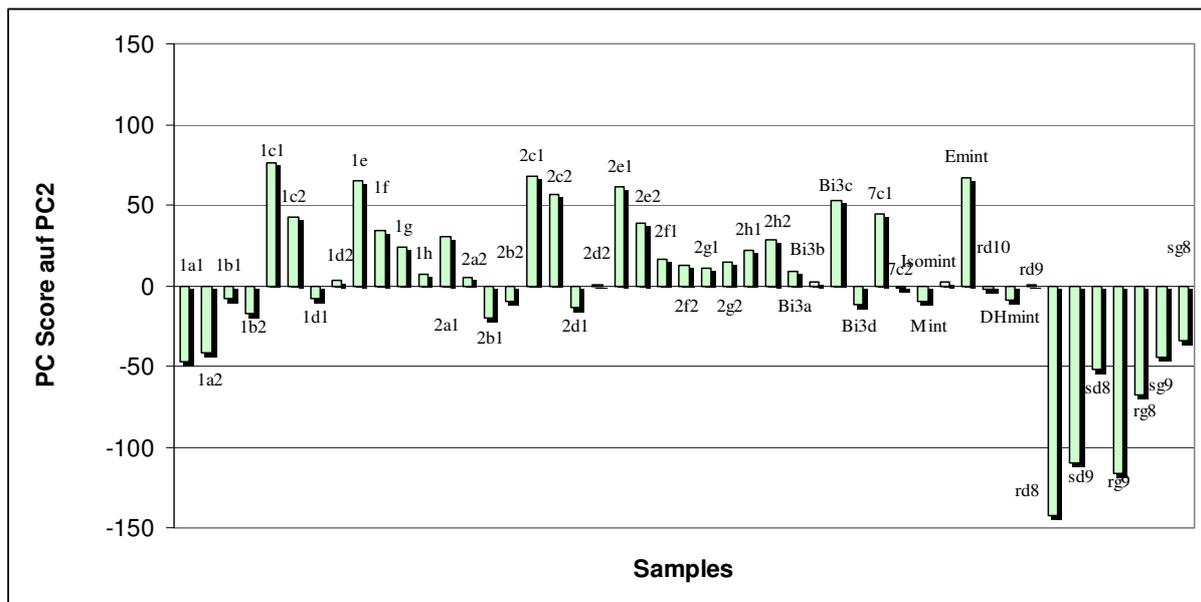


Abbildung 3.37: Sample Scores für mono- und bicyclische Lactone auf der zweiten Hauptkomponente (PC2) in **Vorhersagemodell 2**

Abbildung 3.36 zeigt, dass auf der ersten Hauptkomponente (PC1) die geruchsintensiven bicyclischen Lactone (negative Scores) von ihren geruchlosen Analoga und den weniger geruchsintensiven monocyclischen Lactonen (positive Scores) diskriminiert werden. Stark negative Scores auf PC1 haben die bicyclischen Lactone **Lac7** (-57,5), **Emint** (-53,2), **1a1** (-47,6), **2a1** (-47,5), **1c1** (-45,9), **2a2** (-44,2), **1a2** (-41,5) und **2c1** (-40,4). Stark positive Scores haben die monocyclischen Lactone **rd10** (73,5), **rg9** (67,5), **rd9** (59,7), **rg8** (51,0), **rd8** (44,0) gefolgt von dem geruchlosen bicyclischen Lacton **1b1** (35,1).

Auf der zweiten Hauptkomponente (PC2) zeigen die monocyclischen Lactone stark negative Scores, z.B. **rd10** (-142,4), **sd9** (-116,7), **rd9** (-109,7). Die geruchsintensiven Monocyclen besitzen ebenfalls negative Scores, z. B. **2a1** (-19,6) und **1a1** (-17,6). Die geruchlosen Bicyclen **1b1** (75,8) und **2b1** (67,8) besitzen stark positive Scores (**Abbildung 3.37**)

Des Weiteren geben die x-Loading Weights Aufschluss über den Einfluss der 361 Variablen auf der jeweiligen Hauptkomponente. Variablen, das heißt Neuronen mit einem hohen Loading Weight sind mit einem hohem Geruchsschwellenwert korreliert. Neuronen mit einem negativen Wert sind mit einem niedrigen Geruchsschwellenwert korreliert. **Tabelle 3.4** listet diejenigen Neuronen auf, die einen x-Loading Betrag größer als 0,1 besitzen. **Abbildung 3.38** stellt die x-Loading Weights aller 361 Neuronen auf PC 1 graphisch dar. **Abbildungen 3.39** und **3.40** lokalisieren ihre Position auf der Kohonen Netzwerkkarte.

| Neuronen mit x-Loading Weights $\geq 0,1$ | | Neuronen mit x-Loading Weights $\leq -0,1$ | |
|---|------------------|--|------------------|
| Neuron Nummer | x-Loading Weight | Neuron Nummer | x-Loading Weight |
| 246 | 0,292 | 342 | -0,443 |
| 354 | 0,244 | 247 | -0,206 |
| 240 | 0,162 | 348 | -0,165 |
| 360 | 0,151 | 347 | -0,150 |
| 355 | 0,141 | 345 | -0,132 |
| 297 | 0,134 | 343 | -0,127 |
| 303 | 0,128 | 152 | -0,120 |
| 298 | 0,126 | 228 | -0,120 |
| 335 | 0,118 | 352 | -0,109 |
| 357 | 0,108 | 349 | -0,097 |
| 243 | 0,107 | | |
| 278 | 0,101 | | |
| 353 | 0,101 | | |
| 265 | 0,987 | | |

Tabelle 3.4: Neuronen mit einem x-Loading Betrag größer als 0,1 auf der ersten Hauptkomponente (PC1)

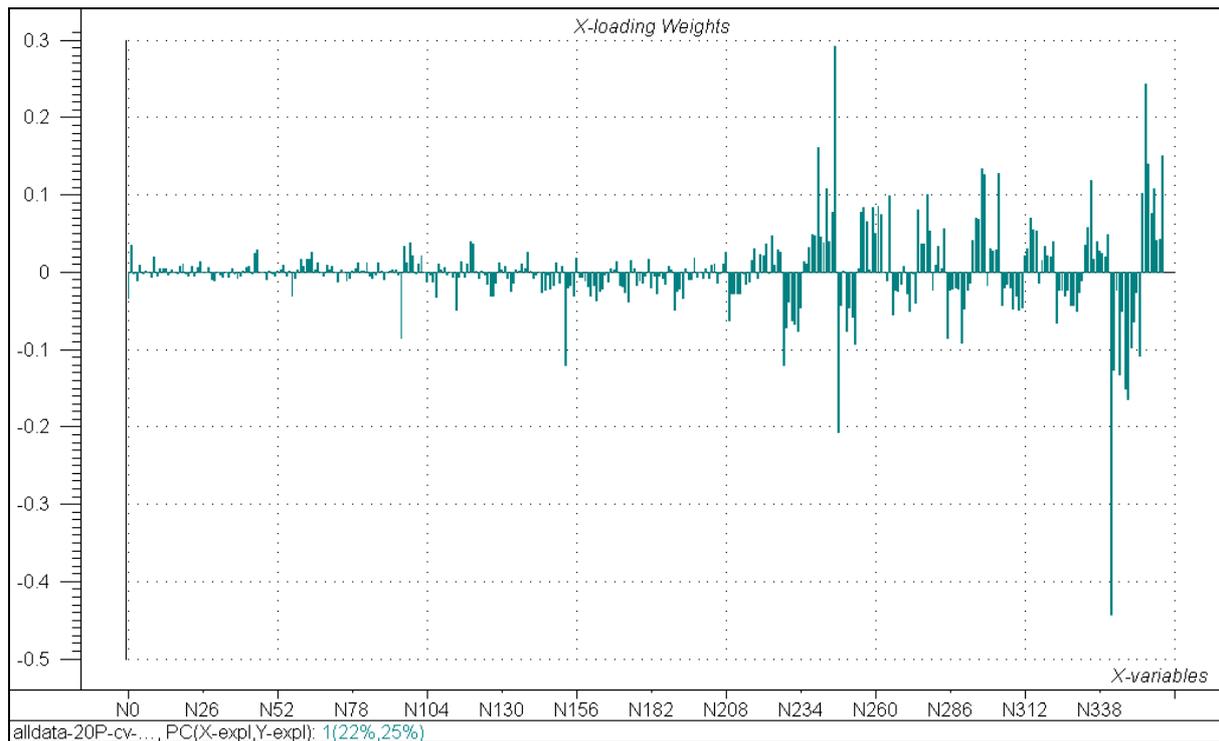


Abbildung 3.38: x-Loading Weights für 361 Variablen (Neuron 0-360) auf der ersten Hauptkomponente nach Vorhersagemodell 2, Unscrambler 7.5.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 |
| 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 |
| 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 |
| 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 |
| 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 |
| 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 |
| 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 |
| 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 |
| 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 |
| 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 |
| 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 |
| 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 |
| 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 |
| 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 |
| 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 |
| 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 |

Farbkodierung

- (hellorange): x-Loading Weight $\geq +0,1$
- (hellblau): x-Loading Weight $\leq -0,1$

Abbildung 3.39: Lokalisierung der wichtigsten Variablen (Neuronen) auf der Kohonen Map. Neuronen mit x-Loading Weights größer als $\pm 0,1$ sind farbig markiert.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 |
| 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |
| 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 |
| 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 |
| 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 |
| 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 |
| 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 |
| 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 |
| 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 |
| 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 |
| 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 |
| 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 |
| 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 |
| 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 |
| 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 |
| 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 |
| 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 |

Farbkodierung

| | | |
|---|-----------|---------------------------------------|
|  | (orange): | $x\text{-Loading Weight} \geq +0,1$ |
|  | (blau): | $x\text{-Loading Weight} \leq -0,1$ |
|  | (gelb): | $x\text{-Loading Weight} \geq +0,030$ |
|  | (türkis): | $x\text{-Loading Weight} \leq -0,035$ |

Abbildung 3.40: Lokalisierung der wichtigsten Variablen (Neuronen) auf der Kohonen Map. Neuronen mit x-Loading Weights größer als $\pm 0,1$ sind wie in **Abbildung 3.39** markiert. Zusätzlich wurden diejenigen Neuronen mit den jeweils 50 größten positiven und negativen x-Loading Weights abgebildet

Die Neuronen 246, 342, 345-348, 352-355, 357, 359 und 360 werden in Unscrambler 7.5 nicht nur als wichtigste Variablen, sondern auch als mögliche Ausreißer klassifiziert. Ausreißer, die sich erheblich von den anderen Eingabedaten unterscheiden, können die Lage einer Hauptkomponente verschieben und damit die Güte der Vorhersage beeinflussen. Daher gilt es zu prüfen, ob es sich bei den Variablen mit höchstem Einfluss, tatsächlich um wichtige Variablen oder um Ausreißer handelt.

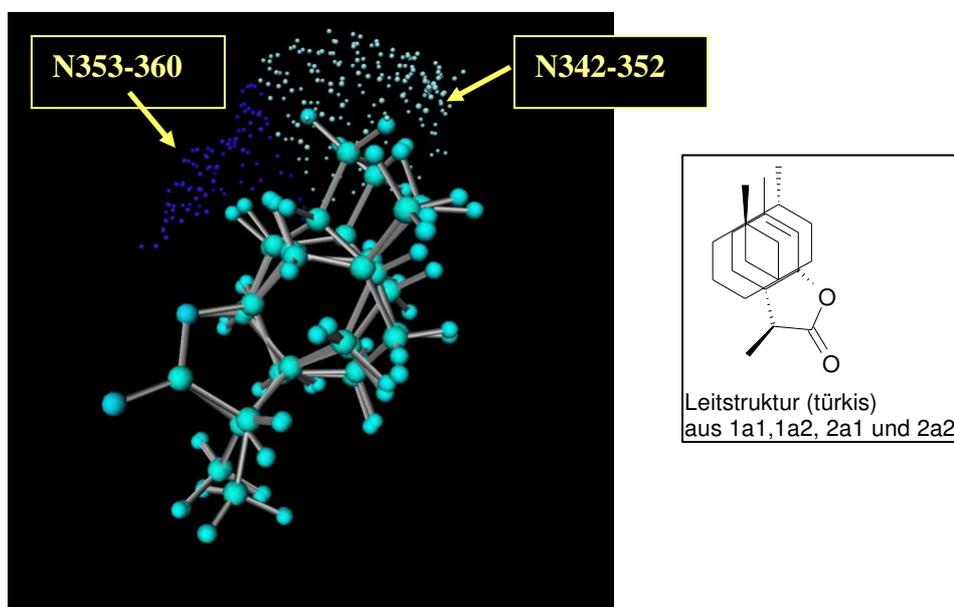
Im vorliegenden Fall handelt es sich bei den Eingabedaten um molekulare Oberflächen, die mittels neuronaler Netze nach Ähnlichkeit sortiert, verglichen und vereinfacht wurden. Es handelt sich also nicht um echte Messwerte, die mittels analytischer Methoden im Labor ermittelt wurden, sondern um Daten die mit theoretischen mathematischen Kalkulationen erzeugt wurden. Deshalb ist ein Vorliegen von Ausreißern hier nicht zu erwarten.

Bestätigt wird dies, wenn neben den Neuronen, deren x-Loading Weight Betrag $\geq \pm 0,1$ ist, diejenigen 50 Neuronen markiert werden, die den größten positiven bzw. negativen Wert haben. **Abbildung 3.40** zeigt, dass sich dann aus isolierten Neuronen auf der Kohonen Map

Cluster von wichtigen Neuronen ergeben. Dies widerlegt das Vorhandensein von Ausreißern, und unterstützt die Annahme, dass es sich um Zentren maximaler Differenz in einer bestimmten Molekülregion handelt.

Eine weitere Bestätigung stellt die Wiederholung der PLS Regression unter Auslassen dieser Neuronen in **Vorhersagemodell K5** ($r^2 = 0,91$, $q^2 = 0,72$) dar. Die Güte der Korrelation ist für das neue Vorhersagemodell im Vergleich zu **Vorhersagemodell 2** ($r^2 = 0,97$, $q^2 = 0,70$) etwas schlechter, so dass angenommen werden kann, dass diese Variablen für die Vorhersage wichtige Information enthalten.

Abbildung 3.40 zeigt eine Konzentration wichtiger Neuronen in der untersten Zeile der Kohonen Map, und zwar für die Neuronen 342 bis 360. Die Neuronen 342-352 besitzen negative x-Loading Weights, während die Neuronen 353-360 positive x-Loading Weights besitzen. Die folgenden Abbildungen lokalisieren die Lage der in diesen Neuronen enthaltenen Oberflächenpunkte für das Referenzmolekül, das geruchlose Lacton **1b1** und R- δ -Declacton **rd10**.



Farbkodierung

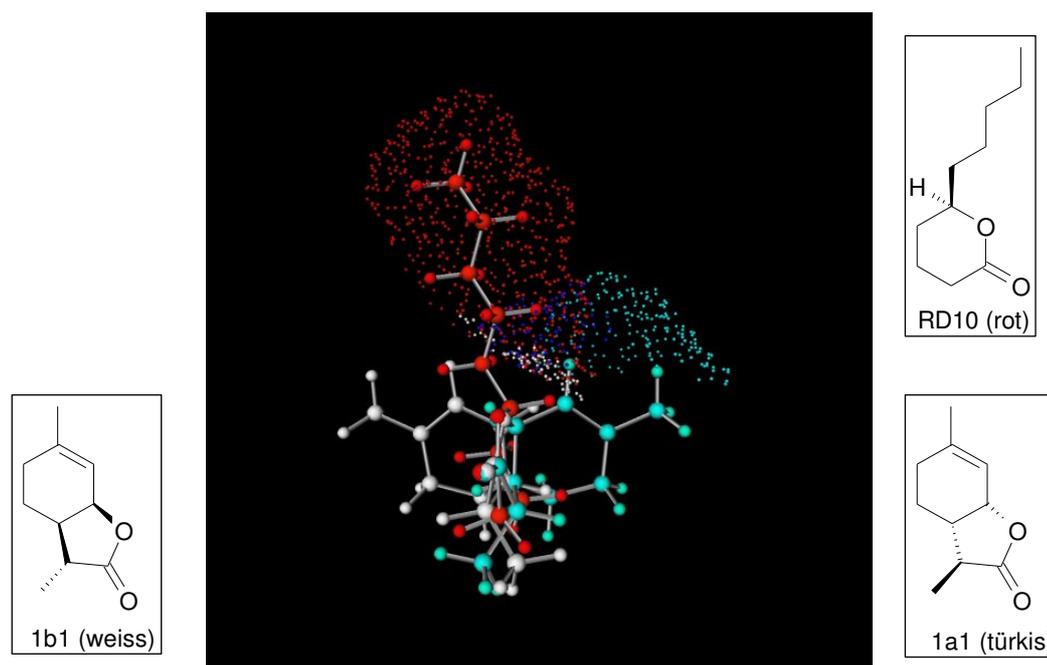
■ (hellblau)

Datenpunkte in Neuronen 342-352, negative x-Loading Weights

■ (dunkelblau)

Datenpunkte in Neuronen 353-360, positive x-Loading Weights

Abbildung 3.41: Rückprojektion der in den Neuronen 342-360 enthaltenen Oberflächendatenpunkte auf die molekulare Oberfläche des Leitstruktur aus **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**.



Farbkodierung der Oberflächendatenpunkte

a) Datenpunkte in Neuronen 342-352, negative x-Loading Weights

| | |
|--|--|
| (hellblau) | Leitstruktur, hier stellvertretend nur 1a1 |
| 1 | leer für 1b1 und rd10 |

b) Datenpunkte in Neuronen 353-360, positive x-Loading Weights

| | |
|---|--|
| (dunkelblau) | Leitstruktur, hier stellvertretend 1a1 |
| (weiß) | 1b1 |
| (rot) | rd10 |

Abbildung 3.42: Lokalisierung der in den Neuronen 342-360 enthaltenen Oberflächendatenpunkte auf die molekulare Oberfläche des Referenzmoleküls (hellblau), des geruchlosen bicyclischen Lactons **1b1** (weiß) und R- δ -Decalacton (rot). Der Übersicht halber ist stellvertretend für das Referenzmolekül nur das Lacton **1a1** abgebildet.

Wie die **Abbildungen 3.41** und **3.42** zeigen, liegen die in den Neuronen 342-352 enthaltenen Oberflächendatenpunkte in der Nähe der Methylgruppe und an einer Seite des Cyclohexanrings. Die als Beispiele ausgewählten Testmoleküle **1b1** und R- δ -Decalacton **rd10** füllen diesen räumlichen Bezirk nicht aus, die entsprechenden Neuronen sind für die Testmoleküle leer. Diese Variablen besitzen in der PLS Regression negative Loading Weights, d.h. sie sind nega-

tiv proportional mit dem Geruchsschwellenwert korreliert. Die Anwesenheit von molekularen Bereichen in diesem Bezirk führt zu einem niedrigen Geruchsschwellenwert. Die Abwesenheit von Oberflächendatenpunkten in diesem Bereich ist mit einem hohen Geruchsschwellenwert korreliert. Dies ist konsistent mit den abgebildeten Testmolekülen **1b1** und R- δ -Decalacton **rd10**. Sowohl für das geruchlose **1b1** als auch für R- δ -Decalacton **rd10**, das mit 12.5 ng/l im Vergleich zu den Referenzmolekülen einen 5 Größenordnungen höheren Geruchsschwellenwert aufweist, sind diese Neuronen unbelegt.

Die Neuronen 353-360 besitzen auf der ersten Hauptkomponente der Partial Least Square Regression positive x-Loading Weights. Das heißt die Anzahl der in diesen Neuronen enthaltenen Oberflächendatenpunkte ist direkt proportional zum Geruchsschwellenwert. Eine hohe Belegungsdichte ist mit einem hohen Geruchsschwellenwert, eine niedrige Belegungsdichte mit einem niedrigen Geruchsschwellenwert korreliert.

Für R- δ -Decalacton, wurden die Oberflächendaten der Alkylseitenkette, für deren räumliche Ausdehnung die Referenzmoleküle keine Entsprechung besitzen, auf diesen Neuronen abgebildet. Die Anzahl an Oberflächendatenpunkten ist erheblich höher als für die Leitstruktur.

Allerdings ist die Belegungsdichte für das geruchlose **1b1** niedriger als für die Leitstruktur. Es handelt sich also tatsächlich um einen nichtlinearen Zusammenhang, der für das Referenzmolekül ein Optimum durchläuft und sowohl bei niedrigerer als auch bei höherer Belegungsdichte mit einem höheren Geruchsschwellenwert korreliert ist. Da PLS Regression das System über eine Vielzahl von Linearkombinationen zerlegt, wird dieser nichtlineare Zusammenhang nicht auf einer einzigen Hauptkomponente (hier PC1) erfasst. Nichtlinearen Zusammenhängen wird über die Dimensionalität des Systems, sprich der Anzahl an Hauptkomponenten Rechnung getragen. Im vorliegenden Fall sind dieselben Neuronen auf der nächsten Hauptkomponente (PC2) umgekehrt proportional mit dem Geruchsschwellenwert korreliert, das heißt hohe Belegungsdichte korreliert mit einem niedrigen, niedrige Belegungsdichte mit einem hohen Geruchsschwellenwert. Große Sample Scores besitzen hier die monocyclischen Lactone, angeführt von R- δ -Decalacton **rd10**. Am stärksten negativ ist der Sample Score von **1b1**, gefolgt von **2b1**.

Tabelle 3.5

| Lacton | Geruchsschwellenwert [ng/l Luft] | | |
|---|----------------------------------|---------------------|---------------------|
| | Measured | Calibration | Validation |
| (3S, 3aS, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1a) | $1 \cdot 10^{-5}$ | $1,4 \cdot 10^{-5}$ | $7,9 \cdot 10^{-4}$ |
| (3R, 3aR, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1b) | > 100 | 41 | 23 |
| (3R, 3aS, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1c) | 0,25 | 0,12 | 0,08 |
| (3S, 3aR, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1d) | 80 | 54 | 16 |
| (3S, 3aS, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1e) | $7 \cdot 10^{-3}$ | $4 \cdot 10^{-3}$ | $7 \cdot 10^{-1}$ |
| (3R, 3aR, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1f) | 14 | 11 | 1,3 |
| (3R, 3aS, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1g) | 8 | 8 | 52 |
| (3S, 3aR, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1h) | 0,05 | 0,03 | 0,02 |
| (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a1) | $1 \cdot 10^{-6}$ | $2 \cdot 10^{-6}$ | 0,05 |
| (3S, 3aS, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a2) | $7 \cdot 10^{-6}$ | $3 \cdot 10^{-6}$ | $8 \cdot 10^{-5}$ |
| (3R, 3aR, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2b1) | > 100 | 96 | 87 |
| (3R, 3aR, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2b2) | > 100 | 218 | 1054 |
| (3R, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2c1) | 7,5 | 1,1 | 0,2 |
| (3R, 3aS, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2c2) | $7 \cdot 10^{-3}$ | $3 \cdot 10^{-3}$ | $7 \cdot 10^{-3}$ |

Fortsetzung Tabelle 3.5

| Lacton | Geruchsschwellenwert [ng/l Luft] | | |
|---|----------------------------------|-------------------|------------|
| | Measured | Calibration | Validation |
| (3S, 3aR, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2d1) | 30 | 26 | 7 |
| (3S, 3aR, 6S, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2d2) | > 100 | 20 | 1 |
| (3S, 3aS, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2e1) | 0,15 | 0,05 | 0,04 |
| (3S, 3aS, 6S, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2e2) | 0,50 | 0,06 | 0,01 |
| (3R, 3aR, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2f1) | 0,40 | 11,40 | 81,85 |
| (3R, 3aR, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2f2) | $3 \cdot 10^{-3}$ | 0,01 | 2,37 |
| (3R, 3aS, 6R, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2g1) | > 100 | 29 | 0,9 |
| (3R, 3aS, 6S, 7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2g2) | > 100 | 35 | 9,0 |
| (3S, 3aR, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2h1) | 15 | 3,7 | 0,07 |
| (3S, 3aR, 6S, 7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2h2) | $5 \cdot 10^{-4}$ | $3 \cdot 10^{-3}$ | 0,06 |
| 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7-en-3-on (3a-d) | > 100 | > 87 | > 10 |
| Mintlacton (4a) | 4,5 | 6,3 | 42 |
| E-Mintlacton (4b) | 6 | 1,5 | 0,1 |
| Iso-mintlacton (5) | 4,5 | 13,3 | 6,0 |
| Dehydromintlacton (6) | 1,0 | 2,4 | 1,2 |
| 3a,4,5,7a-Tetrahydro-6-methyl-2(3H)-benzofuranon (7) | 0,25 | 0,21 | 0,04 |

Fortsetzung Tabelle 3.5

| Lacton | Geruchschwellenwert [ng/l Luft] | | |
|---|---------------------------------|-------------|------------|
| | Measured | Calibration | Validation |
| R- γ -Octalacton (RG8) | 1,8 | 2,7 | 3,7 |
| S- γ -Octalacton (SG8) | 1,8 | 3,1 | 4,8 |
| R- γ -Nonalacton (RG9) | 4,5 | 9,0 | 70 |
| S- γ -Nonalacton (SG9) | 4,5 | 0,8 | 0,2 |
| R- δ -Octalacton (RD8) | 12,5 | 20,2 | 12,0 |
| S- δ -Octalacton (SD8) | 12,5 | 19,6 | 19,3 |
| R- δ -Nonalacton (RD9) | 1,3 | 1,2 | 1,3 |
| S- δ -Nonalacton (SD9) | 2,0 | 2,1 | 4,4 |
| R- δ -Decalacton (RD10) | 0,6 | 0,3 | 0,4 |

Tabelle 3.5: Vorhersage der Geruchschwellenwerte gemäß **Vorhersagemodell K2**

Measured gemessener Geruchschwellenwert

Calibration berechneter Geruchschwellenwert aus der Kalibrierung

Validation berechneter Geruchschwellenwert nach der Leave-one-out Validierung

3.3.1.2.5 Diskussion der berechneten Geruchschwellen nach Vorhersagemodell K2

Tabelle 3.5 stellt die nach Vorhersagemodell K2 berechneten Geruchschwellenwerte den gemessenen Geruchschwellenwerte (Measured) gegenüber. Die berechneten Geruchschwellenwerte werden einerseits aus der erhaltenen Kalibriergrade (Calibration) berechnet. Darüber hinaus wird die Robustheit des Vorhersagemodells nach der Leave-one-out Methode überprüft (Validation). Dabei wird der Geruchschwellenwert des jeweiligen Lactons durch ein Vorhersagemodell berechnet, das sich unter Auslassen des betreffenden Lactons ergibt.

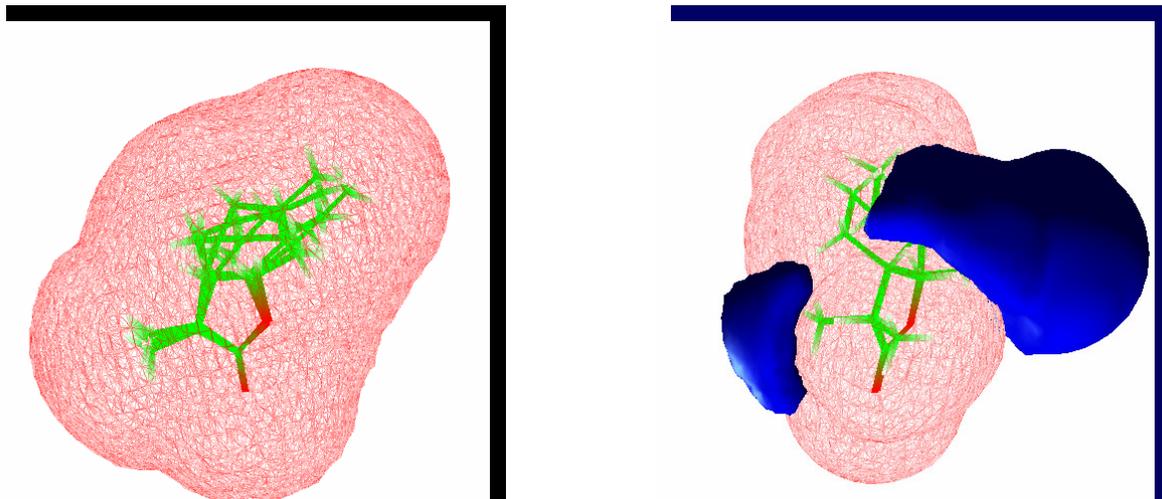
Die vorhergesagten Geruchschwellenwerte sind hierbei unter Berücksichtigung der biologischen Schwankungsbreite bei der Wahrnehmung von Geruchstoffen zu bewerten. Folglich sind Unterschiede zwischen Geruchschwellenwerten erst dann als signifikant zu betrachten, wenn sie mindestens einen Faktor 10 betragen.

Die Größenordnung der vorgesagten Geruchsschwellenwerte steht im Einklang mit den gemessenen Geruchsschwellenwerten. Für die Lactone **1a**, **2a1** und **2a2**, die als Leitstruktur definiert wurden, werden sehr niedrige Geruchsschwellenwerte in der Größenordnung von $1 \cdot 10^{-5}$ ng/l Luft vorausgesagt, die sehr gut mit den gemessenen Geruchsschwellenwerten übereinstimmen. Für ihre geruchlosen Analoga **1b**, **2b1** und **2b2** werden Geruchsschwellenwerte von 23, 87 und über 1000 ng/l Luft berechnet, die die geringe Geruchsintensität korrekt widerspiegeln.

Abweichend von der allgemein guten Übereinstimmung wird für die Leitstruktur **2a1** mit 0,05 ng/l Luft ein um vier Größenordnungen zu hoher Geruchsschwellenwert berechnet. Dieser Wert stammt aus einem Vorhersagemodell, das unter Weglassen von **2a1** als der Leitstruktur mit dem niedrigsten Geruchsschwellenwert berechnet wurde. Hierbei fehlen bei der Berechnung des Vorhersagemodells wichtige Informationen, so dass ein zu hoher Schwellenwert im Validierungsdatensatz resultiert.

3.3.1.3. Entwicklung eines Rezeptormodells für kokosnussartigen Geruch

Die gute Übereinstimmung der berechneten mit den gemessenen Geruchsschwellenwerten bestätigt die sinnvolle Wahl einer Überlagerung der drei Lactone **1a**, **2a1** und **2a2** als Leitstruktur mit optimalen Eigenschaften für kokosnussartigen Geruch. Diese Leitstruktur kann daher auch als Grundlage zur Eingrenzung des Rezeptorraums für den olfaktorischen Rezeptor dienen. Durch Überlagerung der drei Moleküle lässt sich mit Hilfe des Softwarepakets gOpenMol 3.0 eine gemeinsame Oberfläche über die drei Moleküle berechnen (**Abbildung 3.43**). Bedingung für optimale geruchliche Eigenschaften ist die Passform innerhalb dieses Rezeptorraums. Ein potentieller Kandidat für eine Synthese, für den ein niedriger Geruchsschwellenwert berechnet wird, kann zusätzlich zur zusätzlichen Überprüfung in diesen Rezeptorraum eingepasst werden. Ein Herausragen über diesen Raum, wie in **Abbildung 3.43** am Beispiel von Lacton **1b** (Geruchsschwelle 1000 ng/l Luft) gezeigt, führt ein Herausragen aus diesem Rezeptorraum zu einer deutlichen Erhöhung des Geruchsschwellenwertes.



Leitstruktur

Geruchsschwelle <math> < 1 \cdot 10^{-5}</math> ng/l Luft

Lacton 1b im Rezeptorraum der Leitstruktur

Geruchsschwelle > 1000 ng/l Luft

Abbildung 3.43 Olfaktophorhypothese für kokosnussartigen Geruch.

Links: Definition des maximalen Rezeptorraums anhand einer Leitstruktur aus den Lactonen **1a**, **2a1** und **2a2**

Rechts: Einpassung von Lacton **1b** in den definierten Rezeptorraum
blaue Bereiche markieren molekulare Regionen, in denen das Testmolekül über den Rezeptorraum hinausragt.

3.3.1.4. Abschließende Diskussion zur Untersuchung von Struktur- Geruchsbeziehungen von Lactonen der Geruchsqualität kokosartig

Es wurden erfolgreich dreidimensionale Molekülmodelle und Oberflächendaten für die betreffenden Lactone generiert. Der Vergleich mittels Neuronaler Netze nach Kohonen lieferte weiteren Einblick in die Ähnlichkeit der Moleküle. Die vereinfachten Ausgabedaten wurden mittels PLS Regression erfolgreich mit dem Geruchsschwellenwert korreliert. Darüber hinaus erlaubt die Betrachtung der für die Vorhersage des Geruchsschwellenwertes wichtigsten Variablen (hier Neuronen) und Rückprojektion der in ihnen enthaltenen Oberflächenkoordinaten auf die molekulare Oberfläche die Identifizierung räumlich notwendiger bzw. verbotener Bereiche. Die Validität des Vorhersagemodells erlaubt die Definition einer Olfaktophorhypothese aus der Leitstruktur aus den drei Lactonen **1a**, **2a1** und **2a2**.

Da Artefakte der Berechnungsmethode oder das Nichterfassen nichtlinearer Zusammenhänge nicht ausgeschlossen werden können, bedürfen die erhaltenen Ergebnisse einer sorgfältigen Analyse und Überprüfung. Dieser Analyse- und Überprüfungsprozess kann als letzter Schritt in der vorliegenden Untersuchungsmethode verstanden werden, die ohne den Sachverstand des Chemikers als letzter Instanz nicht auskommt.

Die entwickelte Berechnungsmethode eignet sich zur Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen im Sinne einer systematischen Vorgehensweise zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

3.3.2 Monocyclische Lactone der Geruchsqualitäten pfirsich: Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen mit der energetisch günstigsten Molekülkonformation im Vergleich zu einem dynamischen Ansatz.

Für die Untersuchungen der Struktur- Geruchsbeziehungen der Lactone mit kokosnussartiger Geruchsqualität in **Kapitel 3.3.1** wurden jeweils die energetisch günstigsten Konformationen der Moleküle herangezogen. Da die tatsächliche Konformation der Liganden am olfaktorischen Rezeptor nicht bekannt ist, muss ein Vorhersagetool sich auf die energetisch günstigste Konformation als Referenz beziehen. Dies wird häufig als Schwachpunkt von Studien zum Thema Struktur-Aktivitätsbeziehungen kritisiert. Daher wurde im Folgenden eine Vergleichsstudie am Beispiel monocyclischer Lactone mit pfirsichartigem Geruch durchgeführt, in der die Qualität der Vorhersage unter Berücksichtigung der energetisch günstigsten mit dynamischen Strukturen verglichen wird.

3.3.2.1 Datensatz

| | Geruchsschwellenwert [ng/l Luft], Geruchsqualität | |
|------------------------|---|------------------------|
| δ -Dodecalacton | R: 12 ng/l; pfirsich | S: 0,4 ng/l; pfirsich |
| δ -Undecalacton | R: 60 ng/l; pfirsich | S: 0,8 ng/l; pfirsich |
| δ -Decalacton | R: 0,6 ng/l; kokosnuss | S: 2,0 ng/l; pfirsich |
| δ -Nonalacton | R: 1,3 ng/l; kokosnuss | S: 2,0 ng/l; kokosnuss |
| γ -Dodecalacton | R: 0,8 ng/l; pfirsich | S: 6,0 ng/l; pfirsich |
| γ -Undecalacton | R: 0,8 ng/l pfirsich | S: 4,5 ng/l; pfirsich |
| γ -Decalacton | R: 12,5 ng/l pfirsich | S: 12,5 ng/l; pfirsich |
| γ -Nonalacton | R: 4,5 ng/l kokosnuss | S: 4,5 ng/l; kokosnuss |

Tabelle 3.6 Datensatz zur Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen monocyclischer Lactone der Geruchsqualität pfirsich.

3.3.2.2 Molecular Modelling

Analog zu **Kapitel 3.3.1.1** wurden zunächst dreidimensionale Molekülmodelle der betreffenden Lactone mit dem Softwarepakets Hyperchem 5.0 und der Erweiterung Chemplus 1.0 generiert. Zusätzlich zu der energetisch günstigsten Struktur wurden dynamische Strukturen wie folgt erzeugt:

Eine Konformationssuche [Vgl Kapitel **5.6.1** und **5.6.2** des Experimenteller Teils] wird durchgeführt für R- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton. Alle Konformere, die energetisch nicht mehr als 1 kcal/mol über der energetisch günstigsten Konformation liegen, werden zur Erzeugung von dynamischen Strukturen berücksichtigt. Hierbei handelt es sich um die in den **Tabellen 3.5** und **3.6** aufgeführte Anzahl an Konformeren.

| Konformationssuche R- δ -Dodecalacton | |
|--|--------------------|
| Konformere | Energie [kcal/mol] |
| Konformer 1 | 10,63263 |
| Konformer 2 | 11,18359 |
| Konformer 3 | 11,18959 |
| Konformer 4 | 11,19771 |
| Konformer 5 | 11,23853 |
| Konformer 6 | 11,25579 |
| Konformer 7 | 11,26755 |
| Konformer 8 | 11,29406 |
| Konformer 9 | 11,29538 |
| Konformer 10 | 11,56273 |
| <i>Konformer 11</i> | <i>11,85688</i> |

Tabelle 3.7: Konformationssuche für R- δ -Dodecalacton mittels HyperChem5.0/Chemplus1.0

| Konformationssuche R- γ -Dodecalacton | |
|--|--------------------|
| Konformere | Energie [kcal/mol] |
| Konformer 1 | 13,73322 |
| Konformer 2 | 13,95659 |
| Konformer 3 | 14,34004 |
| Konformer 4 | 14,35552 |
| Konformer 5 | 14,39100 |
| Konformer 6 | 14,39196 |
| Konformer 7 | 14,39656 |
| Konformer 8 | 14,43772 |
| Konformer 9 | 14,57218 |
| Konformer 10 | 14,62051 |
| Konformer 11 | 14,62091 |
| Konformer 12 | 14,64149 |
| Konformer 13 | 14,66143 |

Tabelle 3.8: Konformationssuche für R- γ -Dodecalacton mittels HyperChem5.0/Chemplus1.0

Die S-konfigurierten Stereoisomere werden durch Inversion der Stereochemie in HyperChem 5.0 erzeugt. Die kürzerkettigen Analoga werden durch schrittweise Verkürzung der Seitenkette um jeweils eine Methylgruppe erzeugt, ohne eine neue Konformationssuche durchzuführen. Die erhaltenen Konformere werden anhand ihrer Lactonfunktion zu dynamischen Strukturen überlagert. **Abbildung 3.48** zeigt als Beispiel eine solche dynamische Struktur, wie sie mit dieser Berechnungsmethode aus überlagerten Konformationen für R- γ -Dodecalacton und S- δ -Dodecalacton erzeugt wurde.

3.3.2.3. Erzeugung einer Moleküloberfläche mittels IRIS Explorer 3.5

Analog zu Kapitel 3.3.1 und der in Kapitel 5.6-5.8 des Experimentellen Teil beschriebenen Berechnungsprozedur wird mittels IRIS Explorer 3.5 eine Moleküloberfläche nach Conolly berechnet. Gleichzeitig wird die numerische Information in Form der x,y,z-Koordinaten in einem Textfile gespeichert, das nach Import und Modifikation in Microsoft Excel 2000 als Input für die folgenden Berechnungen mittels Neural Connection 2.0 dient.

Hierbei ist zu beachten, dass die Punktdichte für die Generierung einer Moleküloberfläche in IRIS Explorer 3.5 so gewählt werden muss, dass die maximale Anzahl von 5000 Koordinaten als Eingabe für das Neuronale Netz nicht überschritten wird. Für den nichtdynamischen Ansatz, der sich auf die energetisch günstigsten Strukturen beschränkt, wurde hierfür eine Punktdichte von 4,5 gewählt. Für die dynamischen Strukturen wurde die Punktdichte entsprechend reduziert auf 2,7.

3.3.2.4. Auswahl einer geeigneten Leitstruktur

Die folgende Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen erfolgte wie in Kapitel 2.4.1.3 bzw. 3.3.1.2. nach einem Single Template Approach. Hierbei wird das Netzwerk mit demjenigen Referenzmolekül trainiert, das optimale Eigenschaften besitzt. Anschließend werden alle anderen Moleküle als Testdatensatz auf dasselbe Netzwerk projiziert. Die sorgfältige Auswahl einer geeigneten Leitstruktur ist der wichtigste Schritt der gesamten Berechnungsprozedur. S- δ -Dodecalacton (**SD12**) hat mit 0,4 ng/l Luft den niedrigsten Geruchsschwellenwert für die Serie der δ -Lactone, während R- γ -Dodecalacton (**RG12**) mit 0,8 ng/l Luft den niedrigsten Geruchsschwellenwert für die γ -Lactone aufweist. Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass mit S- δ -Dodecalacton als Leitstruktur eine gute Korrelation innerhalb der homologen Reihe der δ -Lactone erzielt werden kann, dass die Korrelation sich aber nicht auf die gesamte Gruppe der γ - und δ -Lactone übertragen lässt. Das gleiche gilt umgekehrt bei Verwendung von R- γ -Dodecalacton als Leitstruktur. Daher werden im Folgenden eine Überlagerung aus S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton als Referenz gewählt, um die Information aus jeweils einem γ - und einem δ -Lacton mit quasi optimalen Eigenschaften in der Leitstruktur zu vereinigen. Die Abbildungen 3.47 und 3.48 zeigen jeweils die Leitstruktur für den gewählten dynamischen bzw. nichtdynamischen Ansatz der folgenden Ähnlichkeitsstudie.

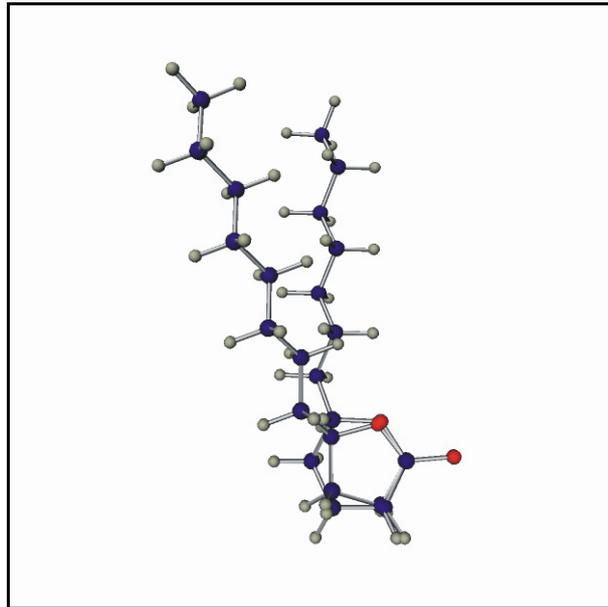


Abbildung 3.44: Überlagerung von S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton als Leitstruktur für den nichtdynamischen Ansatz (Überlagerung der energetisch günstigsten Konformation)

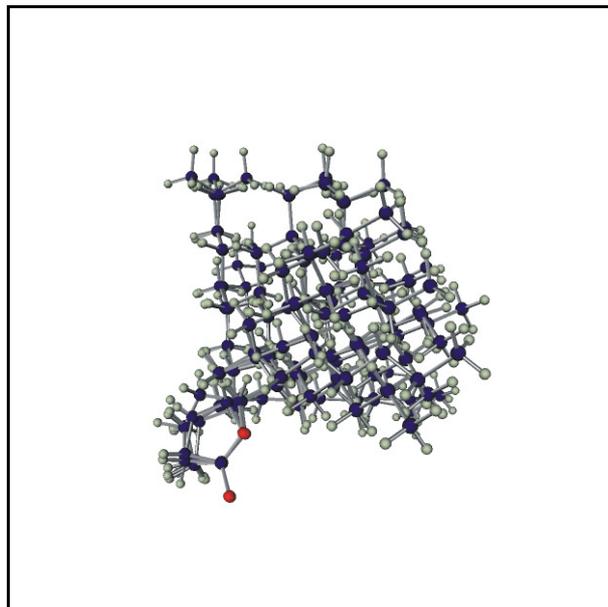


Abbildung 3.45: Überlagerung mehrerer Konformere von S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton als Leitstruktur für den dynamischen Ansatz

3.3.2.5. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen:

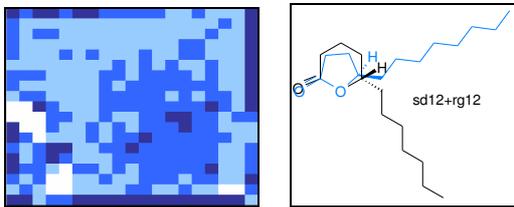
3.3.2.5.1. Nichtdynamischer Ansatz, Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte

Die folgende Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen wurde analog zu Kapitel **3.3.1.2.2** durchgeführt. Darüber hinaus findet sich eine detaillierte Beschreibung der Berechnungsmethode im Kapitel **2.4.1.3** des Theoretischen bzw. Kapitel **5.9** des Experimentellen Teils. Die **Abbildungen 3.49 bis 3.51** zeigen anhand ausgewählter Lactone die erhaltenen Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte sowohl für den dynamischen als auch für den nichtdynamischen Ansatz, der sich auf die Untersuchung der energetisch günstigsten Konformere beschränkt. Eine Übersicht über alle Belegungsdichtemaps dieses Datensatzes findet sich im Anhang dieser Arbeit.

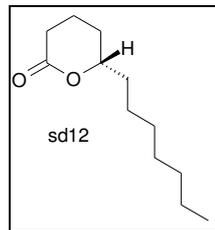
Nichtdynamischer Ansatz

Farbkodierung für die abgebildete Belegungsichte

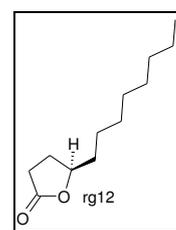
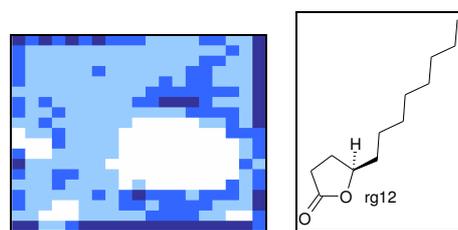
-  (weiß): keine Datenpunkte
-  (hellblau): 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron
-  (mittelblau): 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron
-  (dunkelblau): mehr als 10 Datenpunkte pro Neuron



Belegungsichte Map, Training mit **sd12** und **rg12**



Bel.dichte Map Referenzmolekül 1 (**sd12**)



Bel.dichte Map Referenzmolekül 2 (**rg12**)

Abbildung 3.46: Belegungsichte Maps nach Kohonen für die Leitstruktur des nichtdynamischen Ansatzes

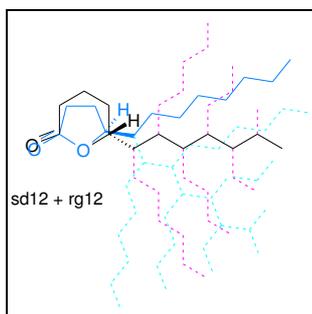
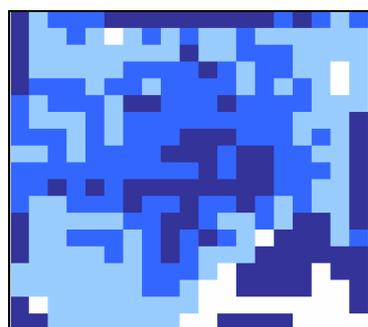
3.3.2.5.2 Dynamischer Ansatz; Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte

In **Abbildungen 5.52** sind beispielhaft Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte für den dynamischen Ansatz, d.h. unter Berücksichtigung mehrerer Konformationen, abgebildet. Eine Abbildung aller erhaltenen Maps findet sich im Anhang dieser Arbeit.

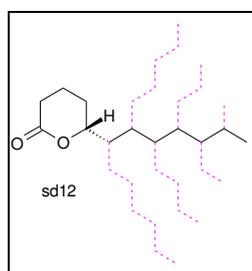
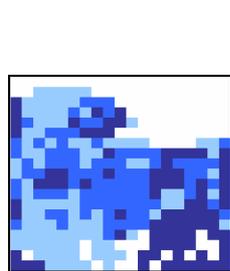
Dynamischer Ansatz

Farbkodierung für die abgebildete Belegungsdichte

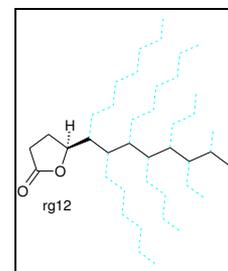
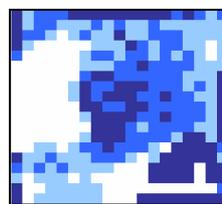
-  (weiß): keine Datenpunkte
-  (hellblau): 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron
-  (mittelblau): 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron
-  (dunkelblau): mehr als 10 Datenpunkte pro Neuron



Belegungsdichte Map, Training mit **sd12** und **rg12**



Bel.dichte Map Referenzmolekül 1, **sd12**



Bel.dichte Map Referenzmolekül 2, **rg12**

Abbildung 3.47: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die Leitstrukturen des dynamischen Ansatzes

3.3.2.6. Vorhersage von Geruchsschwellenwerten mittels Partial Least Square Regression

Die erhaltenen Kohonen Maps zeigen bei kürzer werdender Seitenkette eine zunehmende Anzahl an weißen, d.h. unbelegten Neuronen. Unbelegte Neuronen, die bei den Referenzmolekülen belegt sind, sind wichtig für die Ausprägung eines pfirsichartigen Geruchs. Darüber hinaus geben, wie in Kapitel 3.3.1.2.3 anhand mono- und bicyclischer Lactone mit kokosnusssartiger Geruchsqualität bereits erläutert, Bereiche maximaler Differenz oder Unähnlichkeit der betrachteten Moleküle lediglich Aufschluss über räumliche Bereiche, in denen sich die betrachteten Moleküle unterscheiden. Um herauszufinden, welche dieser strukturellen Unterschiede sich auf die geruchlichen Eigenschaften der Moleküle auswirken, müssen die Geruchsschwellenwerte, die in den Vergleichsstudien mittels Neuronaler Netze nicht einbezogen worden sind, ebenfalls berücksichtigt werden. Dies erfolgt mit einer abschließenden Partial Least Square (PLS) Regression mittels Unscrambler 7.5 zur Vorhersage der Geruchsschwellenwerte. Die Belegungsdichte der Neuronen 0-360 gehen als x-Variablen in die Berechnung ein. Der Geruchsschwellenwert [Tabelle 3.2 und 3.3] stellt die vorherzusagende y-Variable dar. Aus den Faktoren für die einzelnen Variablen lässt sich ihr Einfluss auf die Ausprägung eines besonders niedrigen Geruchsschwellenwertes ableiten. Eine Erläuterung des statistischen Prinzips findet sich in Kapitel 2.4.2 dieser Arbeit.

3.3.2.6.1. Modelle zur Vorhersage von Geruchsschwellenwerten für die Geruchsqualität pfirsichartig; Korrelation zwischen vorhergesagtem und tatsächlichem Geruchsschwellenwert;

a) Dynamischer Ansatz

Vorhersagemodell D1:

Datensatz: 16 Lactone, Nr. 35-38 und 42-45 gemäß **Tabelle 3.3**

16 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,87 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,79 | Achsabschnitt: 0,70 | q^2 : 0,54 |

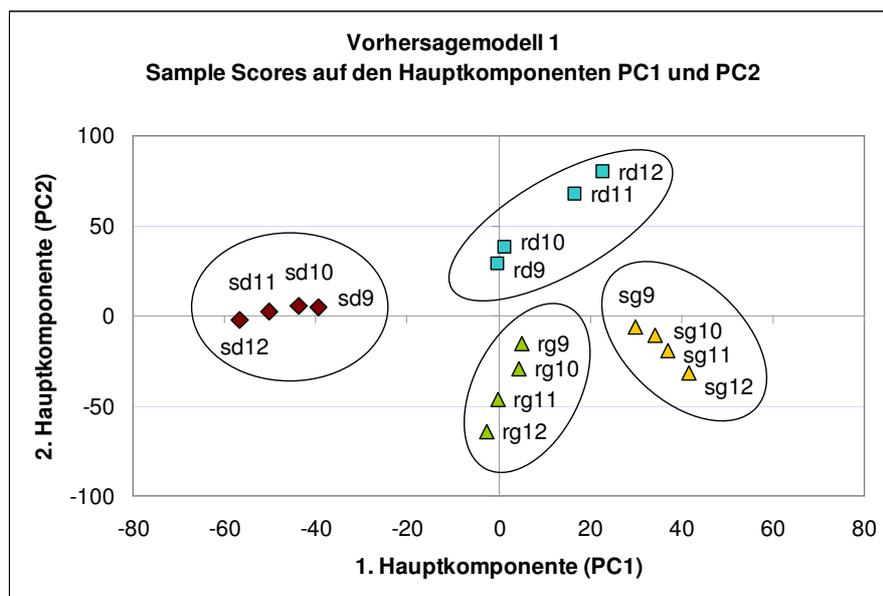


Abbildung 3.48: Sample Scores auf PC1 und PC2 für 16 Lactone nach **Vorhersagemodell D1**, Diskriminierung der Lactone einsprechend ihrer Ringkonfiguration (γ , δ , R, S)

Vorhersagemodell D2:

Datensatz: 11 Lactone, Nr. 36-38, 44, 45 und S- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.3**

11 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,95 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,87 | Achsabschnitt: 0,07 | q^2 : 0,76 |

Vorhersagemodell D3:

Datensatz: 11 Lactone, Nr. 36-38, 44, 45 und S- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.3**

5 Hauptkomponenten und 66 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,99 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,97 | Achsabschnitt: 0,07 | q^2 : 0,85 |

b) Nichtdynamischer Ansatz**Vorhersagemodell N1**Datensatz: 16 Lactone, Nr. 35-38 und 42-45 gemäß **Tabelle 3.3**16 Lactone, 16 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,62 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,22 | Achsabschnitt: 0,58 | q^2 : -0,12 |

Abbildung 3.56: Sample Scores auf PC1 und PC2 für 16 Lactone nach **Vorhersagemodell N1**, Diskriminierung der Lactone einsprechend ihrer Ringkonfiguration (γ , δ , R, S)

Vorhersagemodell N2:Datensatz: 11 Lactone, Nr. 36-38, 44, 45 und S- δ -Decalacton gemäß **Tabelle 3.3**11 Hauptkomponenten und 361 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,99 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,96 | Achsabschnitt: 0,04 | q^2 : 0,74 |

Vorhersagemodell N3:11 Lactone, 4 Hauptkomponenten und 78 x-Variablen (Neuronen)

| | | | |
|----------------------------|----------------|---------------------|--------------|
| Kalibrierung: | Steigung: 1,00 | Achsabschnitt: 0,00 | r^2 : 0,99 |
| Leave-one-out-Validierung: | Steigung: 0,91 | Achsabschnitt: 0,04 | q^2 : 0,80 |

3.3.2.7. Diskussion der Vorhersagemodelle

Unter Berücksichtigung aller 16 monocyclischen Lactone sowie aller 361 Neuronen werden für den dynamischen, als auch für den nichtdynamischen Ansatz γ - und δ -Lactone sowie R- und S-Enantiomere bereits auf PC1 und PC2 diskriminiert, wie am Beispiel des dynamischen Ansatzes in **Abbildung 3.55** dargestellt. Die Vorhersagemodelle sind mit $r^2=0,87$ und $q^2=0,54$ für den dynamischen Ansatz (**D1**) und $r^2=0,63$ und $q^2=0,12$ für den nichtdynamische Ansatz (**N1**) nur von mäßiger bis schlechter Güte. Die Korrelation wird erheblich verbessert durch Beschränkung auf diejenigen 11 Lactone, die pfirsichartige Geruchsqualität aufweisen (**Vorhersagemodelle D2** und **N2**). Des Weiteren kann die Güte des Modells verbessert werden durch Optimierung der Anzahl der Hauptkomponenten auf 9, sowie eine Einschränkung auf diejenigen Neuronen, die den größten Einfluss auf den jeweiligen Hauptkomponenten besitzen. Neuronen, die einen geringen Einfluss auf den jeweiligen Hauptkomponenten besitzen tragen keine signifikante Information und können daher weggelassen werden. Durch sukzessives Weglassen "unwichtiger" Neuronen lassen sich so diejenigen molekularen Bereiche identifizieren, die für die Ausprägung eines pfirsichartigen Geruchs verantwortlich sind.

Die **Vorhersagemodelle D3** und **N3** zeigen mit $r^2=0,99$ und $q^2=0,85$ (**D3**) und $r^2=0,99$ und $q^2=0,80$ (**N3**) eine hervorragende Güte für die Kalibrierung und Validierung. Im Folgenden sind die berechneten und gemessenen Geruchsschwellenwerte für den dynamischen und nichtdynamischen Ansatz gegenübergestellt.

| Lacton | Geruchsschwellenwert [ng/l Luft] | | |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------|------------|
| | Measured | Calibration | Validation |
| S- δ -Dodecalacton (SD12) | 0,40 | 0,35 | 0,42 |
| S- δ -Undecalacton (SD11) | 0,80 | 0,82 | 0,93 |
| S- δ -Decalacton (SD10) | 2,00 | 2,26 | 2,07 |
| R- δ -Dodecalacton (RD12) | 12,50 | 11,14 | 21,23 |
| R- δ -Undecalacton (RD11) | 59,98 | 71,29 | 25,88 |
| R- γ -Dodecalacton (RG12) | 0,80 | 0,66 | 0,58 |
| R- γ -Undecalacton (RG11) | 0,80 | 1,45 | 2,90 |
| R- γ -Decalacton (RG10) | 12,50 | 8,43 | 1,70 |
| S- γ -Dodecalacton (SG12) | 6,00 | 6,79 | 4,32 |
| S- γ -Undecalacton (SG11) | 4,50 | 4,24 | 5,96 |
| S- γ -Decalacton (SG10) | 12,50 | 10,96 | 10,42 |

Tabelle 3.9 Vorhersage der Geruchsschwellenwerte gemäß **Vorhersagemodell D3**

OTV (Measured): gemessener Geruchsschwellenwert

OTV (Calibration): berechneter Geruchsschwellenwert aus der Kalibrierung

OTV (Validation): berechneter Geruchsschwellenwert nach der Leave-one-out Validierung#

| Lacton | Geruchsschwellenwert [ng/l Luft] | | |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------|------------|
| | Measured | Calibration | Validation |
| S- δ -Dodecalacton (SD12) | 0,4 | 0,3 | 0,8 |
| S- δ -Undecalacton (SD11) | 0,8 | 0,8 | 1,0 |
| S- δ -Decalacton (SD10) | 2,0 | 2,4 | 2,7 |
| R- δ -Dodecalacton (RD12) | 12,5 | 17,4 | 63,4 |
| R- δ -Undecalacton (RD11) | 60,0 | 41,0 | 14,6 |
| R- γ -Dodecalacton (RG12) | 0,8 | 0,6 | 0,7 |
| R- γ -Undecalacton (RG11) | 0,8 | 1,0 | 2,1 |
| R- γ -Decalacton (RG10) | 12,5 | 13,6 | 5,5 |
| S- γ -Dodecalacton (SG12) | 6,0 | 7,9 | 1,9 |
| S- γ -Undecalacton (SG11) | 4,5 | 4,3 | 8,8 |
| S- γ -Decalacton (SG10) | 12,5 | 8,9 | 6,1 |

Tabelle 3.10 Vorhersage der Geruchsschwellenwerte gemäß **Vorhersagemodell N3**

Measured: gemessener Geruchsschwellenwert

Calibration: berechneter Geruchsschwellenwert aus der Kalibrierung

Validation: berechneter Geruchsschwellenwert nach der Leave-one-out Validierung

Die berechneten Geruchsschwellenwerte für alle 11 Lactone stimmen sowohl für die Kalibrierung als auch für die Validierung sehr gut mit den gemessenen Daten überein. Trotz der geringen Anzahl an Datenpunkten (11) wirkt sich ein Weglassen eines Moleküls innerhalb der homologen Reihe von monocyclischen Lactonen nur geringfügig auf die Güte der Vorhersage aus, so dass die Validierungsdaten nur geringfügig von der Kalibrierung abweichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vorhersagemodelle mit beiden Ansätzen sich in ihrer Güte und Aussagekraft nicht signifikant unterscheiden. Dies bestätigt, dass die Berücksichtigung dynamischer Strukturen zur Entwicklung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Lactonen nicht erforderlich ist. Eine Beschränkung auf die energetisch günstigsten Konformationen hat in diesem Fall die gleiche Aussagekraft bei erheblich reduziertem Rechenaufwand.

4. Zusammenfassung

Analog zum computergestützten Wirkstoffdesign in der Pharmaforschung würde die Vorhersage der Geruchsschwellenwerten von Aromastoffen in eine zielgerichtetere Synthese neuer Aromastoffe erlauben.

Zur Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen von Lactonen wurden die geruchlichen Eigenschaften von insgesamt insgesamt 62 Lactonen systematisch charakterisiert, darunter die acht Stereoisomeren von 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon, den entsprechenden 16 gesättigten Derivaten (3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon) und zahlreichen weiteren mono- und bicyclischen Lactonen.

Soweit nicht kommerziell erhältlich wurden die Lactone enantioselektiv synthetisiert und ihre Geruchsschwellenwerte mittels chiraler GC/Olfaktometrie bestimmt. Die meisten Lactone wiesen entweder einen kokosnussartigen oder einen pfirsichartigen Geruch auf. Die Geruchsschwellenwerte wurden von insgesamt fünf Prüfern bestätigt.

Die niedrigsten Geruchsschwellenwerte für kokosnussartigen Geruch wurden für die Verbindungen (3S,3aS,6R,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (**2a1**, $2 \cdot 10^{-6}$ ng/l Luft), (3S,3aS,6S,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (**2a2**, $7 \cdot 10^{-6}$ ng/l Luft) und (3S,3aS,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (**1a**, $1 \cdot 10^{-5}$ ng/l Luft) bestimmt. S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton hatten die niedrigsten Geruchsschwellenwerte (< 1 ng/l Luft) für pfirsichartigen Geruch. Eine Überlagerung dieser Moleküle wurde jeweils als Referenz für kokosnussartigen bzw. pfirsichartigen Geruch eingesetzt.

Zur Untersuchung von Struktur Geruchsbeziehungen wurden die energetisch günstigsten Konformere der Verbindungen, ihre Moleküloberfläche und das elektrostatische Potential als charakteristischer Oberflächeneigenschaft berechnet. Anschließend wurden Neuronale Netze nach Kohonen und Partial Least Square Regression zur Entwicklung eines Vorhersagemodells für kokosnussartigen und pfirsichartigen Geruch sowie zur Identifizierung wichtiger molekularer Bereiche eingesetzt.

Vorhersagemodell K2, das für einen Datensatz aus 42 Lactonen mit kokosnussartigem Geruch entwickelt wurde, zeigte mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2=0,97$ für die Kalibrierung und $q^2=0,70$ für die Validierung eine gute Korrelation und lieferte gute Übereinstimmung zwischen theoretisch berechneten und gemessenen Geruchsschwellenwerten. Die gute Übereinstimmung bestätigt die Validität des Modells bzw. der gewählten Leitstruktur zur Definition eines maximalen Rezeptorraums als Bedingung für kokosnussartigen Geruch.

Im Weiteren wurde am Beispiel von Lactonen mit pfirsichartigem Geruch eine Studie durchgeführt, die die Ergebnisse energieminimierter und dynamischer Studien vergleicht. Dazu wurden dynamische Strukturen der betreffenden Moleküle durch Überlagerung aller Konformere, die sich nicht um mehr als 1 kcal/mol von der energetisch günstigsten Struktur unterscheiden, überlagert. Beide Datensätze wurden der gleichen Berechnungsprozedur mittels Neuronaler Netze nach Kohonen und Partial Least Square Regression unterworfen. Beide Datensätze lieferten Vorhersagemodelle mit sehr guter Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Geruchsschwellenwerten. Die resultierenden Vorhersagemodelle für den dynamischen ($r^2=0,99$; $q^2=0,85$) und den nichtdynamischen Ansatz ($r^2=0,99$; $q^2=0,80$) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Güte der Korrelation und Vorhersage. Dies bestätigt, dass der Einsatz energieminimierter Strukturen in diesem Fall zur Vereinfachung von Berechnungen von Struktur-Geruchsbeziehungen zulässig ist.

5. Experimenteller Teil

5.1 Referenzsubstanzen und sonstige Chemikalien

Die folgenden kommerziell erhältlichen Lactone wurden als Referenzsubstanzen eingesetzt. Alle weiteren Chemikalien wurden bezogen von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und wiesen mindestens Analysenqualität ("pro analysi") auf.

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| γ -Hexalacton | Geschenk von Silesia, 3.600.1750 |
| γ -Heptalacton | Sigma Aldrich, W 25, 390-1 |
| γ -Octalacton | Sigma Aldrich, W 27, 960-9 |
| γ -Nonalacton | Sigma Aldrich, 29,237-0 |
| γ -Decalacton | Sigma Aldrich, D 80-4 |
| γ -Undecalacton | Sigma Aldrich, W 30,910-9 |
| γ -Dodecalacton | Geschenk von Silesia 3.600.1700 |
| δ -Hexalacton | Sigma Aldrich, W31,670-9 |
| δ -Heptalacton | Roth, 3062.1 |
| δ -Octalacton | Roth, 9436.1 |
| δ -Nonalacton | Sigma Aldrich, W 33560-6 |
| δ -Decalacton | Sigma Aldrich, 29,806-9 |
| δ -Undecalacton | Sigma Aldrich, W 32,940-1 |
| δ -Dodecalacton | Geschenk von Silesia, 3.600.1100 |
| δ -Tetradecalacton | Fluka, 87170 |
| Mintlacton | Sigma Aldrich, W 37,641-8 |
| R-2-Decen-5-olid | Fluka, 30665 |
| S-2-Decen-5-olid | Fluka, 30667 |
| R-4-Nonanolid | Fluka, 74313 |
| R-5-Decanolid | Fluka, 30622 |
| S-5-Decanolid | Fluka, 30624 |
| S-4-Undecanolid | Fluka, 94088 |
| S-4-Dodecanolid | Fluka, 44118 |
| R-5-Dodecanolid | Fluka, 44119 |
| R-5-Dodecanolid | Fluka, 44120 |

5.2 Verwendete Abkürzungen für die Referenzsubstanzen

Für die Referenzsubstanzen wurden die in den Tabellen 5.1 bis 5.5 aufgelisteten Abkürzungen verwendet.

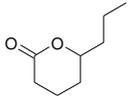
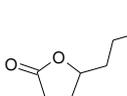
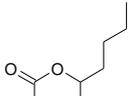
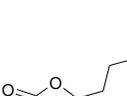
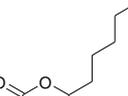
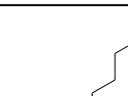
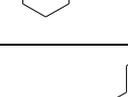
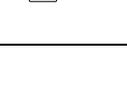
| Abkürzung | Formel | Bezeichnung | Abkürzung | Formel | Bezeichnung |
|------------------|---|-----------------------------------|------------------|---|-----------------------------------|
| RD8/SD8 |  | (R,S)- δ - Octalacton | RG8/SG8 |  | (R,S)- γ - Octalacton |
| RD9/SD9 |  | (R,S)- δ - Nonalacton | RG9/SG9 |  | (R,S)- γ - Nonalacton |
| RD10/SD10 |  | (R,S)- δ - Decalacton | RG10/SG10 |  | (R,S)- γ - Decalacton |
| RD11/SD11 |  | (R,S)- δ - Undecalacton | RG11/SG11 |  | (R,S)- γ - Undecalacton |
| RD12/SD12 |  | (R,S)- δ - Dodecalacton | RG12/SG12 |  | (R,S)- γ - Dodecalacton |

Tabelle 5.1: Monocyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig und pfirsichartig.

| Abkürzung | Formel | Bezeichnung |
|-----------|--------|---|
| 1a | | (3S,3aS,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1b | | (3R,3aR,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1c | | (3R,3aS,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1d | | (3S,3aR,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1e | | (3S,3aS,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1f | | (3R,3aR,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1g | | (3R,3aS,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 1h | | (3S,3aR,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon |

Tabelle 5.2: Ungesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig (**1a-h**)

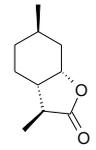
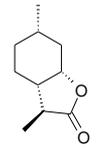
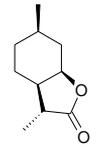
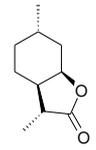
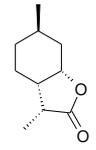
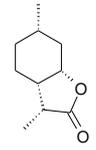
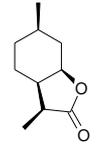
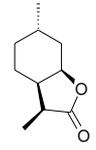
| Abkürzung | Formel | Bezeichnung |
|------------|---|---|
| 2a1 |  | (3S,3aS,6R,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2a2 |  | (3S,3aS,6S,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2b1 |  | (3R,3aR,6R,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2b2 |  | (3R,3aR,6S,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2c1 |  | (3R,3aS,6R,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2c2 |  | (3R,3aS,6S,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2d1 |  | (3S,3aR,6R,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2d2 |  | (3S,3aR,6S,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |

Tabelle 5.3: Gesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig (**2a₁₋₂**-**2d₁₋₂**)

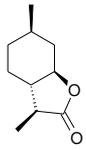
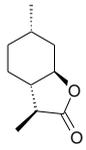
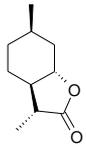
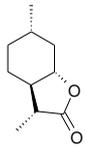
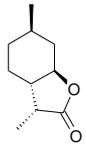
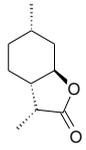
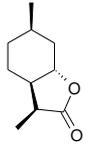
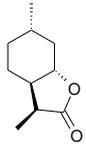
| Abkürzung | Formel | Bezeichnung |
|------------|---|---|
| 2e1 |  | (3S,3aS,6R,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2e2 |  | (3S,3aS,6S,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2f1 |  | (3R,3aR,6R,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2f2 |  | (3R,3aR,6S,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2g1 |  | (3R,3aS,6R,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2g2 |  | (3R,3aS,6S,7aS)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2h1 |  | (3S,3aR,6R,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |
| 2h2 |  | (3S,3aR,6S,7aR)-3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon |

Tabelle 5.4: Gesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig (**2e₁₋₂**-**2h₁₋₂**)

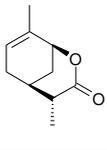
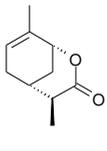
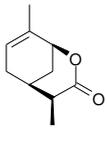
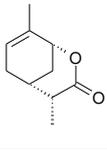
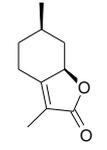
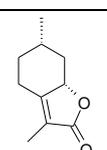
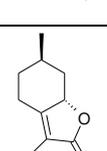
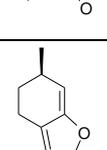
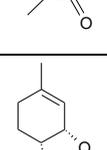
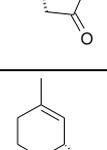
| Abkürzung | Formel | Bezeichnung |
|---------------------|---|--|
| 3a |  | 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7 -en-3-on |
| 3b |  | 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7 -en-3-on |
| 3c |  | 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7 -en-3-on |
| 3d |  | 4,8-Dimethyl-2-oxabicyclo [3.3.1] non-7 -en-3-on |
| 4a (mint) |  | Mintlacton |
| 4b (e-mint) |  | Enantiomer des Mintlacton (E-Mintlacton) |
| 5 (iso-mint) |  | Iso-Mintlacton |
| 6 (DH-mint) |  | Dehydromintlacton |
| 7 |  | 3a,4,5,7a-Tetrahydro-6-methyl-2(3H) benzofuranon |
| 8 |  | 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3-ethyl-6-methyl-2(3H) benzofuranon |

Tabelle 5.5: Weitere bicyclische Lactone unterschiedlicher Geruchsqualität (3a-d, 4a-b, 5-8)

5.3. Chromatographische Systeme

Zur chromatographischen Aufreinigung, Trennung und Identifizierung der Lactone sowie zur Bestimmung ihrer Geruchsschwellenwerte wurden die folgenden chromatographischen Systeme eingesetzt.

5.3.1 GC / MS

| | |
|------------------------|--|
| GC: | Hewlett Packard HP 5890 Serie II |
| MSD: | Hewlett Packard HP 5971 A, EI Modus; 70 eV; Transfer line: 280 ° C, Ionenquelle 220°C |
| Injektor: | On-Column, oven track on |
| Säulenvordruck: | Helium 5.0; Flußrate 0,99 ml/min |
| Trennsäule 1: | DB-FFAP; J&W Scientific |
| Stationäre Phase: | Modifizierte Polyethylenglykolphase, partiell verestert mit Nitroterephthalsäure |
| Säulendimensionen: | 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm d _f |
| Temperaturprogramm: | 35°C (1 min) - 40°C/min-60°C (0 min) - 8°C/min-240°C (5 min) |
| Trennsäule 2: | DB 5; J&W Scientific |
| Stationäre Phase: | (5% Phenyl)-methylpolysiloxan |
| Säulendimensionen: | 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm d _f |
| Temperaturprogramm: | 35°C (1 min) - 40°C/min-60°C (0 min) - 8°C/min-280°C (5 min) |

| | |
|----------------------|--|
| Trennsäule 3: | BGB 174; BGB Analytik GmbH |
| Stationäre Phase: | 50% 2,3-Diacetyl-6-tert-butyldimethylsilyl- β -cyclodextrin gelöst in BGB 1701 (14% Cyanopropylphenylpolysiloxan, 86% Methylpolysiloxan) |
| Säulendimensionen: | 30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m d_f |
| Temperaturprogramm: | 35°C (1 min) - 40°C/min-100°C (0 min) - 8°C/min-150°C (0 min) - 2°C/min-280°C (5min) |
| Trennsäule 4: | Lipodex E; Macherey-Nagel |
| Stationäre Phase: | Octakis-(2,6-di-O-pentyl-3-O-butyryl) - γ -cyclodextrin |
| Säulendimensionen: | 25 m x 0,25 mm, 0,25 μ m d_f |
| Temperaturprogramm: | 35°C (1 min) - 40°C/min-60°C (0 min) - 5°C/min-220°C (10 min) |
| Vorsäule: | 1 m x 0,53 mm unbelegte, methyldesaktivierte Vorsäule |
| Nachsäule: | 2 m x 0,25 mm unbelegte, methyldesaktivierte Nachsäule |

Die angegebenen Temperaturprogramme stellen typische Temperaturprogramme dar, die je nach Notwendigkeit an das jeweilige Trennproblem angepasst wurden. Beispielchromatogramme finden sich im Anhang dieser Arbeit.

5.3.2. GC /FID und GC/Olfaktometrie

GC: Carlo Erba 8000 Top

Injektor: Cool-on-column

Detektor: FID; 250°C

Sniff Port: 220°C

Stationäre Phasen: wie unter 5.3.1, zusätzlich je 1 m unbelegte methyldesaktivierte Nachsäule für 1:1 Splitting zum FID und Sniff-Port

Temperaturprogramme: wie unter 5.3.1

Gase:

- Trärgas:** Helium 5.0
- Säulenvordruck:** 80 kPa He für DB-FFAP und DB 5
150 kPa für BGB 174 und Lipodex E
- Brenngase:** Wasserstoff 5.0, 50 kPa
Luft (Gasgenerator) 100 kPa
- MU Gas:** Stickstoff (Gasgenerator)
FID: 80 kPa, Sniff-Port: 90 kPa

5.3.3. HPLC zur präparativen Aufreinigung:

| | |
|-------------------------------|---|
| HPLC: | Merck La Chrom L7100/L7400 |
| Pumpe: | LaChrom Merck Hitachi L7110 |
| UV-Detektor: | La Chrom Merck Hitachi ... |
| Trennsäule: | Lichrospher [®] , 2 x 250 mm Länge, 4 mm Innendurchmesser, Si 60, 50 µm Partikelgröße |
| Eluent: | Pentan/Diethylether (60+40 v/v, isokratisch) |
| Fließgeschwindigkeit: | 2 ml/min (Druck: 112 mbar) |
| Injektionsvolumen: | 20 µl (analytisch); 100 µl (präparativ) |
| Detektionswellenlänge: | 215 nm |

5.3.4. Flash Chromatographie zur präparativen Aufreinigung

| | |
|------------------------------|--|
| Trennsäule: | Merck System Superformance Säule, wassergekühlt 31 cm Länge, 16 mm Innendurchmesser |
| Pumpe: | LC Kontron 414-T |
| Füllmaterial: | Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm |
| Fließmittel: | Pentan/Diethylether (80+20 v/v, 70+30 v/v und 60/40 v/v) |
| Fließgeschwindigkeit: | 9,9 ml/min |

5.4. Kernresonanzspektrometrie

Die Aufnahme der NMR Spektren erfolgte in der Organischen Chemie der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal mit einem ARX 400 Spektrometer der Firma Bruker. Die Zuordnung der NMR-Signale der ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT und COSY-Spektren steht im Einklang mit veröffentlichten Daten [Gaudin, 2000].

5.5. Software

Die folgenden Softwareprogramme wurden zur Berechnung theoretischer Struktur Geruchsbeziehungen eingesetzt

- **Hyperchem 5.01** (Hypercube, Gainesville, Florida, USA)
- **WinMoPac 97** (Mopac 97, Fujitsu, Chiba, Japan)
- **IRIS Explorer 3.5** (NAG, Oxford, UK)
- **Gaussian98** (Gaussian Inc, Wallingford, Connecticut, USA)
- **Neural Connection 2.0** (Recognition Systems Inc, SPSS Science, Erkrath, Germany)
- **Unscrambler 7.5** (CAMO Computer Aided Modelling A/S, Trondheim, Norway)
- **gOpenMol** (CSC Scientific Computing Ltd., Espoo, Finnland)

5.6. Berechnung dreidimensionaler Molekülmodelle mittels Hyperchem 5.0

5.6.1. Moleküldynamiksimulation in Hyperchem 5.0

Zur Berechnung der energetisch günstigsten Konformation der betreffenden Moleküle wird zunächst eine Moleküldynamiksimulation durchgeführt. Diese berücksichtigt nicht nur die potentielle, sondern auch die kinetische Energie des Moleküls. Ausgehend von einer Startgeometrie wird die Bewegung des Moleküls im Vakuum bei einer Simulationstemperatur 1000 K in 0.001 ps Schritten über einen Zeitraum von 10 ps simuliert. Die energetisch günstigste Konformation aus dieser Berechnung dient als Startgeometrie für den nächsten Berechnungsschritt.

5.6.2. Konformationssuche in Hyperchem 5.0

Der nächste Berechnungsschritt ist eine Konformationssuche nach dem Monte Carlo Prinzip. Hierbei werden definierte Torsionswinkel nach dem Zufallsprinzip geändert und die jeweils erzeugte Startgeometrie dient als Ausgangspunkt für eine Energieminimierung. Die folgenden Bedingungen wurden für die Konformationssuchen gewählt.

Setup ranges:

Number of simultaneous variations: 1-8

Range for acyclic torsion variation: 60-180°

Range for cyclic torsion flexing: 30-120°

Search Method:

Initial Conformations: Usage directed

Acceptance Energy Criterion: 6(2) kcal/mol above best

Test Options for Search:

Pre-Optimisation Checks

Skip if atoms are closer than 0.5 Å

Skip if torsions within 15° of previous

Post-Optimisation Check

Discard if chiral centers change

Duplication Tests:

Consider structures to be duplicates if

Energy within 0.5 kcal/mol

RMS error within 0.25 Å

Ignore hydrogens in RMS fit

Use equivalent atom orders

Random Number Seed:

Random Number Generation

From the computer's clock

Limits for Search

Termination after 100.000 iterations or 1000 optimisations

Don't keep more than 1000 conformations

5.6.3. Kraftfeldminimierung

Die erhaltenen Molekülkonformationen wurden einer MM+ Kraftfeldminimierung unterworfen. Das Kraftfeld MM+ ist ein "all atom"-Kraftfeld für organische Moleküle, und stellt eine Weiterentwicklung des MM2 Kraftfelds dar.

5.7. Berechnung von Moleküloberflächen mittels WinMopac97

Die Berechnung des elektrostatischen Potentials der Moleküloberfläche erfolgt mit dem Softwareprogramm WinMopac97. Es wird eine Conolly-Oberfläche im zweifachen van-der-Waals Radius der jeweiligen Atome und mit einer Punktdichte von 10 Punkten pro Å berechnet. Die Berechnung des elektrostatischen Potentials an jedem dieser Oberflächenpunkte erfolgt nach dem Orozco Luque Modell mittels der semiempirischen Methode AM1. Die numerische Information wird exportiert und als Input für weitere statistische Berechnungen mittels Kohonen Neural Networks und Partial Least Square Regression verwendet [Vgl. Kapitel 5.9 und 5.10].

5.8 Berechnung von Moleküloberflächen und Rückprojektionen mit IRIS Explorer 3.5

IRIS Explorer 3.5 ist ein Softwarepaket zur Visualisierung von 3D-Grafiken, in diesem Fall dreidimensionalen Molekülmodellen. In der Arbeitsfläche werden verschiedene Module wie zu einer so genannten Operational Map verbunden. Jedes Modul wird über ein eigenes Steuerungsmenü kontrolliert. Die folgende **Abbildung 5.1** zeigt eine Operational Map, die zur Erzeugung von Moleküloberflächen dient. **Abbildung 5.2** zeigt eine Operational Map, die zur Rückprojektion von Oberflächendaten auf die Moleküloberfläche und deren graphischer Darstellung dient. Es folgt eine Auflistung der Module und ihrer Funktionen.

5.8.1. Operational Maps

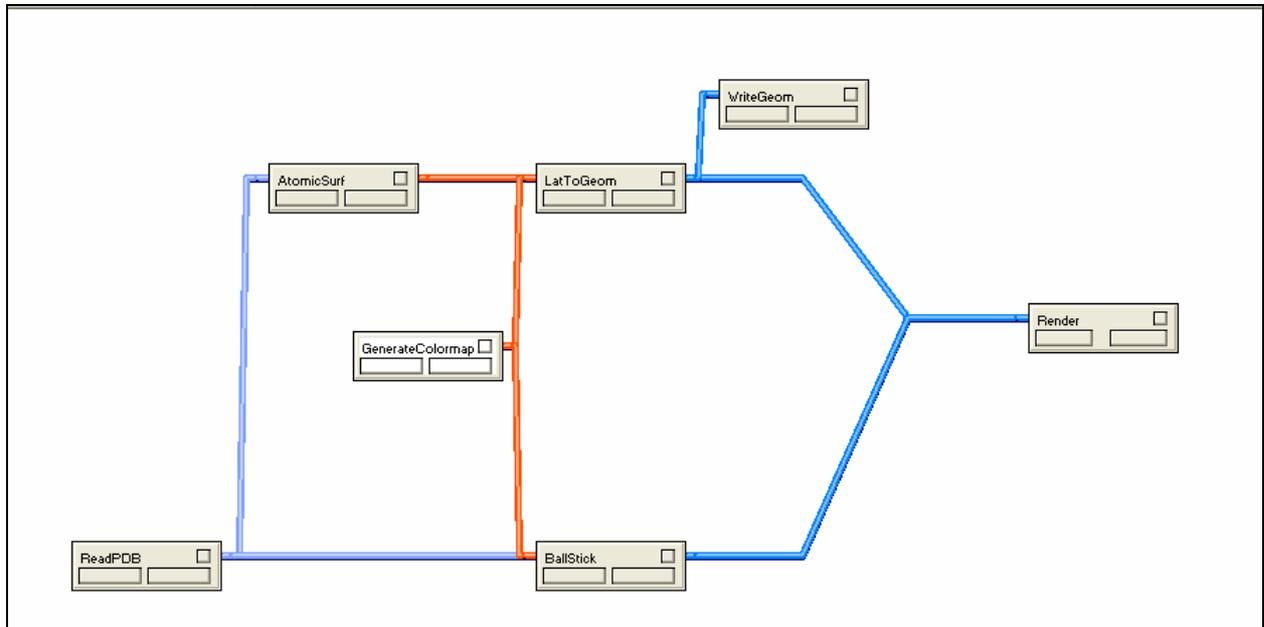


Abbildung 5.1: Operational Map zur Erzeugung von Moleküloberflächen in IRIS Explorer

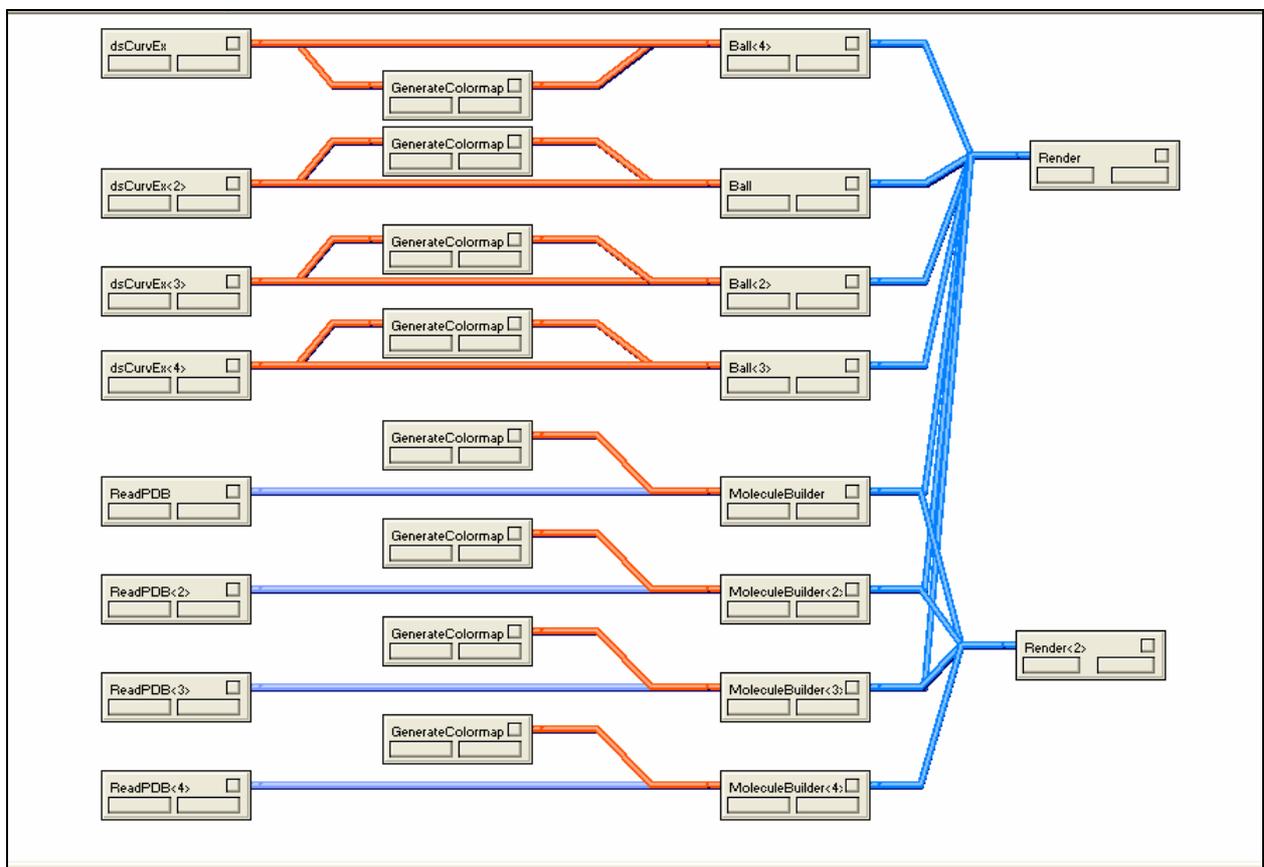


Abbildung 5.2: Operational Map zur Rückprojektion von Oberflächendatenpunkten auf die Moleküloberfläche

5.8.2. Verwendete Module:

AtomicSurf

Dieses Modul implementiert das QPCE (Quantum Chemistry Program Exchange #544) Programm USURF und dient zur schnellen Generierung einer Connolly Oberfläche. Es benötigt ein Molekül als Eingabe und produziert eine Liste von Punkten im dreidimensionalen Raum, welche die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des Moleküls repräsentiert. Diese Oberfläche wird berechnet indem eine Kugelsonde über das Molekül gerollt wird. Je nach Kugelradius ergibt sich eine mehr oder weniger detaillierte Oberfläche. Ein Kugelsondenradius von 1.5 entspricht einem Wassermolekül. Hier wurde ein Kugelsondenradius von 0.5 gewählt, um eine möglichst detaillierte Oberfläche zu erhalten. Die Punktdichte wurde mit 2.7 bis 4.5 für jede Studie so angepasst, dass die für die Weiterverarbeitung der Daten mittels Neural Connection 2.0 maximale Anzahl von 5.000 Punkten für Referenz- und Testmolekül nicht überschritten wird.

Ball

Dieses Modul generiert farbige Kugeln aus einer numerischen Eingabe. An jedem Koordinatenpunkt wird jeweils eine Kugel platziert. Die Größe der Kugeln ist entweder eine Funktion einer Eigenschaft and diesem Punkt oder wie hier eine Konstante.

BallStick

Dieses Modul erzeugt eine so genannte "Ball and Stick" Darstellung eines Moleküls. Bindungen zylinder- und Atome kugelförmig dargestellt. Wenn der Kugelradius größer ist als 0.5 werden keine Bindungen generiert und es resultiert ein Kalottenmodell des Moleküls.

dsCurveEx

Mit diesem Modul können x,y,z-Koordinaten eines Moleküls aus einem Textfile festgelegter Struktur.

GenerateColormap

Mittels dieses Moduls können die Farben für die graphische Darstellung bearbeitet werden.

LatToGeom

Dieses Modul generiert eine geometrische Darstellung eines Gitters und wird in Anschluss an das Modul AtomicSurf benutzt.

Molecule Builder

Dieses Modul kann zum Bearbeiten von Molekülen verwendet werden. Hier dient es lediglich zur Erzeugung einer Moleküldarstellung aus einem PDB-File, das mittels des ReadPDB Moduls eingelesen und im Render Modul dargestellt wird.

ReadPDB

Render

Das Rendermodul dient zur graphischen Darstellung der berechneten dreidimensionalen Molekülmodelle und Oberflächen. Daten aus verschiedenen Eingabemodulen können in einem Rendermodul gleichzeitig verarbeitet und dargestellt werden.

WriteGeom

Dieses Modul schreibt geometrische Daten in ein Textfile, welches die numerische Information, auf der die graphische Darstellung beruht, enthält.

5.9. Oberflächenvergleich mittels Neural Connection 2.0

Zur Durchführung einer Ähnlichkeitsstudie mittels eines neuronalen Netzwerkes nach Kohonen in Neural Connection 2.0 werden auf der Arbeitsfläche des Programms ein Inputmodul ein Kohonenmodul und ein Textausgabemodul ausgewählt und miteinander verbunden.



Abbildung 5.3: Anordnung der verwendeten Module in Neural Connection 2.0

5.9.1. Vorbereitung der Eingabedaten

Der Input für das neuronale Netzwerk wird für ein Referenzmolekül mit einer Anzahl von n Oberflächenpunkten und einem Testmolekül mit x Oberflächenpunkten wie folgt in einer Excel 95 Datei organisiert. Für jedes Molekül wird eine separate Datei erstellt.

Single Template Approach

Zeile 1 bis n : Koordinaten des Referenzmoleküls (Leitstruktur)

Zeile $n+1$ bis $n+x$: Koordinaten des Testmoleküls

Multiple Template Approach

Zeile 1 bis x : Koordinaten der Testmoleküle

Zeilen $x+1$ bis $x+n$: Koordinaten des Referenzmoleküls (Leitstruktur)

5.9.2. Datenimport

Die Eingabedaten werden mittels des Inputmoduls importiert und folgende Bedingungen für die Datenzuweisung (Data Allocation) festgelegt:

File Order: Sequential

Data Blocking: None

Data Sets:

Training: # Anzahl der Oberflächenpunkte des Referenzmoleküls

Validation: # 0

Test: # Anzahl der Oberflächenpunkte des Testmoleküls

Not used: # 0

Total: 100 %

Assignment: Random, Seed 5, Test records at end

5.9.3. Kohonen Netzwerk:

Für das Kohonen Netzwerk wurden folgende Einstellungen gewählt.

Input Layer:

Normalisation: None

Kohonen Layer:

Euclidian Distance Error Response

Dimension 19 x 19

Learning Rate 0.01-0.2

Decay 0.1

Neighbourhood Size 1.0-5.0

Neighbourhood Decay Rate 1.0

Output Function: VQ Codebook

Models: Single Model Network

Weights: Random Seed 100

Optimisation: Double Network Size every 100 data samples

Stop When: Total Epochs 10

Für Learning Rate und Neighbourhood Size ist eine separate Optimierung für jeden Datensatz erforderlich.

Textausgabe

Data Set: Test

Column Delimiter: Spaces

Destination: Output to File

Fileformat:

Date, Record Number, Input Field und Network Output ausgewählt.

5.10. Vorhersage von Geruchsschwellenwerten mittels Unscrambler 7.5

Die untersuchten Lactone gingen als Proben in die Berechnung einer Partial Least Square Regression (PLS1) mittels Unscrambler 7.5 ein. Als unabhängige Variablen dienten die Belegungsdichten der 361 Neuronen, die als Ausgabe der Berechnung mittels Neural Connection erhalten wurden. Konstante Variablen, das heißt Belegungsdichten, die für alle Moleküle des Datensatzes gleich sind, wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Abhängige und vorherzusagende Variable ist der Logarithmus des Geruchsschwellenwerts. **Abbildung 5.4** zeigt zur Veranschaulichung die tabellarische Organisation der Eingabedaten. Die Validierung der Regression erfolgte mittels Crossvalidierung. Die Anzahl der Hauptkomponenten und die Auswahl der wichtigsten Variablen wurde entsprechend dem Datensatz schrittweise optimiert und ist ausführlich in **Kapitel 3.3.1.3-4** erläutert.

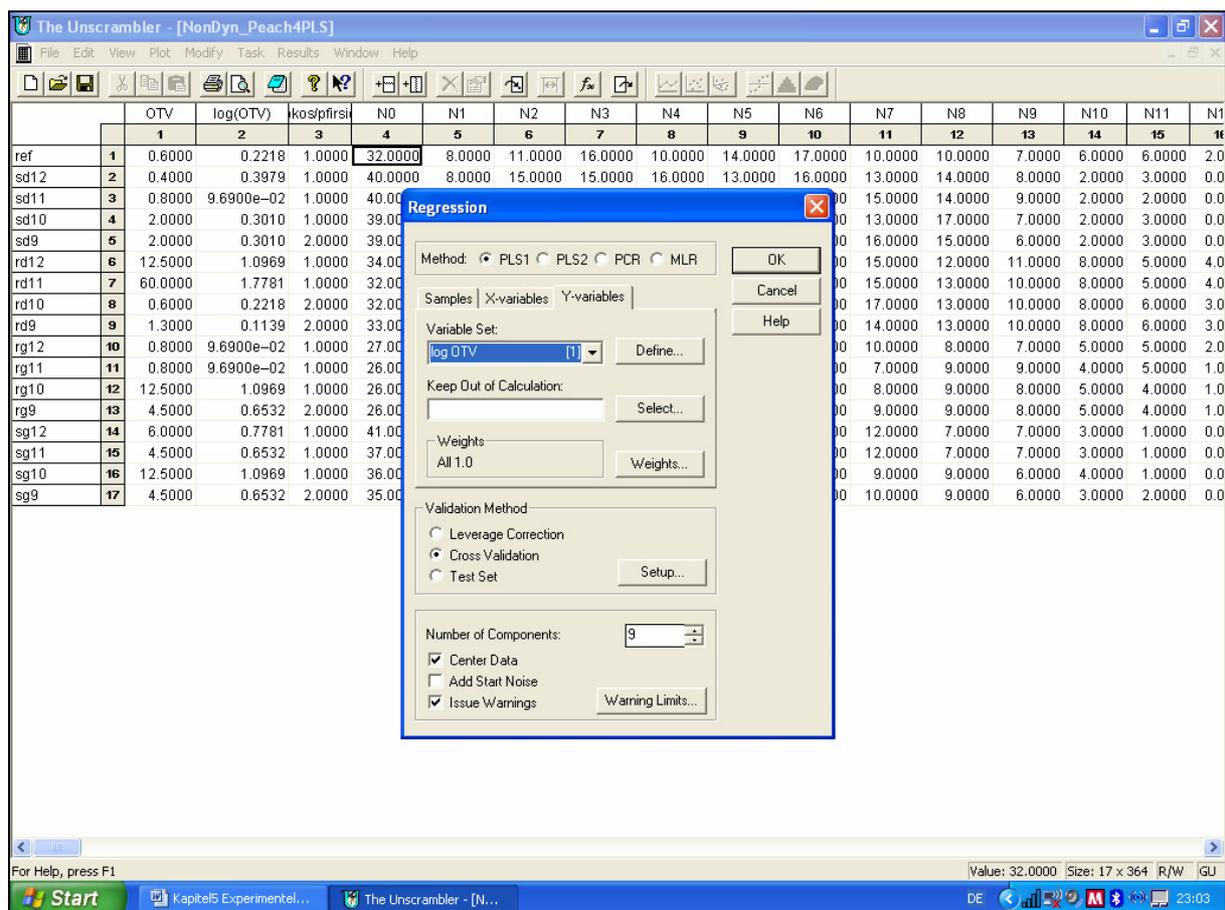


Abbildung 5.4: Dateneingabe in Unscrambler 7.5 zur Durchführung einer Partial Least Square Regression.

5.11. Synthesen und Analysendaten

5.11.1. 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2 (3H)-benzofuranon (1a-h)

Die Synthese der acht Stereoisomeren (1a-h) des 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2 (3H)-benzofuranon erfolgte für die Stereoisomere **1a**, **1c**, **1e** und **1g** nach dem in **Abbildung 5.4** dargestellten Syntheschema und den Arbeitsvorschriften **A1** bis **A7** nach Guth [Guth, 1996]. Die Synthese der Stereoisomeren 1b, 1d, 1f und 1h erfolgte analog hierzu ausgehend von S-Limonen statt R-Limonen. Spezifische Analysendaten (Retentionsindizes an DB5 und FFAP, Massen- und NMR-Spektren) stimmen weitestgehend überein mit den nach Guth [Guth, 1996] veröffentlichten Daten.

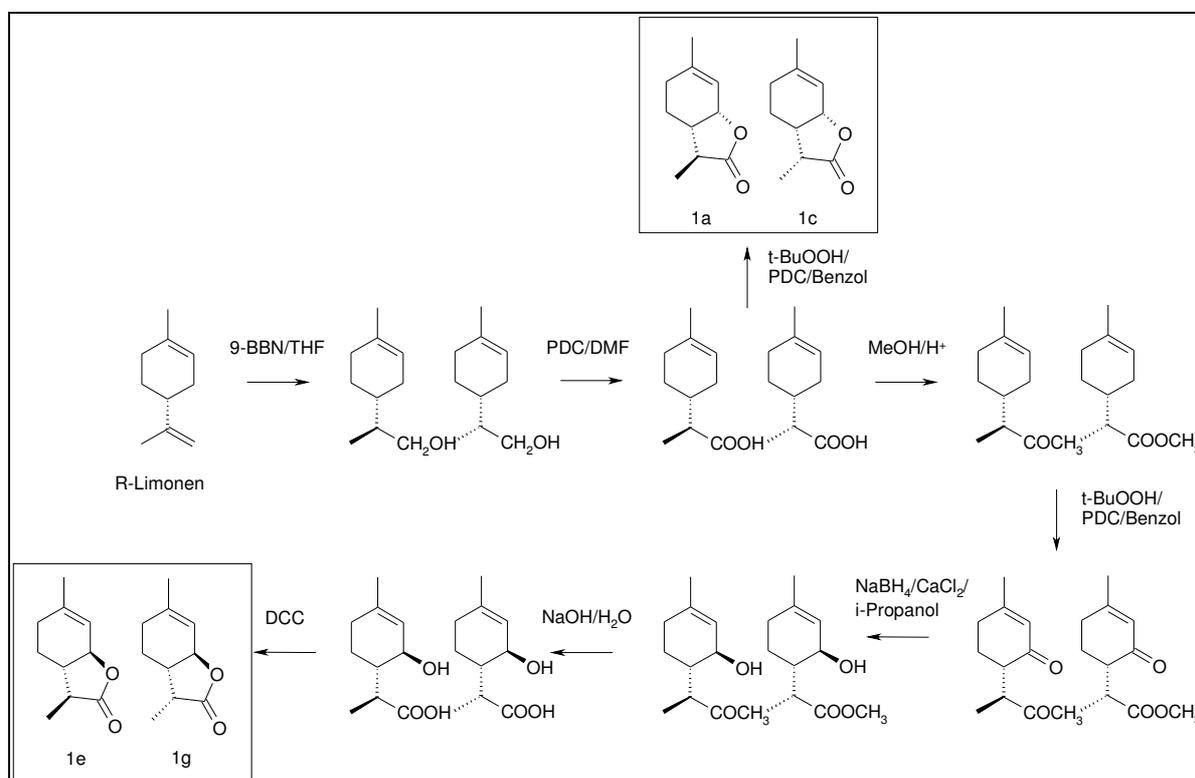


Abbildung 5.5: Reaktionsschema zur enantioselektiven Synthese der bicyclischen Lactone **1a**, **1c**, **1e** und **1g**.

5.11.2. 3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a₁₋₂-2h₁₋₂)

Die Synthese der 16 Stereoisomere des 3,6-Dimethyl-3a,4,5,6,7a-hexahydro-2(3H)-benzofuranon (2a₁₋₂-2h₁₋₂) erfolgt gemäß Abbildung 5.5 sowie Arbeitsvorschrift A 8 durch Rhodiumkatalysierte Hydrierung ihrer ungesättigten Analoga und anschließende Aufreinigung mittels HPLC. Es folgt eine Zusammenstellung ihrer spezifischen Analysendaten.

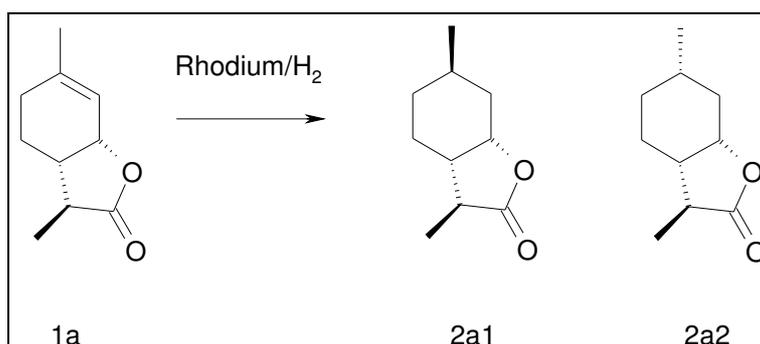


Abbildung 5.6 Rhodiumkatalysierte Hydrierung von Weinlacton **1a**.

5.11.3. Stereoisomere 2a1 und 2b2

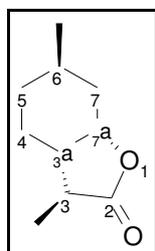


Abbildung 5.7: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel Lacton **2a1**

Retentionsindizes

| | | |
|----------------|----------------|------------------------|
| RI (DB-FFAP) | 2a1/2b2 | 2118 |
| RI (BGB 174) | 2a1: | 1710; 2b2: 1730 |
| RI (Lipodex E) | 2a1: | 1864; 2b2: 1852 |

MS (EI) von 2a1/2b2

| | |
|---------|---|
| m/z (%) | 168 (0,3); 167 (1); 124 (1); 109 (27); 83 (6); 96 (23); 95 (100) ; 93 (5); 83 (6); 82 (38); 81 (58); 79 (9); 69 (27); 68 (37); 67 (56); 56 (4); 55 (25); 54 (6); 53 (10) |
|---------|---|

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz; **2a1 in CD_2Cl_2 [ppm])**

δ [ppm] 0,92 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$, $J = 6,5$ Hz, nicht aufgelöst von H-C(5)); 1,24 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(3)$, $J = 7,6$ Hz); 1,27 (m, H-C(4) und H-C(7)); 1,80 (m, H-C(6), H'-C(4), H'-C(5)); 1,95 (m, 1H, H-C(3a)); 2,16 (m, 1H, H'-C(7)); 2,34 (q, 1H, H-C(3)); 4,65 (m, 1H, H-C(7a))

 $^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz; **2a1 in D_2O [ppm])**

δ [ppm] 0,88 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$, $J = 6,6$ Hz) 0,95 (m, 1H, H-C(5)); 1,14 (m, 1H, H-C(4)); 1,24 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(3)$, $J = 7,6$ Hz); 1,34 (m, 1H, H-C(7)); 1,54 (m, H-C(6), H'-C(4), H'-C(5)); 1,82 (m, 1H, (H-C(3a)); 2,08 (m, 1H, H'-C(7)); 2,46 (q, 1H, H-C(3)); 4,89 (m, 1H, H-C(7a))

 $^{13}\text{C-NMR}$ und DEPT(400,13 MHz; **2a1 in CD_2Cl_2 [ppm])**

δ [ppm] 13,98 ($\text{CH}_3\text{-C}(3)$); 21,28 ($\text{CH}_3\text{-C}(6)$) 26,18 (C(6)); 27,34 (C(4)); 31,65 (C(5)); 35,99 (C(7)); 41,33 (C(3a)); 44,11 (C(3)); 77,44 (O-C(7a)); 182 (C(2)=O)

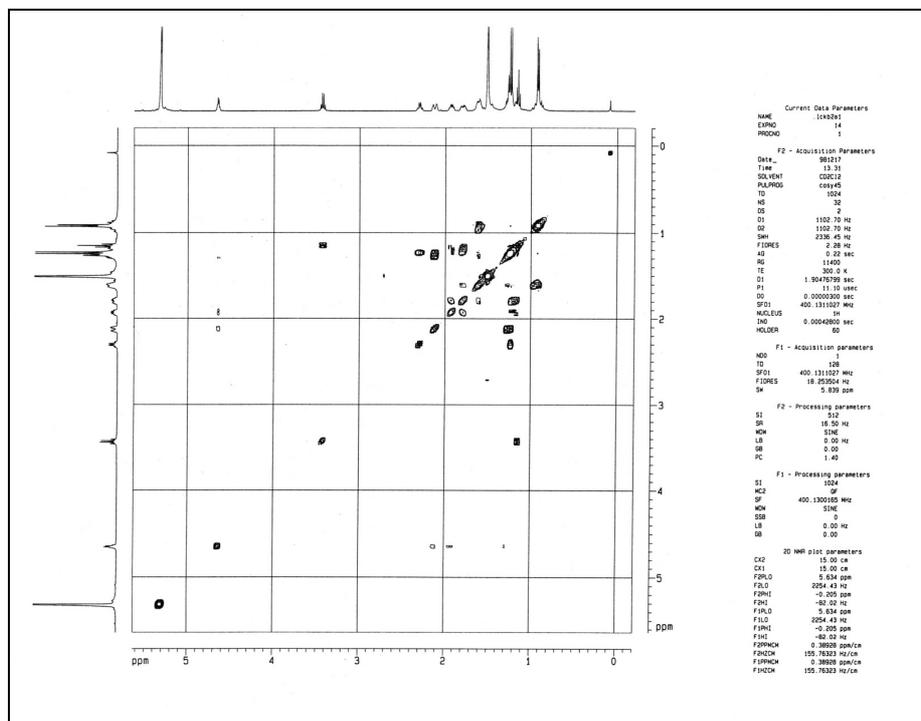
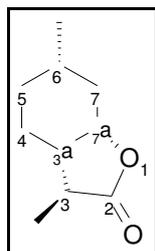
 $^1\text{H-COSY}$ (400,13 MHz, **2a1 in CD_2Cl_2 [ppm])**

Abbildung 5.8: $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **2a1** in CD_2Cl_2

5.11.4 Stereoisomere 2a2 und 2b1

Abbildung 5.9: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2a2**

Retentionsindizes

| | | |
|-----------------------|----------------|------------------------|
| RI (DB-FFAP) | 2a2/2b1 | 2171 |
| RI (BGB 174) | 2a2: | 1772; 2b1: 1767 |
| RI (Lipodex E) | 2a2: | 1965; 2b1: 1965 |

MS (EI) von 2a2/2b1

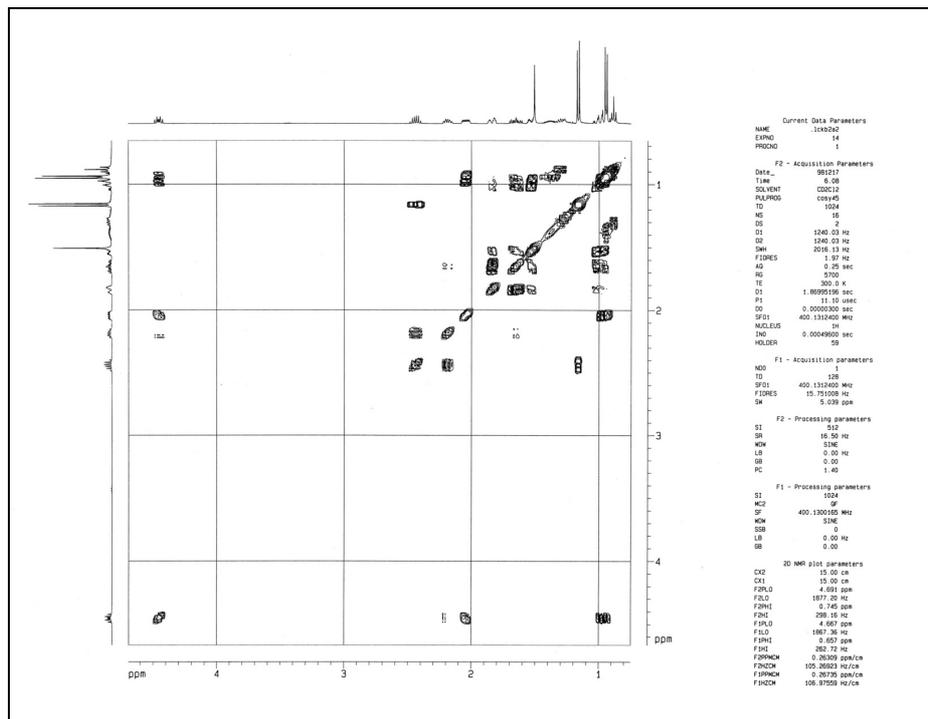
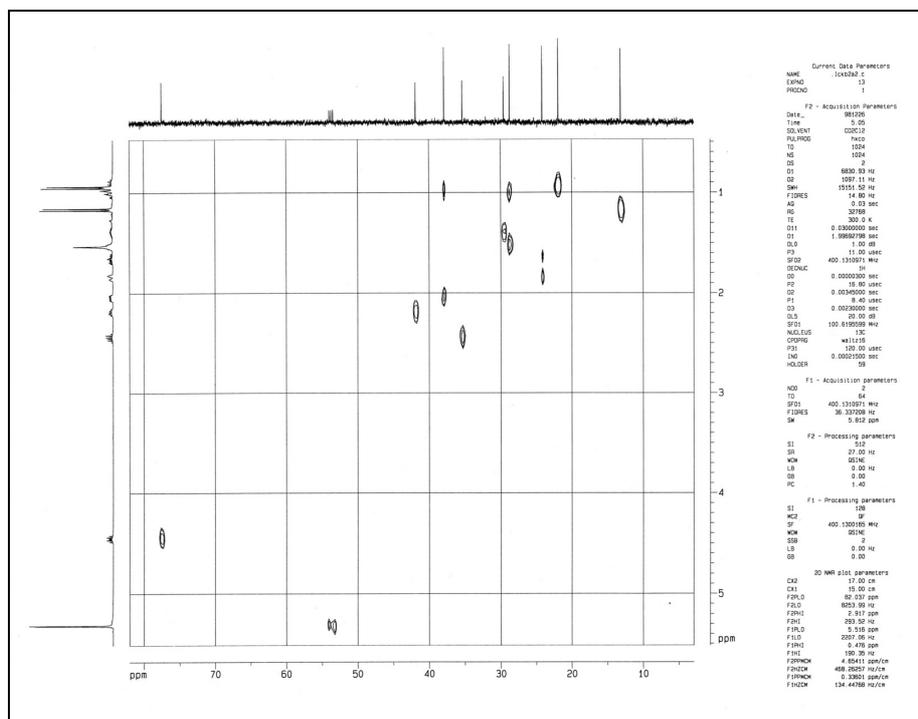
| | |
|---------|---|
| m/z (%) | 168 (0,1); 124 (4); 109 (22); 96 (10); 95 (44); 93 (4); 83 (6); 82 (27); 81 (100) ; 80 (12); 79 (11); 69 (21); 68 (29); 67 (70); 56 (7); 55 (36); 54 (9); 53 (20) |
|---------|---|

¹H-NMR (400,13 MHz; 2a2 in CD₂Cl₂ [ppm])

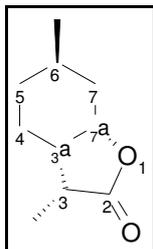
| | |
|---------|--|
| δ [ppm] | 0,88 (m, 2H, H-C(5) und H-C(7)); 0,94 (d, 3H, CH ₃ -C(6), J = 6,5 Hz); 1,16 (d, 3H, CH ₃ -C(3), J = 6,8 Hz); 1,38 (m, 1H, H-C(6)); 1,50 (s, H ₂ O); 1,54 (m, 1H, H'-C(5)); 1,66 (m, 1H, H-C(4)); 1,84 (m, 1H, H'-C(4)); 2,04 (m, 1H, H'-C(7)); 2,19 (m, 1H, H-C(3a)); 2,44 (m, 1H, H-C(3), J = 6,8 Hz); 4,45 (m, 1H, H-C(7a)) |
|---------|--|

¹³C-NMR und DEPT (400,13 MHz; 2a2 in CD₂Cl₂ [ppm])

| | |
|---------|---|
| δ [ppm] | 13,36 (CH ₃ -C(3)); 22,12 (CH ₃ -C(6)); 24,36 (C(4)); 28,97 (C(5)); 29,81 (C(6)); 35,56 (C(3)); 38,13 (C(7)); 42,11 (C(3a)); 77,72 (O-C(7a)); 179,67 (C(2)=O) |
|---------|---|

^1H -COSY (400,13 MHz, 2a2 in CD_2Cl_2 [ppm])Abbildung 5.10: ^1H -COSY Spektrum von Lacton **2a2** in CD_2Cl_2 **CH-Korrelation (400,13 MHz, 2a2 in CD_2Cl_2 [ppm])**Abbildung 5.11: CH-Korrelationsspektrum von **2a2** in CD_2Cl_2

5.11.5. Stereoisomere 2c1 und 2d2

Abbildung 5.12: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2c1**

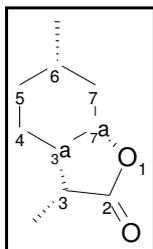
Retentionsindizes

| | | |
|-----------------------|-------------------------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 2c1/2d2 | 2168 |
| RI (BGB 174) | 2c1: 1696; 2d2: | 1709 |
| RI (Lipodex E) | 2c1: 1877; 2d2: | 1853 |

MS (EI) von 2c1/2d2

m/z (%) 168 (<0,1); 124 (7); 109 (15); 96 (17); **95 (92)**; 93 (6); 83 (6); 82 (47); 81 (51);
79 (10); 69 (32); 68 (67); **67 (100)**; 56 (9); 55 (50); 54 (12); 53 (21)

5.11.6. Stereoisomere 2c2 und 2d1

Abbildung 5.13: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2c2**

Retentionsindizes

| | | |
|-----------------------|-------------------------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 2c2/2d1 | 2219 |
| RI (BGB 174) | 2c2: 1738; 2d1: | 1731 |
| RI (Lipodex E) | 2c2: 1911; 2d1: | 1908 |

MS (EI) von 2c2/2d1:

m/z (%) 168 (<0,1); 167 (<0,1); 124 (9); 109 (21); 96 (23); **95 (100)**; 93 (7); 83 (7); 82 (36); 81 (53); 79 (16); 69 (22); 68 (39); 67 (84); 56 (8); 55 (49); 54 (14); 53 (28)

5.11.7. Stereoisomere 2e1 und 2f2

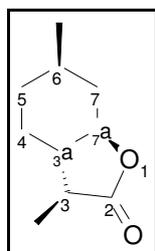


Abbildung 5.14: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2e1**

Retentionsindizes

| | | |
|-----------------------|------------------------------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 2e1/2f2 | 2104 |
| RI (BGB 174) | 2e1: 1723; 2f2: 1725 | |
| RI (Lipodex E) | 2e1: 1874; 2f2: 1875 | |

MS (EI) von 2e1 und 2f2

m/z (%) 168 (<0,1); 167 (<0,2); 124 (1); 109 (10); 96 (3); 95 (16); 93 (2); 83 (3); 82 (21); **81 (100)**; 80 (11); 79 (7); 69 (18); 68 (29); 67 (69); 56 (4); 55 (26); 54 (6); 53 (11)

¹H-NMR (400,13 MHz; 2e1 in CD₂Cl₂ [ppm])

δ [ppm] 1,01 (d, 3H, CH₃-C(6), J = 6,6 Hz); 1,17 (d, 3H, CH₃-C(3), J = 6,9 Hz); 1,19 (d, 1H, H-C(5), J = 11,4); 1,23 (d, 1H, H-C(7), J = 3,5 Hz); 1,26 (d, 1H, H-C(4), J = 3,0 Hz); 1,44 (m, 1H, H-C(3a)); 1,50 (s, H₂O); 1,62 (m, 1H, H'-C(5)); 1,80 (dd, 1H, H-C(6)); 2,21 (m, 2 x 1H, H-C(3), H'-C(7), nicht aufgelöst); 3,73 (m; 1H (7a))

^{13}C -NMR und DEPT (400,13 MHz; 2e1 in CD_2Cl_2 [ppm])

δ [ppm] 12,64 ($\text{CH}_3\text{-C(3)}$); 22,11 ($\text{CH}_3\text{-C(6)}$); 26,97 (C(4)); 31,79 (C(6)); 34,56 (C(5));
38,69 (C(7)); 41,67 (C(3)); 51,81 (C(3a)); 82,71 (O-C(7a)); 179,62 (C(2)=O)

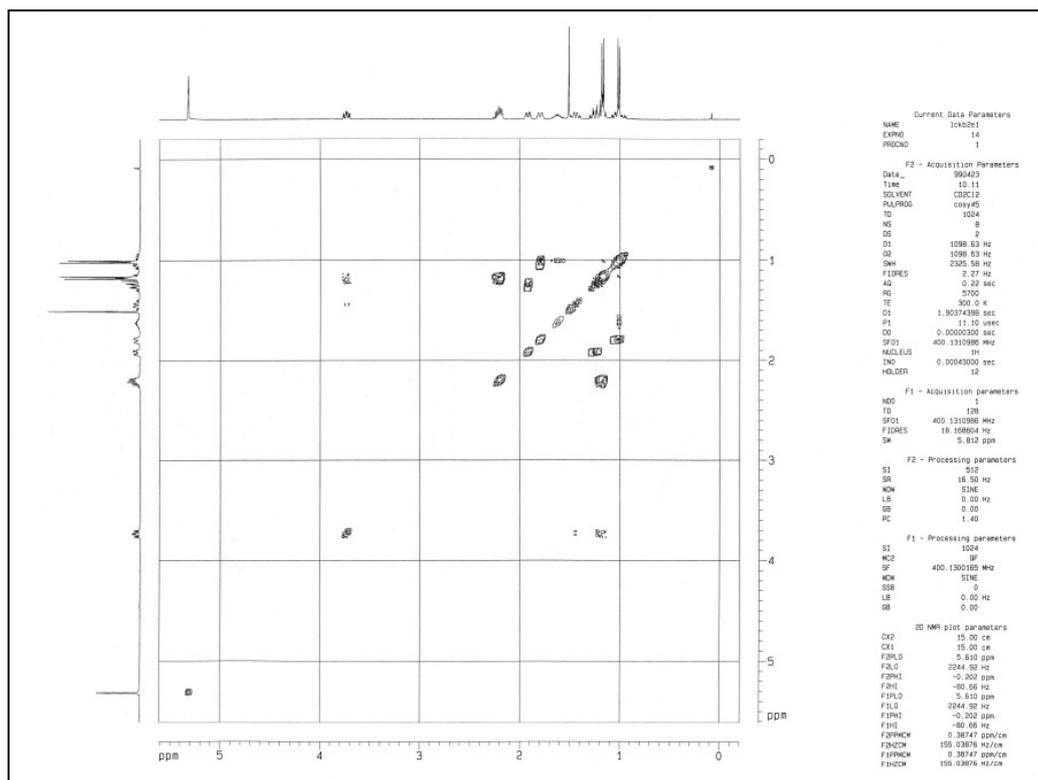
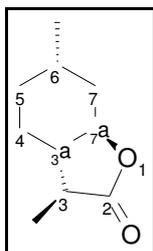
 ^1H -COSY (400,13 MHz, 2e1 in CD_2Cl_2 [ppm])

Abbildung 5.15: ^1H -COSY Spektrum von Lacton **2e1** in CD_2Cl_2

5.11.8. Stereoisomere 2e2 und 2f1

Abbildung 5.16: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2e2**

Retentionsindizes

| | | |
|-----------------------|-------------------------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 2e2/2f1 | 2150 |
| RI (BGB 174) | 2e2: 1748; 2f1: | 1734 |
| RI (Lipodex E) | 2e2: 1922; 2f1: | 1922 |

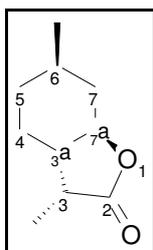
MS (EI) von 2e2/2f1

m/z (%) 168 (<0,1); 124 (1); 109 (6); 96 (3); 95 (14); 93 (1); 83 (4); 92 (19); **81 (100)**;
80 (10); 79 (8); 69 (18); 68 (31); 67 (67); 56 (5); 55 (30); 54 (6); 53 (11)

¹H-NMR (400,13 MHz; 2e2 in CD₂Cl₂ [ppm])

δ [ppm] 1,07 (d, 3H, CH₃-C(6), J = 7,5 Hz); 1,18 (d, 3H, CH₃-C(3), J = 7,0 Hz); 1,20 (d, 1H, H-C(4), J = 6,9); 1,43 (m, H-C(3a), überlappt mit H₂O-Signal); 1,50 (s, H₂O); 1,61 (m, 1H, H-C(5); J = 4,0 Hz); 1,66 (d, 1H; J = 5,2 Hz); 1,69 (d, 1H, J = 5,3 Hz); 1,78 (m, 1H, H-C(4)); 2,03 (dd, 1H, H-C(7), J = 11,2Hz); 2,26 (m, 2H, H-C(6) und H-C(3), J = 6,5); 3,96 (m, 1H, H-C(7a))

5.11.9. Stereoisomere 2g1 und 2h2

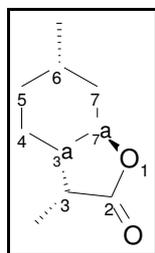
Abbildung 5.17: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2g1**

Retentionsindizes

| | | |
|-----------------------|-------------------------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 2g1/2h2 | 2212 |
| RI (BGB 174) | 2g1: 1825; 2h2: | n.n. |
| RI (Lipodex E) | 2g1: 1967; 2h2: | n.n. |

MS (EI) von 2g1/2h2

m/z (%) 168 (<0,1); 110 (5); 109 (9); 96 (11); 95 (23); 83 (7); 82 (16); **81 (100)**; 80 (9); 73 (16); 72 (12); 69 (23); 68 (37); 67 (74); 59 (32); 58 (15); 56 (5); 55 (33); 54 (4); 53 (9)

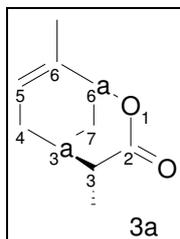
5.11.10 Stereoisomere 2g2 und 2h1**Abbildung 5.18:** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2g2****Retentionsindizes**

| | | |
|-----------------------|-------------------------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 2g2/2h1 | 2182 |
| RI (BGB 174) | 2g2: 1844; 2h1: | n.n. |
| RI (Lipodex E) | 2g2: 1974; 2h1: | n.n. |

MS (EI) von 2g2/2h1

m/z (%) 168 (<0,1); 124 (4); 109 (11); 96 (4); 95 (20); 89 (12); 83 (5); 82 (25); **81 (100)**; 80 (14); 79 (8); 73 (10); 69 (33); 68 (29); 67 (56); 59 (6); 58 (9); 56 (6); 55 (24); 54 (6); 53 (9)

5.11.11. Bicyclen 3a und 3b

Abbildung 5.19: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **3a**

Retentionsindizes:

| | | |
|--------------|-------------|------|
| RI (DB-FFAP) | 3a/b | 2161 |
|--------------|-------------|------|

MS (EI) von 3a/b

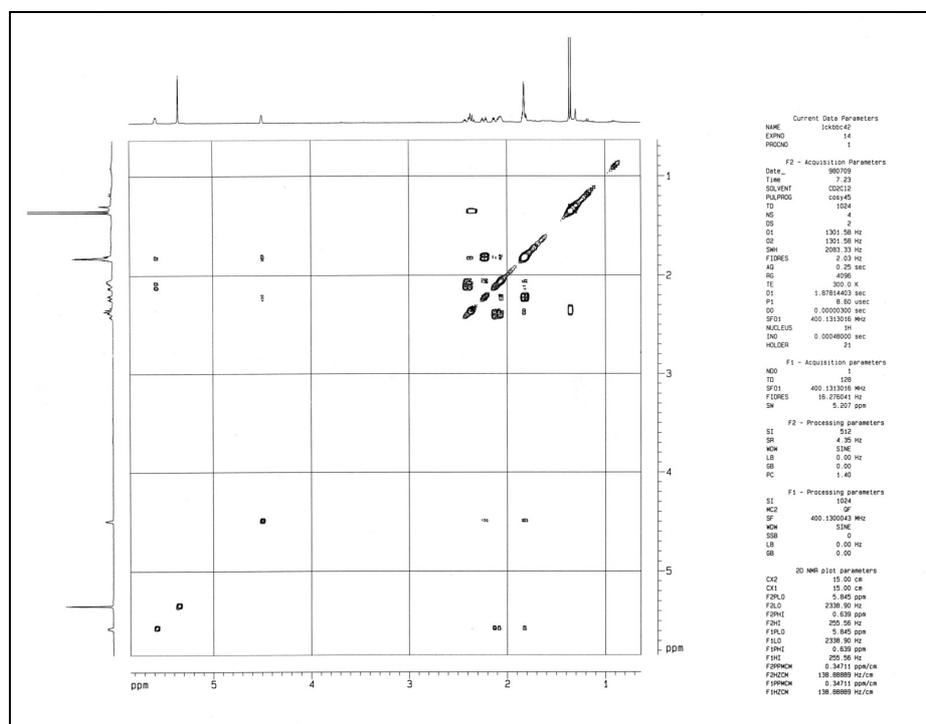
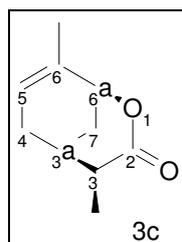
| | |
|---------|---|
| (m/z) % | 166 (3), 122 (13), 107 (26), 105 (5), 94 (20), 93 (100) , 91 (43), 81 (7), 80 (12), 79 (38), 77 (28), 68 (4), 67 (7), 65 (14), 55 (14), 54 (6), 53 (14) |
|---------|---|

¹H-NMR (400,13 MHz; 3b in CD₂Cl₂ [ppm])

| | |
|---------|--|
| δ [ppm] | 1,36 (d, 3H, CH ₃ -C(3), J = 7,6 Hz); 1,82 (m, 1H, H-C(7)); 1,83 (m, 3H, CH ₃ -C(6)); 2,08 (m, 1H, H-C(4)); 2,13 (m, 1H, H'-C(4)); 2,23 (m, 1H, H'-C(7)); 2,35 (m, 1H, H-C(3), J = 7,6 Hz); 2,38 (m, 1H, H-C(3a)); 4,50 (m, 1H, H-C(6a)); 5,57 (m, 1H, H-C(5)) |
|---------|--|

¹³C-NMR und DEPT (400,13 MHz; 3b in CD₂Cl₂ [ppm])

| | |
|---------|---|
| δ [ppm] | 15,37 (CH ₃ -C(3)); 20,55 (C-C(3)); 27,01 (CH ₂ , Verunreinigung); 31,42 (CH ₂ , Verunreinigung); 32,10 (CH ₃ -C(6)); 34,03 (C(7)); 42,25 (C(3a)); 65,95 (C(4)); 75,26 (O-C(6a)); 123,83 (C(5)); 134,56 (C(6)); 175,75 (C(2)=O) |
|---------|---|

$^1\text{H-COSY}$ (400,13 MHz, 3b in CD_2Cl_2 [ppm])Abbildung 5.20: $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **3b** in CD_2Cl_2 **5.11.11. Bicyclen 3c und d**Abbildung 5.21: Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **3c****Retentionsindizes:**

RI (DB-FFAP) 3c/d 2175

MS (EI) von 3c/d

(m/z) % 166 (5), 122 (14), 107 (25), 94 (21), **93 (100)**, 92 (19), 91 (18), 81 (5), 80 (14),
79 (34), 77 (29), 67 (29), 66 (4), 65 (10), 55 (10), 54 (4), 53 (15)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz; 3d in CD_2Cl_2 [ppm])

δ [ppm] 1,20 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(3)$, $J = 7,2$ Hz); 1,80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C}(6)$ und $\text{H-C}(4)$); 2,05 (m, 1H, $\text{H-C}(7)$); 2,22 (m, 1H, $\text{H-C}(3a)$); 2,30 (m, 1H, $\text{H}'\text{-C}(4)$); 2,32 (m, 1H, $\text{H}'\text{-C}(7)$); 2,74 (m, 1H, $\text{H-C}(3)$, $J = 7,0$ Hz); 4,46 (m, 1H, $\text{H-C}(6a)$); 5,51 (m, 1H, $\text{H-C}(5)$)

 $^{13}\text{C-NMR}$ und DEPT (400,13 MHz; 3d in CD_2Cl_2 [ppm])

δ [ppm] 15,38 ($\text{CH}_3\text{-C}(3)$); 21,19 ($\text{C}(3a)$); 30,39 ($\text{CH}_3\text{-C}(6)$); 30,55 ($\text{C}(7)$); 39,51 ($\text{C}(3)$); 65,95 ($\text{C}(4)$); 75,26 ($\text{O-C}(6a)$); 123,01 ($\text{C}(5)$); 135,39 ($\text{C}(6)$); 176,10 ($\text{C}(2)=\text{O}$)

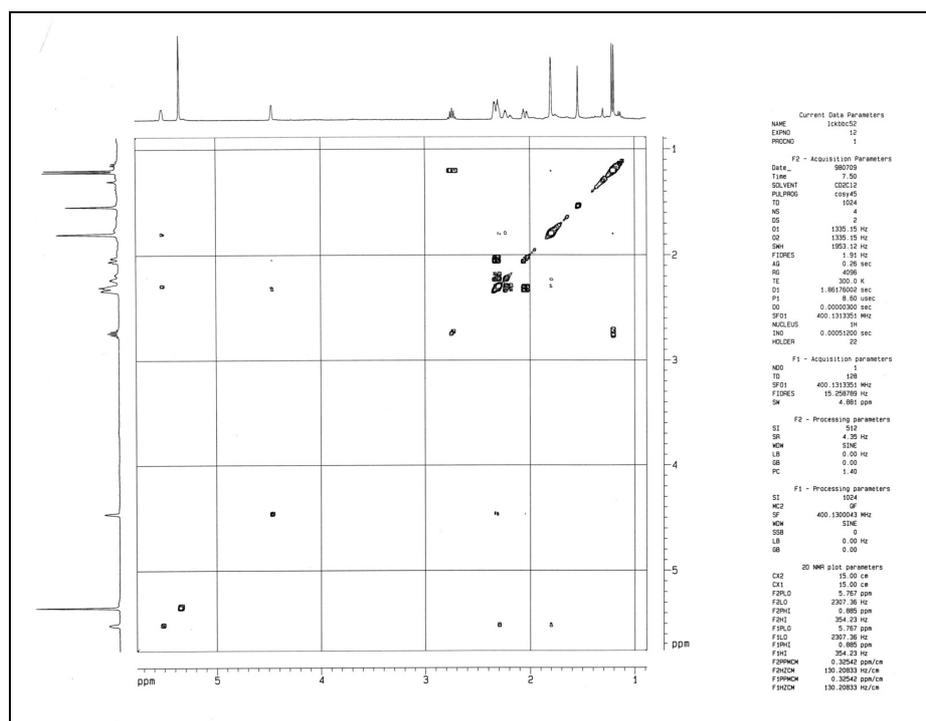
 $^1\text{H-COSY}$ (400,13 MHz, 3d in CD_2Cl_2 [ppm])

Abbildung 5.22: $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **3d** in CD_2Cl_2

6. Literatur und Internetressourcen

6.1. Literatur

Abdi, H. (2003) "Partial Least Square (PLS) Regression" in Encyclopedia of Social Sciences Research Methods, edited by Lewis-Beck, M.; Bryman, A. and Futing T.; Thousand Oaks (CA), Sage, [Internet resource: www.utdallas.edu/~herve/Abdi-PLS-pretty.pdf]

Amoore, J. E. and Buttery, R. G. (1978) "Partition Coefficients and comparative olfactometry" *Chemical Senses and Flavour* 3(1), 57-71

Amoore, J. E. (1977) "Specific Anosmia and the Concept of Primary Odors" *Chemical Senses and Flavour* 2, 267-281

Anselmi, C.; Centini, M.; Fedeli, P.; Paoli, M. L.; Segal, A.; Scesa, C. and Pelosi, P. (2000) "Unsaturated Hydrocarbons with Fruity and Floral Odours" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1285-1289

Anzali, S.; Barnickel, G.; Krug, M.; Sadowski, J.; Wagener, M.; Gasteiger, J. and Polanski, J. (1996) "The comparison of geometric and electronic properties of molecular surfaces by neural networks: Application to the analysis of corticosteroid-binding globulin activity of steroids" *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 10, 521-534

Astic, L. and Saucier, D. (2001) "Neuronal plasticity and regeneration of the olfactory system of mammals: morphological and functional recovery following olfactory bulb differentiation" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 538-545

Axel, R. (1995) "The Molecular Logic of Smell" *Scientific American* 273(4), 130-137

Bajgrowicz, J. A. and Fráter, G. (2000) "Chiral Recognition of Sandalwood Odorants" *Enantiomer* 5, 225-234

Beck, Th. and Mosandl, A. (1999) " $\gamma(\delta)$ -Thionolactones-Enantioselective Capillary GC and Sensory Characteristics of Enantiomers" *Journal of High Resolution Chromatography* 22(2), 89-92

Belitz, H. D. and Grosch, W. (1992) "Lehrbuch der Lebensmittelchemie" 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, ISBN 3-540-55449-1

Bersuker, I. B.; Dimoglo, A. S.; Gorbachov, M. Yu.; Vlad, P. F. and Pesaro, M. (1991) "Origin of Musk Fragrance Activity: The Electron-Topologic Approach" *New Journal of Chemistry* 15, 307-320

Bertrand, H.-O.; Bessis, A.-S.; Pin, J.-P. and Acher, F. (2002) "Common and Selective Molecular Determinants Involved in Metabotropic Glutamate Receptor Agonist Activity" *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 3171-3181

Boelens, M.; Boelens R. and Boelens H. (2003) "Some Aspects of Qualitative Structure-Odor Relationships" *Perfumer and Flavourist* 28(1), 36-45

Boelens, M.; Boelens R. and Boelens H. (2003) "The Search for New aroma Chemicals" *Perfumer and Flavourist* 28(2), 16-32

Böhm, H.J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. (1996) "Wirkstoffdesign" ISBN 3-8274-0012-0, Spektrum Akademischer Verlag 1996 GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford

Breer, H. (2001) "Introduction: molecular mechanism of olfaction" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 501-502

Brennan, P. A. (2001) "The vomeronasal system" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 546-555

Brown, C. B.; Knights, E. V. and Scouten, Ch. G. (1974) "Hydroboration. XXXVI. A Direct Route to 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane via the Cyclic Hydroboration of 1,5-Cyclooctadiene. 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane as a Uniquely Selective Reagent for the Hydroboration of Olefins" *Journal of the American Chemical Society* 96:25, 7765-7770

Buchbauer, G.; Klein, C. T.; Wailzer, B. and Wolschann, P. (2000) "Threshold-Based Structure-Activity Relationships of Pyrazines with Bell-Pepper Flavour" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(9), 4273-4278

Buchbauer, G.; Hilisch, A.; Mraz, K. and Wolschann, P. (1994a) "Conformational Parameters of the Sandalwood-Odor Activity: Conformational Calculations on Sandalwood Odor" *Helvetica Chimica Acta* 77, 2286-2296

Buchbauer, G.; Neumann, A.; Siebenheigl, U.; Weiß, P. and Wolschann, P. (1994) "Structure-Activity-Relationships of Some exo-Isocamphanylcyclohexanols. Conformational Calculations on Sandalwood Odour IX" *Monatshefte für Chemie* 125, 747-752

Buck, L. B. (2000) "The Molecular Architecture of Odor and Pheromone Sensing in Mammals" *Cell* 100, 611-618

Chastrette, M. (1998a) "Data management in ofaction studies" *SAR and QSAR in Environmental Research* 8(3-4), 157-181

Chastrette, M. and Rallet, E. (1998b) "Structure-Minty Odour Relationships: Suggestion of an Interaction Pattern" *Flavour and Fragrance Journal* 31(1), 5-18

Chastrette, M. (1997) "Trends in structure odour relationships" *SAR and QSAR in Environmental Research* 6(3-4), 215-254

Chastrette, M.; Cretin, D. and El Aïdi, C. (1996) "Structure-Odor Relationships: Using Neural Networks in the Estimation of Camphoraceous or Fruity Odors and Olfactory Thresholds of Aliphatic Alcohols" *Journal of Chemical Information and Computer Science* 36, 108-113

Chastrette, M.; Rognon, C.; Sauvegrain, P. and Amouroux, R. (1992) "On the role of chirality in structure-odor relationships" *Chemical Senses* 17 (5), 555-572

Chastrette, M. and de Saint Laumer, J. Y. (1991) "Structure-odor relationships using neural networks" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 26(8), 829-833

Chidambaram, N. and Chandrasekaran, S. (1987) "tert-Butyl Hydroperoxide-Pyridinium Dichromate: A Convenient Reagent System for Allylic and Benzylic Oxidation" *Journal of Organic Chemistry* 52 (22), 5048-5051

Clark, T. (1985) "A Handbook of Computational Chemistry. A Practical Guide to Chemical Structure and Energy Calculations" ISBN 0-471-88211-9, John Wiley and Sons

Corey, E. J. and Schmidt, G. (1979) "Useful Procedures for the Oxidation of Alcohols involving Pyridinium Dichromate in Aprotic Media" *Tetrahedron Letters* 5, 399-402

Cramer, R. D., Patterson, D. E. and Bunce, J. D. (1988) "Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins" *Journal of the American Chemical Society* 110, 5959-5967

Danzer, K.; Hobert, H.; Fischbacher, C. and Jagemann, K.-U. (2001) "Chemometrik. Grundlagen und Anwendungen" Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, ISBN 3-540-41291-3

Darriet, P.; Tominaga, T.; Demole, E. and Dubourdieu, D. (1993) "Evidence of the presence of a 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one precursor in *Vitis vinifera* Sauvignon blanc grape variety, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 316, 1332-1335

Demole, E. and Wuest, H. (1967) "Synthèses stéréosélectives de deux trioxides $C_{18}H_{30}O_3$ stéréo-isomères, d'ambrénolide et de sclaréol-lactone à partir de dérivés du (+)-manool" *Helvetica Chimica Acta* 50, 1314-1327

Dufossé, L.; Latrassé, A. and Spinnler, H.-E (1994) "Importance des lactone dans les arômes alimentaires: structure, distribution, propriétés sensorielles et biosynthèse" *Science des Aliments* 14 (1994), 17-50

Edwards, P. A; Anker, L. S. and Jurs, C. P. (1991) "Quantitative structure-property relationship of the odor threshold of odour active compounds" *Chemical Senses* 16(5), 447-465

Edwards, P. A. and Jurs, C. P. (1989) "Correlation of odour intensities with structural properties of odorants" *Chemical Senses* 14 (2), 281-291

Field, A. (2000) "Discovering Statistics using SPSS for Windows" Sage Publications Ltd., London; ISBN 0-7619-5755-3

Fráter, G.; Bajgrowicz, J. A. and Kraft, P. (1998) "Fragrance Chemistry" *Tetrahedron* 54, 7633-7703

Frings, S. (2001) "Chemolectrical signal transduction in olfactory sensory neurons of air breathing vertebrates" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 510-519

Fujii, H.; Oshima, K. and Utimoto, K. (1991) "A Facile and Selective 1,2 Reduction of Conjugated Ketones with NaBH_4 in the presence of CaCl_2 " *Chemistry Letters* 1847-1848

Gasteiger, J.; Li, X.; Rudolph, C., Sadowski, J. and Zupan, J. (1994a) "Representation of Molecular Electrostatic Potentials by Topological Feature Maps" *Journal of the American Chemical Society* 116, 4608-4620

Gasteiger, J.; Li, Xinzhi and Uschold, A. (1994b) "The beauty of molecular surfaces as revealed by self-organising neural networks" *Journal of Molecular Graphics* 12, 90-97

Gaudin, J.-M. (2000) "Synthesis and Organoleptic Properties of p-Mentane Lactones" *Tetrahedron* 56, 4769-4776

Getz, W. M. and Lansky, P. (2001) "Receptor Dissociation Constants and the Information Entropy of Membranes Coding Ligand Concentration" *Chemical Senses* 26, 95-104

Goodenough, P. W. (1998) "The molecular biology of olfactory perception" *International Journal of Food Science and Technology* 33, 63-77

Gorbachov, M. Yu. and Rossiter, K. J. (1999) "A New Electron-Topological Investigation between Chemical Structure and Ambergris Odour" *Chemical Senses* 24, 171-178

Guth, H. and Fritzler R. (2004) "Binding Studies and Computer-Aided Modelling of Macromolecule/Odorant Interactions" *Chemistry and Biodiversity* 1, 2001-2023

Guth, H. (1996) "Determination of the Configuration of Wine Lactone", *Helvetica Chimica Acta* 79, 1559-1571

Hall, L. H. and Kier, L. B. (2001) "Issues in representation of molecular structure. The development of molecular connectivity" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 20, 4-18

Hall, S. E.; Floriano, W. B.; Vaidehi, N. and Goodard III, W. A. (2004) "Predicted 3-D Structures for Mouse 17 and Rat 17 Olfactory Receptors and Comparison of Predicted Odor Recognition Profiles with Experiment" *Chemical Senses* 29(7), 595-616

Hansch, C. and Fujita, T. (1964) " ρ - σ - π Analysis. A Method for Correlation of Biological Activity and Chemical Structure" *Journal of the American Chemical Society* 86, 1616

Hatt, H. (1999) "Follow your nose: Mechanisms of signal transduction", *Zoology* 102, 120-126

Hehre, W. J.; Yu, J.; Klunzinger, P. E. and Lou, L. (1998) "A Brief Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations" ISBN 1-890661-05-8, Wavefunction, Inc.

Höltje H. D. and Folkerts G. (1997) "Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Volume 5: Molecular Modelling, Basic Principles and Applications" VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim and VCh Publishers, Inc. New York, ISBN 3-527-29384

Hummel, P.; Vaidehi, N.; Floriano, W. B.; Hall, S. E. and Goddard, W. A. (2005) "Test of the Binding Threshold Hypothesis for olfactory receptors: Explanation of the differential binding of ketones to the mouse and human orthologs of olfactory receptor 912-93" *Protein Science* 14, 703-710

Ivanciuc, O. (2002) "Structure-Odor Relationships for Pyrazines with Support Vector Machines" *Internet Electronic Journal of Molecular Design*, 1(5), 269-284

Jellinek, J. S. (1964) "The effect of intermolecular forces on perceived odors" *Annals New York Academy of Science* 116, 725-734

Jingjiang, L. and Duan, G. (1998) "Common structural characteristics of musk odorant molecules" *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 432, 97-103

Karlson, P.; Doenecke, D. and Koolman, J. (1994) "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler", 14. neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, ISBN 3-13-357814-6

Keverne, E. B. (1999) "The Vomeronasal Organ" *Olfaction* 286, 716-720

Kier, L. B. (1977) "Structure-Activity Studies on Odor Molecules using Molecular Connectivity" *Journal of Theoretical Biology* 67, 585-595

Kini, A. D. and Firestein, S. (2001) "The Molecular Basis of Olfaction" *Chimia* 55, 453-459

Klocker, J.; Wailzer, B.; Buchbauer, G. and Wolschann, P. (2002a) "Bayesian Neural Networks for Aroma Classification" *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 42(6), 1443-1449

Klocker, J.; Wailzer, B.; Buchbauer, G. and Wolschann, P. (2002b) "Aroma Quality Differentiation of Pyrazine Derivates Using Self-Organising Molecular Field Analysis and Artificial Neural Network" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(14), 4069-4075

Kohonen, T. (1982) "Self-Organized Formation of Topologically Correct Feature Maps", *Biological Cybernetics* 43, 59-69

Korsching, S. I. (2001) "Odor maps in the brain. Spatial aspects of odor representation in sensory surface and olfactory bulb" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 520-530

Kraft, P.; Bajgrowicz, J. A.; Denis, C. and Fráter, G. (2000) "Allerlei Trends: die neuesten Entwicklungen in der Riechstoffindustrie" *Angewandte Chemie* 112, 3106-3138

Krautwurst, D.; Yau, K. W. and Reed, R. R. (1998) "Identification of Ligands for Olfactory Receptors by Functional Expression of a Receptor Library" *Cell* 95 917-926

Kuang, D.; Yao, Y.; Wang, M.; Pattabiraman, N.; Kotra, L. P. and Hampson, D. R. (2003) "Molecular Similarities in the Ligand Binding Pockets of an Odorant Receptor and the Metabotropic Glutamate Receptors" *The Journal of Biological Chemistry* 278 (43), 42551-42559

Kubinyi, H. (1993) "3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications" Escom Science Publishers, Leiden, Netherlands, ISBN 90-72199-14-6

Kunz, R. W. (1997) "Molecular Modelling für Anwender" 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, B. G. Teubner, Stuttgart, ISBN 3-519-13511-6

Laing, D. G. and Jinks, A. L. (2001) "Psychophysical Analysis of Complex Odor Mixtures" *Chimia* 55, 413-420

Lancet, D. and Nissim, B. (1993) "Olfactory receptors" *Current Biology* 3, 668-674

Li, K.; Gasteiger, J. and Zupan, J. (1993) "On the topology distortion in self organising feature maps" *Biological Cybernetics* 70, 189-198

Liu, J. and Duan, G. (1998) "Common structural characteristics of musk odorant molecules" *Journal for Molecular Structure (Theochem)* 432, 97-103

Luu, P.; Acher, F.; Bertrand, H.-O.; Fan, J. and Ngai, J. (2004) "Molecular Determinants of Ligand Selectivity in a Vertebrate Odorant Receptor" *The Journal of Neuroscience* 24 (45), 10128-10137

Maga, J. A. (1976) "Lactones in Foods" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1976, 1-56

Massart, D.L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J. and Smeyers-Verbeke (1997) "Data Handling in Science and Technology 20A. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A." Elsevier Science B.V.; ISBN 0-444-89724-0

Matthews, H. R. and Reisert, J. (2003) "Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation" *Current opinion in Neurobiology* 13, 469-475

Malnic, B.; Hirono, J.; Sato, T. and Buck, L. B. (1999) "Combinatorial Receptor Codes for Odors" *Cell* 96, 713-723

Mello Castanho Amboni, R. D. de; Silva Junkes, B. da; Yunes, R. A. and Heinzen. V. E. F. (2000) "Quantitative Structure-Odor Relationships of Aliphatic Esters Using Topological Indices" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3517-3572

Mombaerts, P. (1999) "Seven-Transmembrane Proteins as Odorant and Chemosensory Receptors" *Olfaction* 286, 707-711

Mosandl A. and Gessner, M. (1988) "Stereoisomeric Flavour Substances XXIII. δ -Lactone Flavour Compounds-Structure and Properties of Enantiomeres" *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 187, 40-44

Mosandl A. and Günther C. (1989) "Stereoisomeric Flavor Compounds. 20. Structure and Properties of γ -Lactone Enantiomeres" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 413-418

Mori, K.; and Yoshihara, Y. (1995) "Molecular Recognition and Olfactory Processing in the Mammalian Olfactory System" *Progress in Neurobiology* 45, 585-619

Murrell, J. R. and Hunter D. D. (1999) "An Olfactory Sensory Neuron Line, Odora, Perly Targets Olfactory Proteins and Responds to Odorants" *The Journal of Neuroscience* 19(19), 8260-8270

Napolitano, Elio; Giovani, Elena; Ceccarelli, N and Pelosi, P. "Tertiary Alcohols with Earthy Odor" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2806-2809

Narula, A. P. S. (2004) "The search for new Fragrance Ingredients for Functional Perfumery" *Chemistry and Biodiversity* 1(12), 1992-2000

Nef, P. (1998) "How we smell: The Molecular and Cellular Bases of Olfaction", *News in Physiological Sciences* 13, 1-5

Ohloff, G. (1990) "Riechstoffe und Geruchsinne-Die molekulare Welt der Düfte", Springer Verlag Berlin, ISBN 3-540-52560-2

Pelosi, P. (2001) "The role of perireceptor events in vertebrate olfaction" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 503-509

Piggott, J. R. and Withers, S. J. (1993) "Modern Statistics and Quantitative Structure-Activity Relationships in Flavour" *ACS Symposium Series* (1993), 528 (Food Flavour and Safety), 100-108

Pilpel, Y.; Sosinsky, A. and Lancet, D. (1998) "Molecular biology of olfactory receptors" *Essays in Biochemistry* 33, 93-104

Pirkle, W. H. and Adams, P. E. (1980) "Enantiomerically Pure Lactones. 3. Synthesis of and Stereospecific Conjugate Additions to α,β -Unsaturated Lactones" *Journal of Organic Chemistry* 45, 4117-4121

Polanski, J.; Gasteiger, J.; Wagener, M. and Sadowski, J. (1998) "The Comparison of Molecular Surfaces and its Application to Quantitative Structure Activity Studies" *Quantitative Structure-Activity Relationships* 17, 27-36

Quadbeck-Seeger, H.-J.; Faust, R.; Knaus, G., Maelicke, A. and Siemeling, U. (1999) "Chemie Rekorde" 2. Auflage 1999, Wiley-VCH Verlag, ISBN 3-527-29870-3

Randić, M. (2001) "The connectivity index 25 years after" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 20, 19-35

Reed, R. R. (1998) "Open the Window to Odor Space" *Science* 279, 193

Rehner, G. and Daniel, H. (1999) "Biochemie der Ernährung" Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1999, ISBN 386 0253883, 176-192

Rossiter, K. (1996a) "Quantitative Relationships Between Structure and the Fruity Odor of Esters" *Perfumer and Flavourist* 21, 33-46

Rossiter, K. J. (1996b) "Structure-Odor Relationships" *Chemical Reviews* 96(8), 3201-3240

Ruzicka, L. (1920) "Chemical Structure and Odour", *Chemiker Zeitung* 14

Selassie, C. D. (2003) "History of Quantitative Structure-Activity Relationships" in *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 6th Edition, Volume 1: Drug Discovery, edited by Donald J. Abraham ISBN 0-471-27090-3, John Wiley & Sons, Inc. [Internet resource: http://media.wiley.com/product_data/exerpt/03/04712709/0471270903.pdf]

Shvets, N. M. and Dimoglo, A. S. (1998) "Structure-odour relationships: Results of an applied electron-topological approach" *Die Nahrung* 42(6), 364-379

Sicard, G. and Holley, A. (1984) "Receptor Cell Responses to Odorants: Similarities and Differences among Odorants" *Brain Research* 292, 283-296

Strotmann, J. (2001) "Targeting of olfactory neurons" *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 531-537

Tabeta, H. and Mihara, S. (1990) "Structure-Odor Relationships of Monoterpenelactones" *Agricultural and Biological Chemistry* 54 (9), 2271-2276

Tan, Y. and Siebert, K. J. (2004) "Quantitative Structure-Activity Relationship Modelling of Alcohol, Ester, Aldehyde, and Ketone Flavor Thresholds in Beer from Molecular Features" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(10), 3057-3064

Taylor, A. J. and Linforth, R. S. T. (2001) "Modelling Flavour Release through Quantitative Structure Property Relationships (QSPR)" *Chimia* 55, 448-452

Tegoni, M.; Pelosi, P.; Vincent, F.; Spinelli, S.; Campanacci, V.; Grolli, S.; Ramoni, R. and Cambillau, C. (2000) "Mammalian odorant binding proteins" *Biochimica et Biophysica Acta* 1482, 229-240

Touhara, K.; Sengoku, S.; Inaki, K.; Tsuboi, A.; Hirono, J.; Sato, T.; Sakano, H. and Haga, T. (1999) "Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 4040-4045

Trabanino, R. J.; Hall, S. E.; Vaidehi, N.; Floriano, W. B.; Kam, V. W. T. and Goddard, W. A. (2004) "First Principles Predictions of the Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors: Validation for Bovine Rhodopsin" *Biophysical Journal* 86, 1904-1921

Traynor, S. (2001) "The Musk Dilemma" *Perfumer and Flavourist* 26(5), 28-39

Tromelin, A. and Guichard, E. (2004) "2D and 3D-QSAR Models of Interaction between Flavour Compounds and beta-Lactoglobulin Using Catalyst and Cerius" *QSAR and Combinatorial Science* 23(4), 214-233

Tromelin, A. and Guichard, E. (2003) "Use of Catalyst in a 3D-QSAR of the Interactions between Flavour Compounds and β -Lactoglobulin" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(7), 1977-1983

Turin, L. (1996) "A Spectroscopic Mechanism for Primary Olfactory Reception" *Chemical Senses* 21, 773-791

Ullrich, F. and Grosch, W. (1987) "Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid" *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung* 184, 277-282

Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L.; Buydens, L.M.C.; de Jong, S.; Lewi, P.J. and Smeyers-Verbeke, J. (1998) "Data Handling in Science and Technology 20B. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B" Elsevier Science B.V.; ISBN 0-444-82853-2

Vermeulen, A.; Lansky, P.; Tuckwell, H. and Rospars, J. P. (1997) "Coding of odour intensity in a sensory neuron" *BioSystems* 40, 203-210

Wagner, R.; Czerny, M.; Biehlohradsky, J. and Grosch, W. (1999) "Structure-odour-activity relationships of alkylpyrazines" *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung A* 208, 308-316

Wailzer, B.; Klocker, J.; Buchbauer, G.; Ecker, G. and Wolschann, P. (2001) "Prediction of the Aroma Quality and the Threshold Values of Some Pyrazine Using Artificial Neural Networks" *Journal of Medicinal Chemistry* 44(17), 2805-2813

Wang, J.; Luthey-Schulten, Z. A. and Suslick, K. A. (2003) "Is the olfactory receptor a metalloprotein?" *PNAS Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (6), 3035-3039

Winter, B. (2004) "Spirocyclic Ethers Related to Ambrox[®]: Synthesis and Structure-Odour Relationships" *Helvetica Chimica Acta* 87(7), 1616-1627

Yoshii, F.; Yamada, Y.; Hoshi, T and Hagiwara, H. (2002) "The creation of Odorous Compounds on Molecular Rigidity and Analysis of the Molecular Features of compounds in the Database" *Chemical Senses* 27(5), 399-405

Zakarya, D; Chastrette, M.; Tollabi, M. and Fkih-Tetouani, S. (1999) "Structure-camphor odour relationships using the Generation and Selection of Pertinent Descriptors approach" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 48, 35-46

Zhao, H.; Ivic, L.; Otaki, J. M.; Hashimoto, M.; Mikoshiba and Firestein, S. (1998) "Functional Expression of a Mammalian Odorant Receptor" *Science* 279, 237-241

Zupan, J. and Gasteiger, J. (1993) "Neural Networks for Chemists. An introduction" ISBN 3-527-28592-X, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany

6.2. Internet Ressourcen:

Allgemein

[0] <http://www.cost921.uni-wuppertal.de>

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen

[1] http://media.wiley.com/product_data/exerpt/03/04712709/0471270903.pdf

Softwareprogramm Almond

[2] www.tripos.com/data/SYBYL/ALMOND_productsheet_072505.pdf

[3] www.moldiscovery.com/soft_almond.php

Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Partial Least Square Regression (PLS)

[4] <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptkomponentenanalyse>

[5] <http://vs.fernuni-hagen.de/Lernstats/LS/glossar/Hauptkomponentenanalyse.html>

[6] http://csnet.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf

[7] www.utdallas.edu/~herve/Abdi-PLS-pretty.pdf

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| Abb | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| c-AMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CoMFA | Comparative Molecular Field Analysis |
| CoMSIA | Comparative Molecular Similarity Indices Analysis |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| GC | Gaschromatographie |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| IP₃ | Inositoltriphosphat |
| MS | Massenspektrometrie |
| MU Gas | Make up Gas |
| NMR | Kernresonanzspektrometrie |
| NN | Neuronales Netzwerk |
| KNN | Kohonen Neuronales Netzwerk |
| UV | Ultraviolett |
| VNO | Vomeronasalorgan |
| OBP | Odorant Binding Proteins |
| PBP | Pheromone Bonding Proteins |
| PC | Principal Component, Hauptkomponente |
| PCA | Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse |
| PLS | Partial Least Square Regression |
| QSAR | Quantitative Structure Activity Relationships |
| RI | Retentionsindex |
| RMS error | Root Mean Square Error |
| Tab | Tabelle |

7.2 Tabellenverzeichnis

Kapitel 3 Ergebnisse und Diskussion

- Tab 3.1** Konformationsanalyse der Lactone **1a**, **2a1** und **2a2** mittels $^1\text{H-NMR}$ und Molecular Modelling Methoden.
- Tab 3.2** Geruchsschwellenwerte bicyclischer Lactone
- Tab 3.3** Geruchsschwellenwerte monocyclischer Lactone
- Tab 3.4** Neuronen mit einem α -Loading Betrag größer als 0,1 auf der ersten Hauptkomponente
- Tab 3.5** Vorhersage der Geruchsschwellenwerte gemäß **Vorhersagemodell K2**
- Tab 3.6** Datensatz zur Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen monocyclischer Lactone der Geruchsqualität pfirsich.
- Tab 3.7** Konformationssuche für R- δ -Dodecalacton mittels HyperChem5.0 / Chemplus1.0
- Tab 3.8** Konformationssuche für R- γ -Dodecalacton mittels HyperChem5.0 / Chemplus1.0
- Tab 3.9** Vorhersage der Geruchsschwellenwerte gemäß **Vorhersagemodell D3**
- Tab 3.10** Vorhersage der Geruchsschwellenwerte gemäß **Vorhersagemodell N3**

Kapitel 5 Experimenteller Teil

- Tab 5.1** Monocyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig und pfirsichartig
- Tab 5.2** Ungesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig (**1a-h**)
- Tab 5.3** Gesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig (**2a₁₋₂-2d₁₋₂**)
- Tab 5.4** Gesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosnussartig (**2e₁₋₂-2h₁₋₂**)
- Tab 5.5** Weitere bicyclische Lactone unterschiedlicher Geruchsqualität (**3a-d,4a-b,5-8**)

7.3 Abbildungsverzeichnis

Kapitel 2 Theorieteil

- Abb 2.1** Gesamtsystem Lebensmittel-Aromastoff-Geruchsinn
- Abb 2.2** Epimere A und B von 13,20-Diepoxy-14,15,16-trisnor-labdan $C_{18}H_{30}O_3$
- Abb 2.3** Hauptweg der Signalübertragung über cyclisches Adenosinmonophosphat (c-AMP) als second messenger
- Abb 2.4** Nebenweg der Signalübertragung mit Inositoltriphosphat (IP_3) als second messenger
- Abb 2.5** Aufbau eines künstlichen Neurons N mit Eingangsignalen s_1 bis s_3 , Gewichten w_1 bis w_3 , Transferfunktion f und Ausgabesignal out.
- Abb 2.6** Typische Anordnungen von Neuronen in Kohonen Netzwerken
- Abb 2.7** Torusartige Ausrichtung eines zweidimensionalen rechteckigen Neuronalen Netzwerkes
- Abb 2.8** Beispiel für ein Output Activity Map für einen Eingabevektor
- Abb 2.9** Belegungsdichtemap für einen kompletten Satz von Eingabevektoren
- Abb 2.10** Beispiel für eine Kohonen Feature Map
- Abb 2.11** Projektion einer Moleküloberfläche auf ein Kohonen Netz
- Abb 2.12** Single Template Approach
- Abb 2.13** Multiple Template Approach

Kapitel 3 Ergebnisse und Diskussion

- Abb 3.1** Modellverbindungen. Monocyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig und pfirsichartig
- Abb 3.2** Modellverbindungen. Ungesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig
- Abb 3.3** Modellverbindungen. Gesättigte bicyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig
- Abb 3.4** Modellverbindungen. Weitere bicyclische Lactone unterschiedlicher Geruchsqualität

- Abb 3.5a** Reaktionsschema für die enantioselektive Synthese der bicyclischen Lactone 1a, 1c, 1e und 1g nach Guth (1996)
- Abb 3.5b** Reaktionsschema für die enantioselektive Synthese der bicyclischen Lactone 1b, 1d, 1f und 1h nach Guth (1996)
- Abb 3.6** Selektive Hydrierung von 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon 1a-h zu Dimethylhexahydrobenzofuranon (2a₁₋₂-2h₁₋₂)
- Abb 3.7** Synthese von Dehydromintlacton 5
- Abb 3.8** Synthese der bicyclischen Lactone 7 und 8
- Abb 3.9** Synthese der bicyclischen Lactone 3a-3d
- Abb 3.10** Abhängigkeit der Kopplungskonstante $^3J_{3,3a}$ (Hz) bei bicyclischen Lactonen vom Diederwinkel
- Abb 3.11** Bevorzugte Konformationen der Lactone **2a1** und **2a2**
- Abb 3.12** Energetisch günstigste Konformation 1a1 von (3aS, 3S, 7aR) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (Weinlacton) in zwei Perspektiven.
- Abb 3.13** MEP auf der Conolly Oberfläche für (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethylhexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**).
- Abb 3.14** Kohonen Feature Maps für einen Single Template Approach mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül
- Abb 3.15** Kohonen Belegungsdichtemaps für einen Single Template Approach mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül.
- Abb 3.16** Differenzspektrum der Neuronenbelegungsdichte für (3aR, 3R, 7aS) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (**1b1**) im Vergleich zum Referenzmolekül (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**).
- Abb 3.17** Rückprojektion der Datenpunkte des Neurons Nr. 189 von (3aR, 3R, 7aS) 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon **1b1** (türkise Farbkodierung und 3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on **2a1** (rote Farbkodierung) auf die Oberfläche des Referenzmoleküls **2a1** (weiße Farbkodierung)
- Abb 3.18** Überlagerung der bicyclischen Lactone **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a1** als Leitstruktur mit niedrigstem Geruchschwellenwert

- Abb 3.19** Graphische Darstellung einer Conolly Oberfläche über der Referenzstruktur aus den vier Bicyclen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**, generiert mittels IRIS Explorer 3.5
- Abb 3.20** Belegungsdichte Map für die chemische Leitstruktur aus den 4 bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**
- Abb 3.21** Viertelung der Kohonen Map zur Rückprojektion und Identifizierung der molekularen Bereiche auf der zweidimensionalen Karte
- Abb 3.22** Rückprojektion der Datenpunkte, die in den Neuronen 0-8, 19-26, 38-47, 57-66,95-104, 114-123, 133-142,152-161 und 171-180 enthalten sind, auf die molekulare Oberfläche des Referenzmoleküls
- Abb 3.23** Rückprojektion der den Neuronen 10-18, 29-37, 48-56, 67-75, 86-94, 105-113, 124-132, 143-151, 162-170, 181-189 zugeordneten Datenpunkte auf die Oberfläche des Referenzmoleküls
- Abb 3.24** Rückprojektion der den Neuronen 190-199, 209-218, 228-237, 247-256, 266-275, 285-294, 304-313, 323-332 und 342 bis 351 zugeordneten Datenpunkte auf die Oberfläche des Referenzmoleküls
- Abb 3.25** Rückprojektion der den Neuronen 200-208, 219-227, 238-246, 257-265, 276-284, 295-303, 314-322, 333-341 und 352-360 zugeordneten Datenpunkte auf die Oberfläche des Referenzmoleküls
- Abb 3.26** Rückprojektion der vier Teilbereiche aus Kohonen Map (**Abbildung 3.21**) auf die Oberfläche des Referenzmoleküls
- Abb 3.27** Belegungsdichte Map nach Kohonen für die Leitstruktur aus den 4 bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**
- Abb 3.28** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählte Lactone des Datensatzes
- Abb 3.29** Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) und **1b1** (weiß) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon sowie R- δ -Decalacton **RD10** (rot) anhand ihrer Lactonfunktion zur Lokalisierung ungenutzter Bereiche auf den Kohonen Maps
- Abb 3.30** Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) und **1b1** (weiß) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon ihrer Lactonfunktion und Rückprojektion der in den in **Abbildung 3.21** türkis markierten Neuronen enthaltenen Daten auf die molekulare Oberfläche.

- Abb 3.31** Überlagerung der Stereoisomeren **1a1** (türkis) von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon und R- δ -Decalacton **RD10** anhand ihrer Lactonfunktion und Rückprojektion der in den in **Abbildung 3.21** türkis markierten Neuronen enthaltenen Daten auf die molekulare Oberfläche.
- Abb 3.32** Neuronenbelegungsdichtedifferenz für das Testmolekül **1b1** im Vergleich zur Leitstruktur (Überlagerung von **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**) zur Identifizierung von Bereichen maximaler Differenz
- Abb 3.33** Neuronenbelegungsdichtedifferenz für das Testmolekül R- δ -Decalacton **RD10** im Vergleich zur Leitstruktur (Überlagerung von **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**) zur Identifizierung von Bereichen maximaler Differenz
- Abb 3.34** Lokalisierung der Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz auf der Kohonen Map sowie auf der Moleküloberfläche für das Testmolekül **1b1** im Vergleich zur Leitstruktur (Überlagerung aus **2a1**, **2a2**, **1a1**, **1a2**)
- Abb 3.35** Lokalisierung der Neuronen mit maximaler Belegungsdichtedifferenz auf der Kohonen Map sowie auf der Moleküloberfläche für das Testmolekül R- δ -Decalacton **RD10** im Vergleich zur Leitstruktur (**2a1**, **2a2**, **1a1**, **1a2**)
- Abb 3.36** Sample Scores für mono- und bicyclische Lactone auf der ersten Hauptkomponente (PC1) in **Vorhersagemodell 2**
- Abb 3.37** Sample Scores für mono- und bicyclische Lactone auf der zweiten Hauptkomponente (PC2) in **Vorhersagemodell 2**
- Abb 3.38** x-Loading Weights für 361 Variablen (Neuron 0-360) auf der ersten Hauptkomponente nach **Vorhersagemodell 2**, Unscrambler 7.5.
- Abb 3.39** Lokalisierung der wichtigsten Variablen (Neuronen) auf der Kohonen Map. Neuronen mit x-Loading Weights größer als $\pm 0,1$ sind farbig markiert.
- Abb 3.40** Lokalisierung der wichtigsten Variablen (Neuronen) auf der Kohonen Map.
- Abb 3.41** Rückprojektion der in den Neuronen 342-360 enthaltenen Oberflächendatenpunkte auf die molekulare Oberfläche des Leitstruktur aus **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2**.
- Abb 3.42** Lokalisierung der in den Neuronen 342-360 enthaltenen Oberflächendatenpunkte auf die molekulare Oberfläche des Referenzmoleküls (hellblau), des geruchlosen bicyclischen Lactons **1b1** (weiß) und R- δ -Decalacton (rot)
- Abb 3.43** Olfaktophorhypothese für kokosnussartigen Geruch

- Abb 3.44** Überlagerung von S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton als Leitstruktur für den nichtdynamischen Ansatz (Überlagerung der energetisch günstigsten Konformation)
- Abb 3.45** Überlagerung mehrerer Konformere von S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton als Leitstruktur für den dynamischen Ansatz
- Abb 3.46** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die Leitstruktur des nichtdynamischer Ansatzes
- Abb 3.47** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die Leitstrukturen des dynamischen Ansatz
- Abb 3.48** Sample Scores auf PC1 und PC2 für 16 Lactone nach **Vorhersagemodell D1**, Diskriminierung der Lactone entsprechend ihrer Ringkonfiguration (γ , δ , R, S)

Kapitel 5 Experimenteller Teil

- Abb 5.1** Operational Map zur Erzeugung von Moleküloberflächen in IRIS Explorer
- Abb 5.2** Operational Map zur Rückprojektion von Oberflächendatenpunkten auf die Moleküloberfläche in IRIS Explorer
- Abb 5.3** Anordnung der verwendeten Module in Neural Connection 2.0
- Abb 5.4** Dateneingabe in Unscrambler 7.5 zur Durchführung einer Partial Least Square Regression
- Abb 5.5** Reaktionsschema zur enantioselektiven Synthese der bicyclischen Lactone **1a**, **1c**, **1e** und **1g**
- Abb 5.6** Rhodiumkatalysierte Hydrierung von Weinlacton **1a**
- Abb 5.7** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2a1**
- Abb 5.8** $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **2a1** in CD_2Cl_2
- Abb 5.9** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2a2**
- Abb 5.10** $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **2a2** in CD_2Cl_2
- Abb 5.11** CH-Korrelationsspektrum von Lacton **2a2** in CD_2Cl_2
- Abb 5.12** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2c1**
- Abb 5.13** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2c2**
- Abb 5.14** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2e1**
- Abb 5.15** $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **2e1** in CD_2Cl_2
- Abb 5.16** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2e2**
- Abb 5.17** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2g1**
- Abb 5.18** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **2g2**
- Abb 5.19** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **3a**
- Abb 5.20** $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **3b** in CD_2Cl_2
- Abb. 5.21** Nummerierung der Kohlenstoffatome am Beispiel von Lacton **3c**
- Abb 5.22** $^1\text{H-COSY}$ Spektrum von Lacton **3d** in CD_2Cl_2

Anhang Arbeitsvorschriften

- Abb A1.1** Regioselektive Hydroborierung von R-Limonen zu (2RS)-2-[(1R)-4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol
- Abb A2.1** Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure
- Abb A3.1** Direkte Lactonbildung aus 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon
- Abb A4.1** Veresterung von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäuremethylester
- Abb A5.1** Allylische Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäuremethylester zu 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]propansäuremethylester
- Abb A6.1** Herstellung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure aus durch selektive Reduktion der ringständigen Ketofunktion und anschließende Esterhydrolyse
- Abb A7.1** Cyclisierung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon mit N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)
- Abb A8.1** Rhodiumkatalysierte, selektive Hydrierung der ungesättigten bicyclischen Lactone **1a-h**

Anhang Kohonen Maps

- Abb 7.1** Kohonen Feature Maps für einen Single Template Approach mit (3S,3aS,6R,7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül.
- Abb 7.2** Kohonen Belegungsdichtemaps für einen Single Template Approach mit (3S,3aS,6R,7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül.
- Abb 7.3** Belegungsdichte Map nach Kohonen für die Leitstruktur aus den 4 bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2** und Farbkodierungsskala für **Abbildungen 7.3 -7.8**
- Abb 7.4** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählter Konformere der cis-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon.
- Abb 7.5** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählter Konformere der trans-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon.
- Abb 7.6** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die 8 cis-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon.
- Abb 7.7** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die 8 trans-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon.
- Abb 7.8** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählte Konformere weiterer bicyclischer Lactone.
- Abb 7.9** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählte Konformere weiterer bicyclischer Lactone.
- Abb 7.10** Belegungsdichte Maps nach Kohonen monocyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig.

- Abb 7.11** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die nichtdynamische Leitstruktur aus S- δ -Dodeca- und R- γ -Dodecalacton.
- Abb 7.12** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische δ -Lactone des nichtdynamischen Ansatzes
- Abb 7.13** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische γ -Lactone aus dem nichtdynamischen Ansatz
- Abb 7.14** Belegungsdichte Maps nach Kohonen die dynamische Leitstruktur aus S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton.
- Abb 7.15** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische δ -Lactone, dynamischer Ansatz
- Abb 7.16** Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische γ -Lactone, dynamischer Ansatz.

7.4. Arbeitsvorschriften zu den durchgeführten Synthesen

Arbeitsvorschrift A1: Regioselektive Hydroborierung von Limonen mit 9-Borabicyclononan

Die regioselektive Hydroborierung von (+)-(4R)-Limonen zu (2RS)-2-[(1R)-4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol erfolgt mittels einer Lösung von 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan in Tetrahydrofuran nach Guth [Guth, 1996] bzw. Brown et al. [Brown, 1974] entsprechend dem in Abbildung A1.1 dargestellten Reaktionsschema. Hydroborierung von (-)-(4S)-Limonen liefert das entsprechende Analog (2RS)-2-[(1S)-4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol.

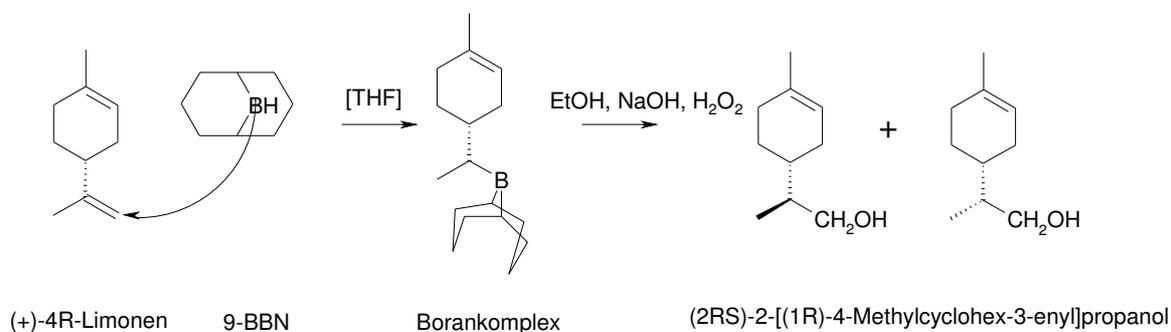


Abbildung A1.1: Regioselektive Hydroborierung von R-Limonen zu (2RS)-2-[(1R)-4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol.

Arbeitsvorschrift:

Zur Hydroborierung von Limonen werden 50 ml einer 0,5 m Lösung von 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan in THF (entsprechend 0,025 mol 9-BBN) in einen 250 ml Dreihalskolben vorgelegt. 3,4 g R-Limonen werden in 20 ml THF gelöst und zugegeben. Die Mischung wird mindestens 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt, Rühren über Nacht erhöht die Ausbeute erheblich.

Zur Hydrolyse des Borankomplexes werden nacheinander 15 ml Ethanol, 5 ml 6 m NaOH und 10 ml 30% H₂O₂ zugegeben und die Mischung für 1 Stunde auf 50°C erwärmt. Der Reaktionsansatz wird auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Natriumcarbonat Na₂CO₃ gesättigt, und nach Zugabe von 100 ml Wasser wird dreimal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat NaSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt bleibt als 1:1 Mischung der entsprechenden Diastereomeren in mind. 65%iger Ausbeute zurück.

Arbeitsvorschrift A2: Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure

Die Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure erfolgt nach Guth [Guth, 1996; Corey, 1979] mit Pyridiniumdichromat als Oxidationsmittel.

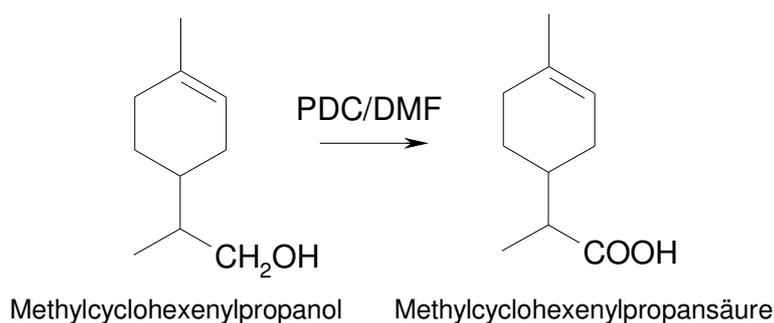


Abbildung A2.1: Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure

Arbeitsvorschrift:

17 g Pyridiniumdichromat in 20 ml Dimethylformamid werden in einen 250 ml Iodzahlkolben vorgelegt und nach Zugabe von 2,0 g 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propanol für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200 ml Wasser abgebrochen und das Produkt nach Ansäuern des Reaktionsansatzes mit dreimal 100 ml Diethylether extrahiert. Die Säure wird aus der organischen Phase mit dreimal 100 ml 0,5 m Na₂CO₃ extrahiert und nach Ansäuern der wässrigen Phase auf pH 5 durch dreimaliges Ausschütteln mit Diethylether wieder in die organische Phase überführt. Die vereinigten Diethyletherphasen werden mit 100 ml 0,1 m HCl gewaschen, mit NaCl gesättigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält die 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure als 1:1 Mischung der entsprechenden Diastereomeren in 39%iger Ausbeute.

Arbeitsvorschrift A4: Veresterung von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäuremethylester

Zur Darstellung der trans-konfigurierten bicyclischen Lactone 1 e-h wird vor der allylischen Oxidation mit t-Butylhydroperoxid nach Arbeitsvorschrift A5 eine säurekatalysierte Veresterung von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester durchgeführt. Die Methylesterfunktion dient hierbei als Schutzgruppe um eine direkte Lactonbildung zu den cis-konfigurierten Analoga 1 a-d zu verhindern. Die Veresterung erfolgt nach Guth [Guth, 1996] entsprechend dem in Abbildung A4.1 dargestellten Reaktionsschema.

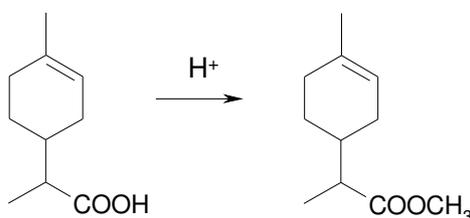


Abbildung A4.1: Veresterung von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäuremethylester

Arbeitsvorschrift:

Es werden 1 g 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäure in 20 ml wasserfreiem Methanol vorgelegt. Nach Zugabe von 10 µl konzentrierter Schwefelsäure H₂SO₄ wird die Reaktionsmischung für 4 Stunden lang bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen mit 50 ml Wasser verdünnt. Der Methylester wird durch zweimaliges Ausschütteln mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Diethyletherphasen werden zur Abtrennung von nicht umgesetzter Säure mit 50 ml 0,5 m Natriumcarbonatlösung Na₂CO₃ gewaschen, mit Natriumsulfat NaSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel schonend über eine Vigreux Kolonne entfernt.

Die Ausbeute beträgt 92 % 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]propansäuremethylester.

Arbeitsvorschrift 5: Allylische Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester zu 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester

Die allylische Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester zu 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester erfolgt nach Guth [Guth, 1996] bzw. Chidambaram [Chidambaram et al., 1987] mit Pyridiniumdichromat und t-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel. Wird dieselbe Reaktion mit der unveresterten 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]-propansäure durchgeführt erfolgt direkte Lactonbildung entsprechen Arbeitsvorschrift A3.

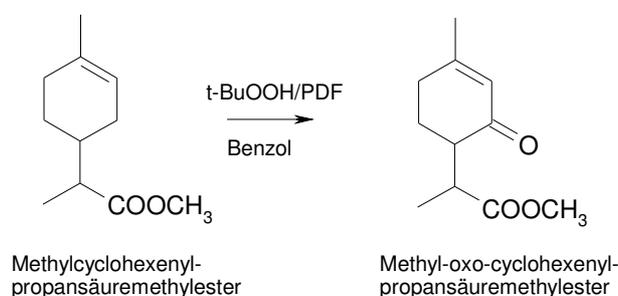


Abbildung A5.1: Allylische Oxidation von 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester zu 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester

Arbeitsvorschrift:

1 g 2-[4-Methylcyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester werden mit 4 g Celite in 60 ml Benzol vorgelegt. Nach Zugabe von 4,2 g Pyridiniumdichromat PDC und 1 g 70 %igem wässrigem tertiär Butylhydroperoxid t-BuOOH wird der Reaktionsansatz für 24 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wird mit 100 ml Diethylether verdünnt, filtriert und das Filtrat mit 100 ml 0,1 m Salzsäure HCl gewaschen. Die etherische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die Lösung über eine Vigreux Kolonne bis zu einem Volumen von etwa 2 ml aufkonzentriert. Das erhaltene Konzentrat wird säulenchromatographisch an Silicagel gereinigt. Die Elution erfolgt mit einer Mischung aus Pentan und Diethylether im Verhältnis 1+1. Man erhält eine 1:1 Mischung der entsprechenden Diastereomeren in einer Ausbeute von 46 %.

Arbeitsvorschrift A 6: Herstellung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]-propansäure durch selektive 1,2 Reduktion von 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester mit Natriumborhydrid und anschließender und Esterhydrolyse.

Die selektive Reduktion der ringständigen Ketofunktion von 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester erfolgt nach Guth [Guth, 1996] bzw. Fujii [Fujii et al., 1991] mittels Natriumborhydrid NaBH_4 in Gegenwart von Calciumchlorid CaCl_2 als Katalysator in aprotischem Lösungsmittel iso-Propanol. Hierbei erfolgt eine selektive 1,2 Reduktion der konjugierten Ketofunktion mit Natriumborhydrid in Anwesenheit von CaCl_2 als Katalysator. Anschließende Esterhydrolyse durch Behandlung mit methanolischer Natronlauge liefert die freie Hydroxysäure.

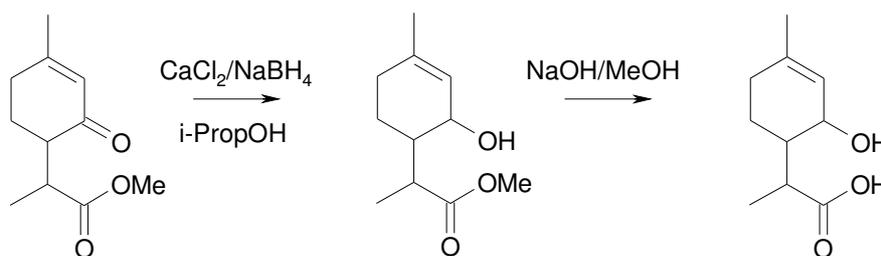


Abbildung A6.1: Herstellung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure aus durch selektive Reduktion der ringständigen Ketofunktion und anschließende Esterhydrolyse

Arbeitsvorschrift:

0,6 g 2-[4-Methyl-2-oxo-cyclohex-3-enyl]-propansäuremethylester werden in 20 ml wasserfreiem iso-Propanol vorgelegt und nach Zugabe von 0,66 g wasserfreiem Calciumsulfat CaCl_2 sowie 0,16 g Natriumborhydrid NaBH_4 für 2 Stunden bei 0°C im Eisbad gerührt.

Die Lösung wird anschließend weiterverwendet und zu 6 ml einer Lösung aus 0,4 g Natriumhydroxid in Methanol / Wasser [1:1] gegeben. Die Mischung wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach mit 1 m HCl vorsichtig angesäuert bis pH 6. Stärkeres Ansäuern kann hier zur direkten Lactonisierung der Hydroxysäure führen. Dreimalige Extraktion des Reaktionsansatzes mit je 20 ml Diethylether, Trocknen der vereinigten Diethyletherphasen mit Natriumsulfat Na_2SO_4 und schonendes Entfernen des Lösungsmittels über eine Vigreux-Kolonnen liefert etwa 0,2 g 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure als Produkt.

Arbeitsvorschrift A 7: Herstellung der bicyclischen Lactone durch Cyclisierung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon mit N,N-Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC)

Die Cyclisierung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure mit N,N-Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) erfolgt nach Guth [Guth, 1996] bzw. Pirkle [Pirkle et al., 1980] und liefert Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon. Entsprechend den Arbeitsvorschriften A1-7 erhält man ausgehend von R-Limonen die Diastereomeren 1a, 1c, 1e und 1g während die Synthese ausgehend von S-Limonen die Diastereomeren 1b, 1d, 1f und 1h liefert.

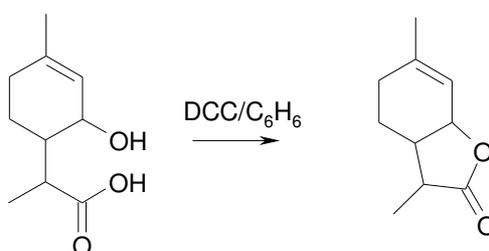


Abbildung A7.1: Cyclisierung von 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure zu 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon mit N,N-Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC)

Arbeitsvorschrift:

Eine Mischung von 0,2 g 2-[2-Hydroxy-4-methylcyclohex-3-enyl]propansäure und 0,25 g N,N-Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) in 5 ml Benzol wird für 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 20 ml n-Hexan verdünnt. Die Lösung wird zur Abtrennung eines unlöslichen weißen Rückstandes filtriert. Das Filtrat wird nacheinander mit 15 ml 1m Salzsäure HCl sowie 15 ml 10%iger [w/v] Kochsalzlösung gewaschen, mit Magnesiumsulfat MgSO₄ getrocknet, filtriert und die erhaltene Lösung an einer Vigreux Kolonne aufkonzentriert. Anschließende Aufreinigung des Konzentrats mittels Flash Chromatographie (siehe Abschnitt 5.3.4) liefert die reinen Verbindungen 1a, 1c, 1e und 1g (ausgehend von R-Limonen) bzw. 1b, 1d, 1f und 1h (ausgehend von S-Limonen).

Arbeitsvorschrift A 8 Rhodiumkatalysierte Hydrierung der ungesättigten bicyclischen Lactone 1a-h

Die enantioselektive Hydrierung von 3,6 Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-2(3H)-benzofuranon (1a-h) zu den gesättigten Analoga erfolgte durch katalytische Hydrierung an Rhodium.

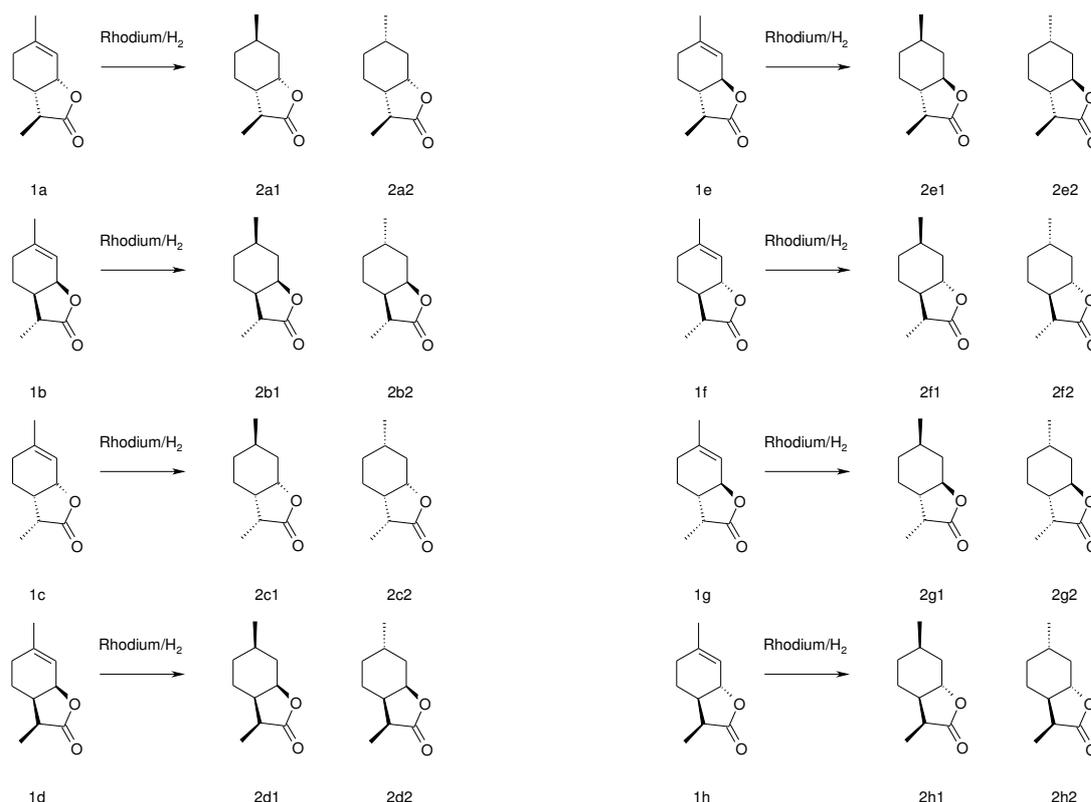


Abbildung A8.1: Rhodiumkatalysierte, selektive Hydrierung der ungesättigten bicyclischen Lactone 1a-h

Arbeitsvorschrift:

75 μg 1a in 2,5 ml Diethylether werden in einem Schnappdeckelgläschen mit 2 mg Rhodiumkatalysator versetzt. Es wird ein mit Wasserstoffgas gefüllter Luftballon (etwa 100ml) übergestülpt und die Lösung für 5 Minuten unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktion wird durch entfernen des Luftballons abgebrochen und die Lösung zur Abtrennung des Katalysators filtriert. Konzentrationsbestimmung der auf 200 μl aufkonzentrierten Lösung ergibt 5 μg 2a1, 12 μg 2a2 und 23 μg nicht umgesetztes 1a. Weitere Aufreinigung der Produkte erfolgt mittels präparativer HPLC (siehe Abschnitt 5.3.3)

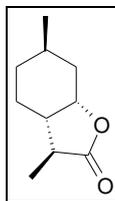
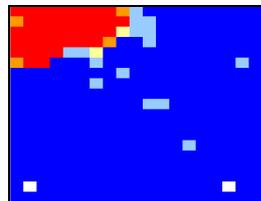
7.5 Kohonen Maps

7.5.1 Methodenentwicklung mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6-Dimethyl-hexahydrobenzofuran-2-on und unter Berücksichtigung eines Teildatensatzes (Kapitel 3.3.1.2.1.)

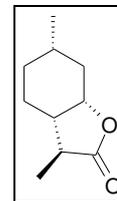
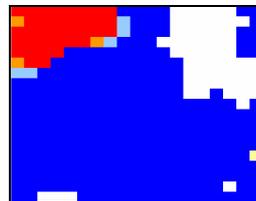
7.5.1.1. Kohonen Maps mit abgebildetem molekularem elektrostatischen Potential (ESP)

Farbkodierung für das abgebildete ESP

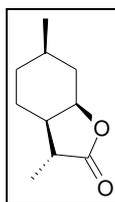
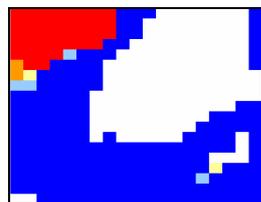
-  (weiß): keine Datenpunkte, daher kein ESP abgebildet
-  (rot): ESP kleiner als -5 kcal / mol
-  (orange): ESP zwischen -5 kcal / mol und -1 kcal / mol
-  (hellgelb): ESP zwischen -1 kcal / mol und +1 kcal / mol
-  (hellblau): ESP zwischen +1 kcal / mol und +5 kcal / mol
-  (dunkelblau): ESP größer als +5 kcal / mol



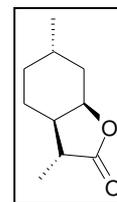
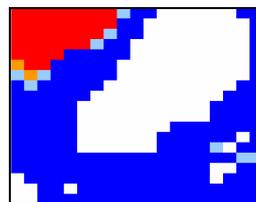
ESP Map Lacton **2a1** (Referenz)



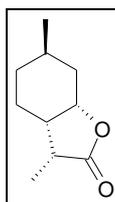
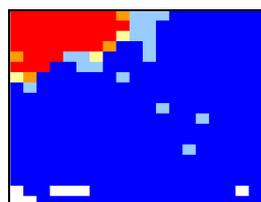
ESP Map Lacton **2a2**



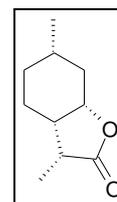
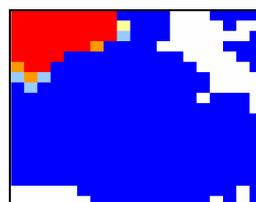
ESP Map Lacton **2b1**



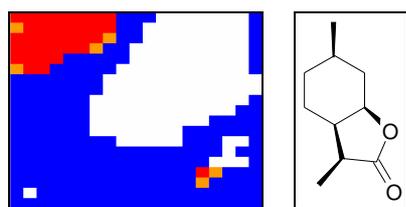
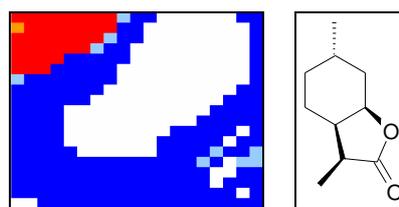
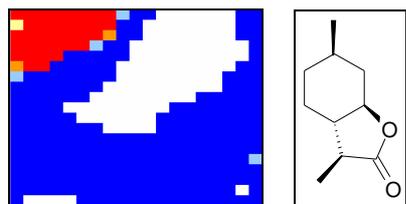
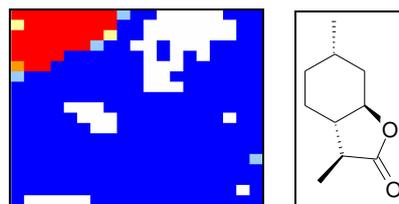
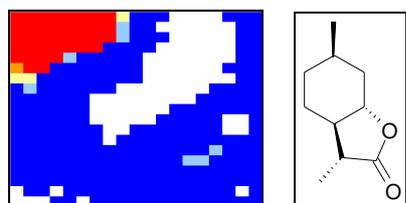
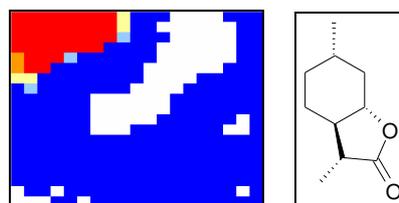
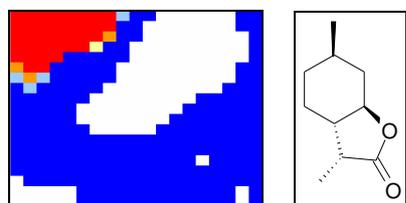
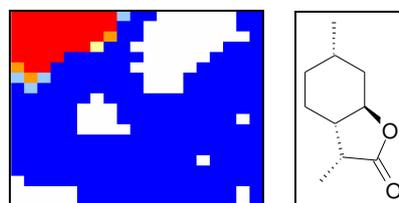
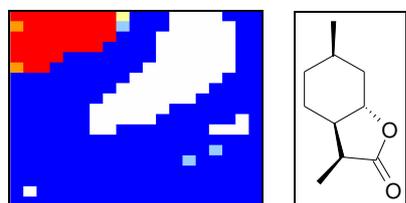
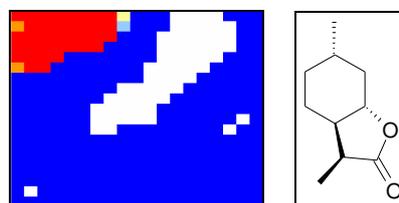
ESP Map Lacton **2b2**

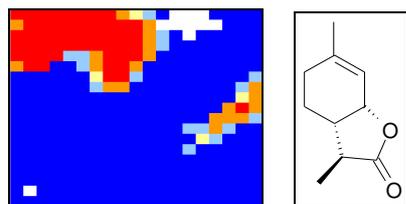
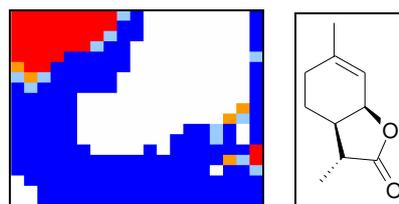
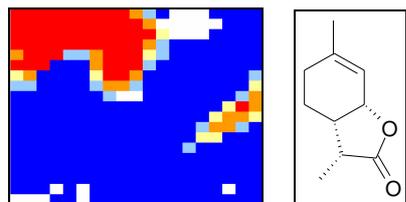
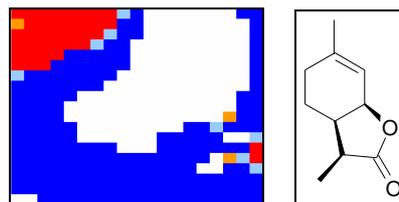
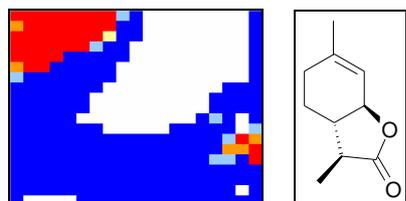
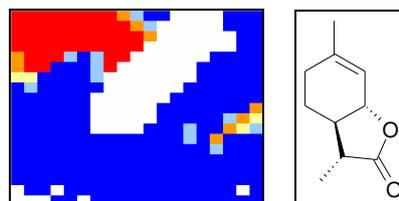
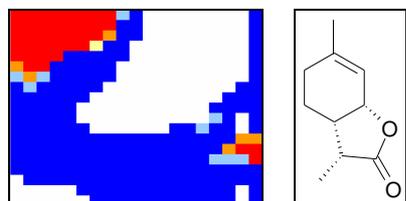
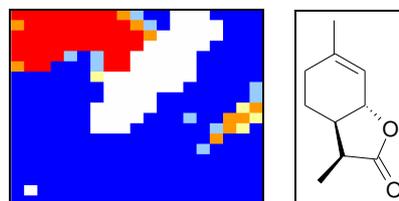


ESP Map Lacton **2c1**



ESP Map Lacton **2c2**

ESP Map Lacton **2d1**ESP Map Lacton **2d2**ESP Map Lacton **2e1**ESP Map Lacton **2e2**ESP Map Lacton **2f1**ESP Map Lacton **2f2**ESP Map Lacton **2g1**ESP Map Lacton **2g2**ESP Map Lacton **2h1**ESP Map Lacton **2h2**

ESP Map Lacton **1a1**ESP Map Lacton **1b1**ESP Map Lacton **1c1**ESP Map Lacton **1d1**ESP Map Lacton **1e**ESP Map Lacton **1f**ESP Map Lacton **1g**ESP Map Lacton **1h**

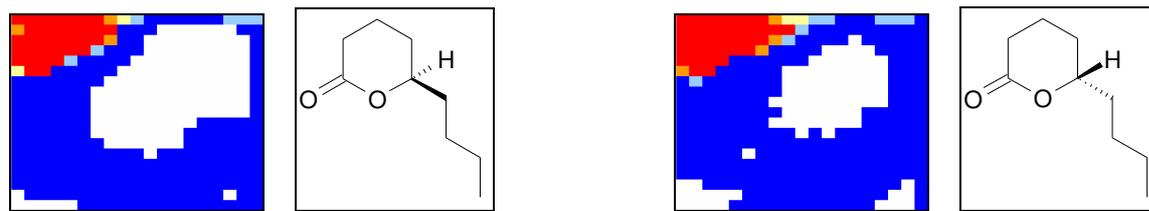
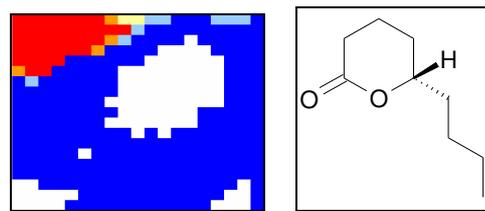
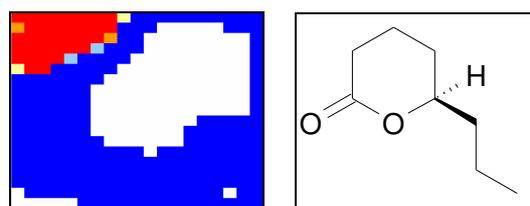
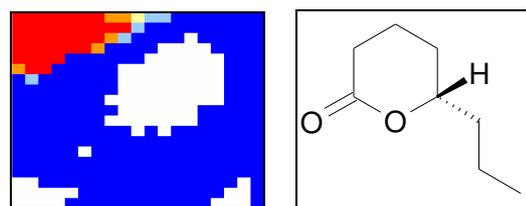
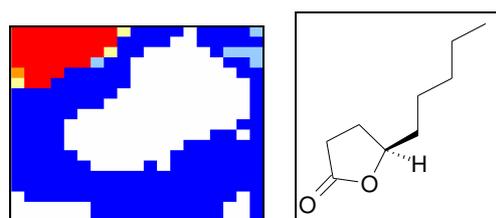
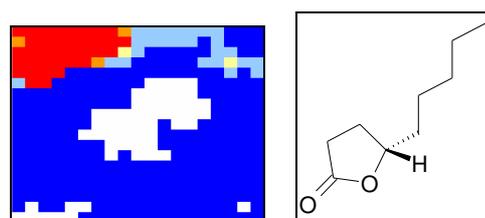
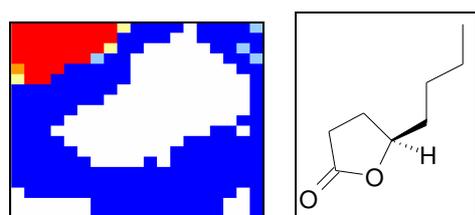
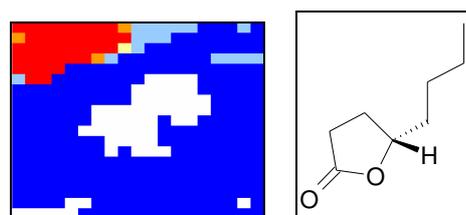
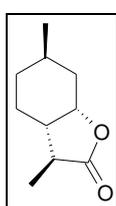
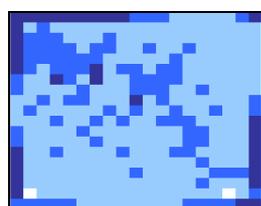
ESP Map Lacton **RD9**ESP Map Lacton **SD9**ESP Map Lacton **RD8**ESP Map Lacton **SD8**ESP Map Lacton **RG9**ESP Map Lacton **SG9**ESP Map Lacton **RG8**ESP Map Lacton **SG8**

Abbildung 7.1: Kohonen Feature Maps für einen Single Template Approach mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül. Das mittlere elektrostatische Potential der jedem Neuron zugeordneten Datenpunkte ist entsprechend dem oben definierten Farbcode auf den Netzwerkkarten dargestellt.

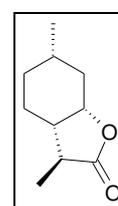
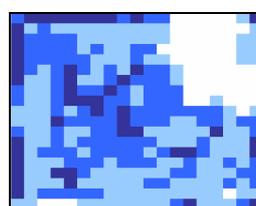
7.5.1.2. Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte

Farbkodierung für die abgebildete Belegungsdichte

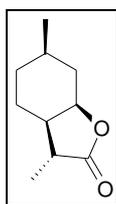
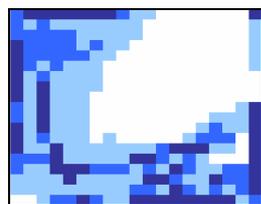
| | | |
|---|---------------|------------------------------------|
|  | (weiß): | keine Datenpunkte |
|  | (hellblau): | 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron |
|  | (mittelblau): | 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron |
|  | (dunkelblau): | mehr als 10 Datenpunkte pro Neuron |



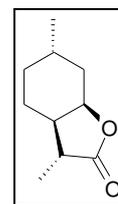
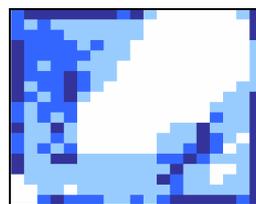
Belegungsdichte Map Lacton **2a1** (Referenz)



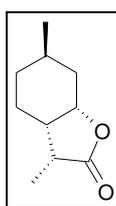
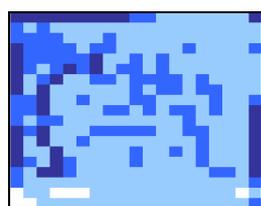
Belegungsdichte Map Lacton **2a2**



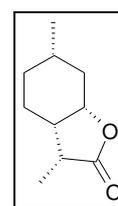
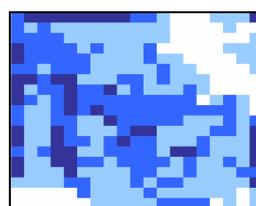
Belegungsdichte Map Lacton **2b1**



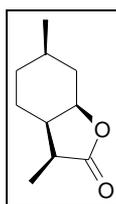
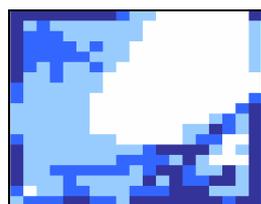
Belegungsdichte Map Lacton **2b2**



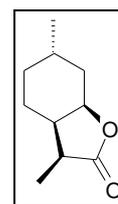
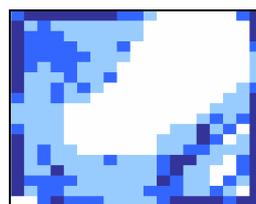
Belegungsdichte Map Lacton **2c1**



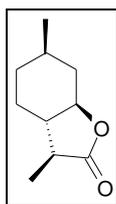
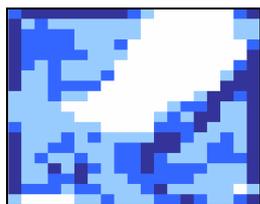
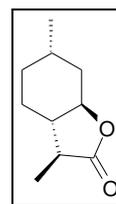
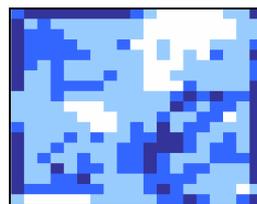
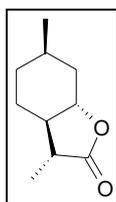
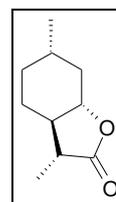
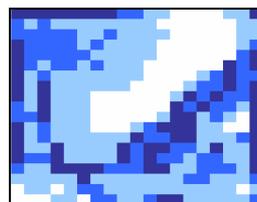
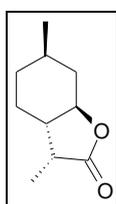
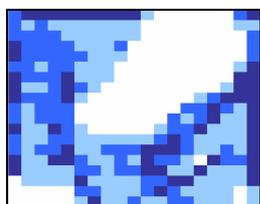
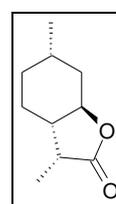
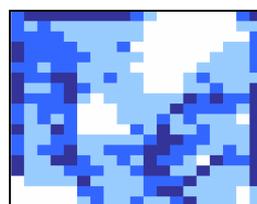
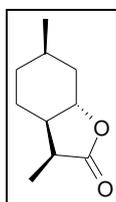
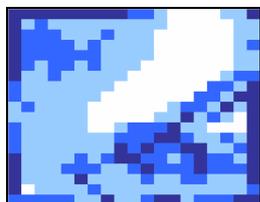
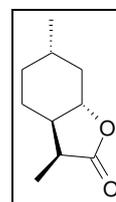
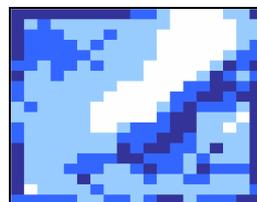
Belegungsdichte Map Lacton **2c2**

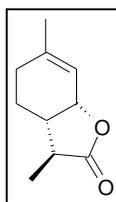
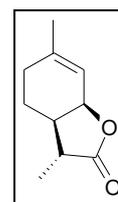
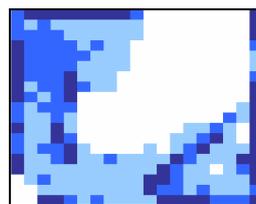
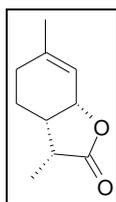
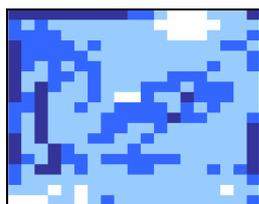
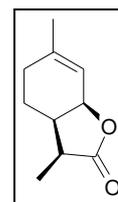
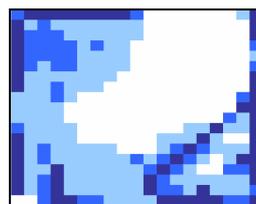
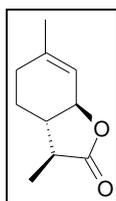
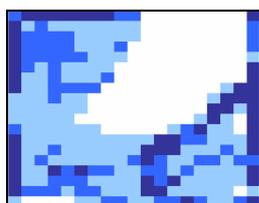
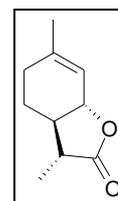
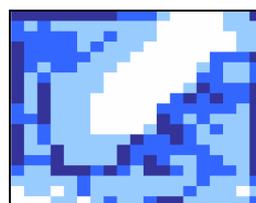
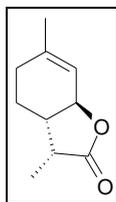
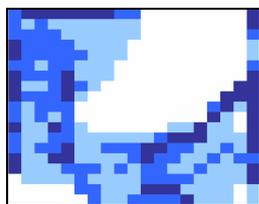
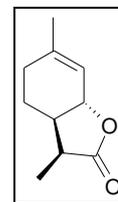
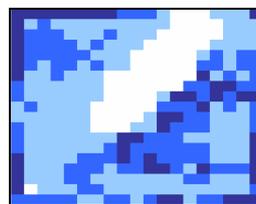


Belegungsdichte Map Lacton **2d1**



Belegungsdichte Map Lacton **2d2**

Belegungsdichte Map Lacton **2e1**Belegungsdichte Map Lacton **2e2**Belegungsdichte Map Lacton **2f1**Belegungsdichte Map Lacton **2f2**Belegungsdichte Map Lacton **2g1**Belegungsdichte Map Lacton **2g2**Belegungsdichte Map Lacton **2h1**Belegungsdichte Map Lacton **2h2**

Belegungsdichte Map Lacton **1a1**Belegungsdichte Map Lacton **1b1**Belegungsdichte Map Lacton **1c1**Belegungsdichte Map Lacton **1d1**Belegungsdichte Map Lacton **1e**Belegungsdichte Map Lacton **1f**Belegungsdichte Map Lacton **1g**Belegungsdichte Map Lacton **1h**

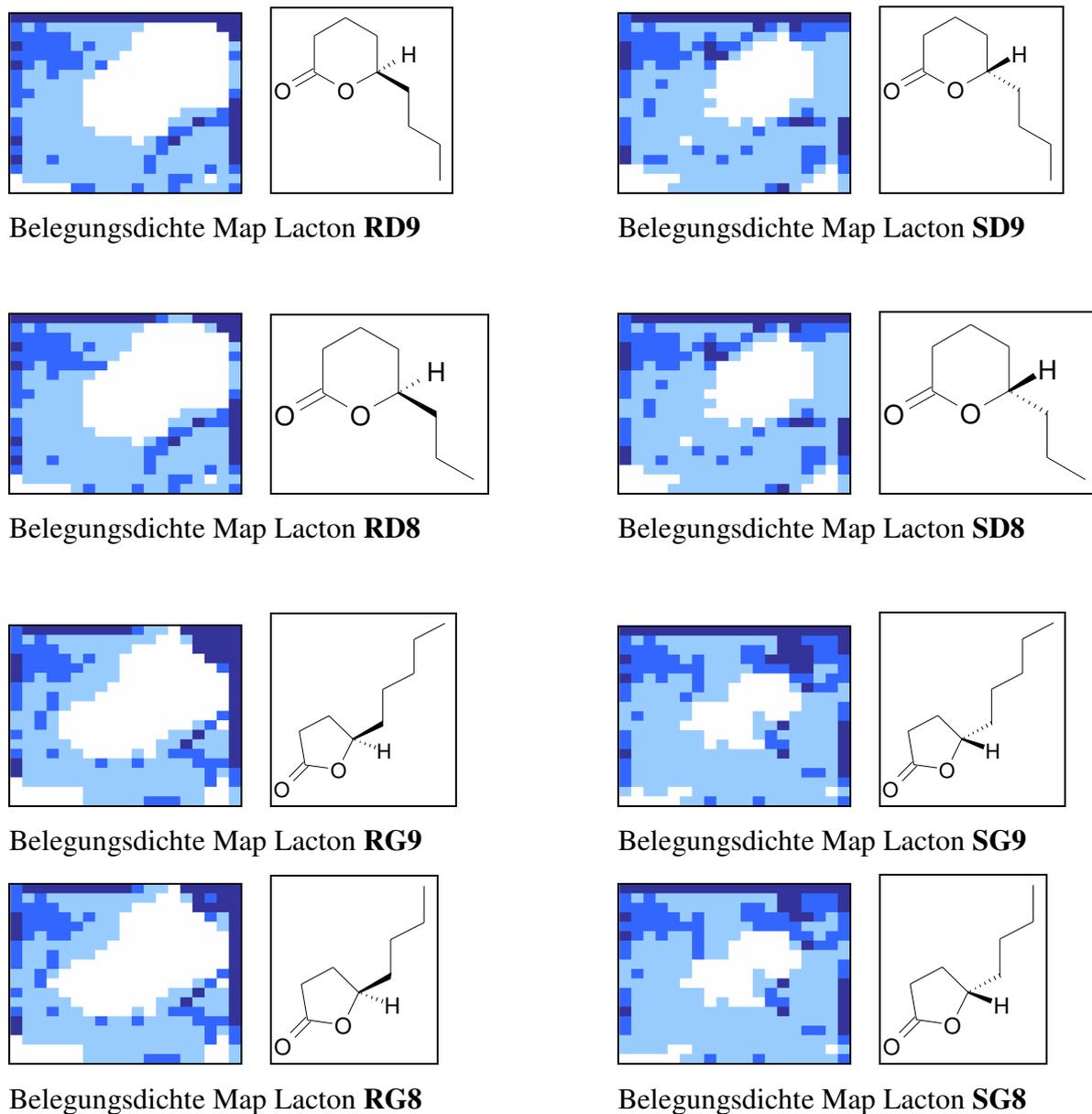


Abbildung 7.2: Kohonen Belegungsdichtemaps für einen Single Template Approach mit (3S, 3aS, 6R, 7aR)-3,6 Dimethyl-hexahydro-benzofuran-2-on (**2a1**) als Referenzmolekül. Die Anzahl der Oberflächenpunkte pro Neuron ist entsprechend der oben definierten Farbkodierung auf den Netzwerkkarten abgebildet.

7.5.2. Ähnlichkeitsstudie mittels Neuronaler Netze nach Kohonen mit Leitstruktur aus vier überlagerten bicyclischen Lactonen und unter Berücksichtigung des gesamten Datensatzes (Kapitel 3.3.1.2.2.)

Kohonen Maps mit abgebildeter Belegungsdichte

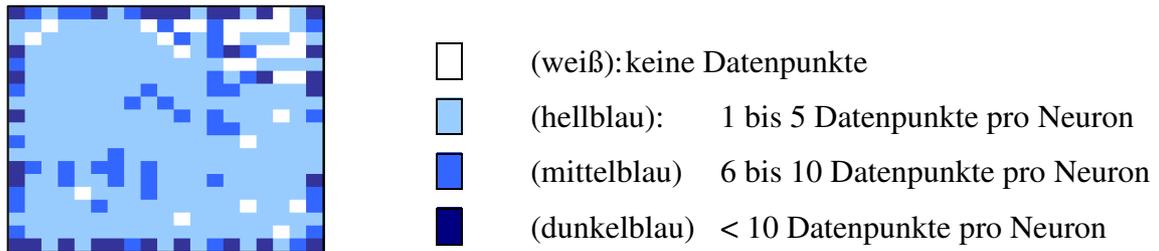


Abbildung 7.3: Belegungsdichte Map nach Kohonen für die Leitstruktur aus den 4 bicyclischen Lactonen **1a1**, **1a2**, **2a1** und **2a2** und Farbkodierungsskala für **Abbildungen 7.3 -7.6**

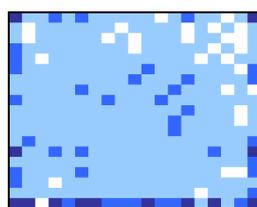
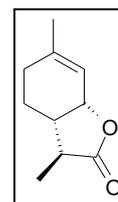
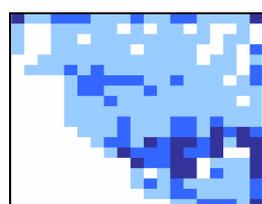
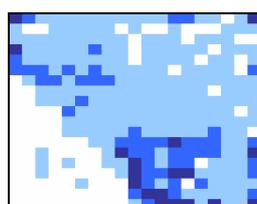
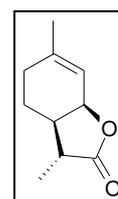
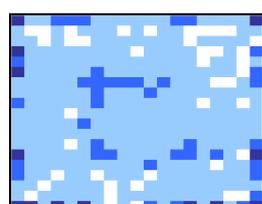
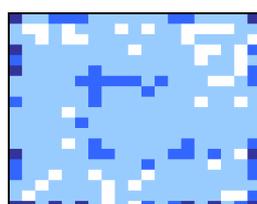
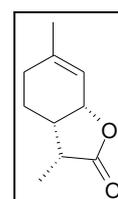
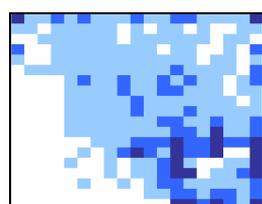
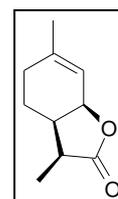
Konformer 1 (**1a1**)Konformer 2 (**1a2**)Belegungsdichte Maps Lacton **1a**Konformer 1 (**1b1**)Konformer 2 (**1b2**)Belegungsdichte Maps Lacton **1b**Konformer 1 (**1c1**)Konformer 2 (**1c2**)Belegungsdichte Maps Lacton **1c**Konformer 1 (**1d1**)Konformer 2 (**1d2**)Belegungsdichte Maps Lacton **1d**

Abbildung 7.4: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählter Konformere der cis-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**

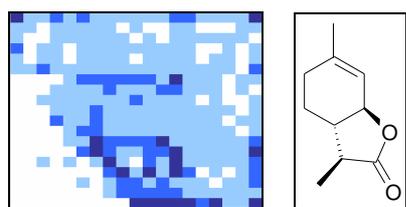
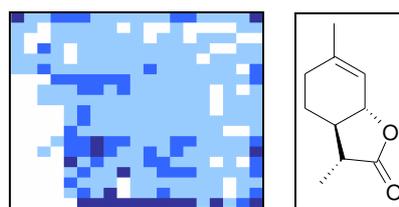
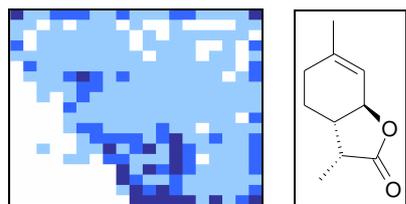
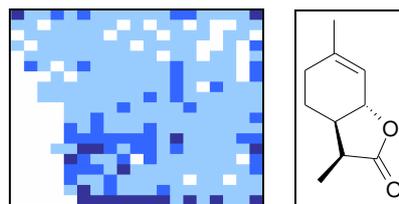
Belegungsdichte Map Lacton **1e**Belegungsdichte Map Lacton **1f**Belegungsdichte Map Lacton **1g**Belegungsdichte Map Lacton **1h**

Abbildung 7.5: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählter Konformere der trans-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,7a-Tetrahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**

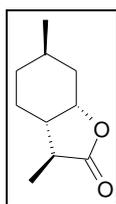
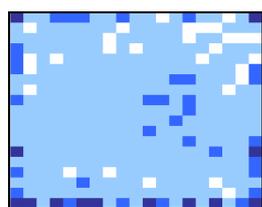
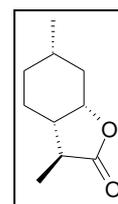
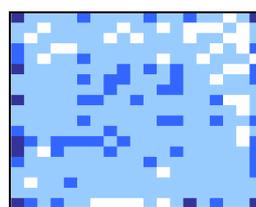
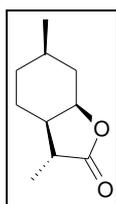
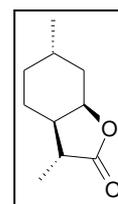
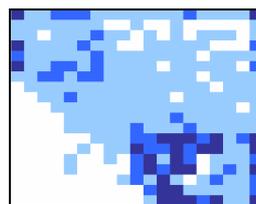
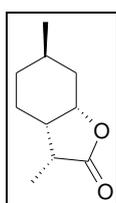
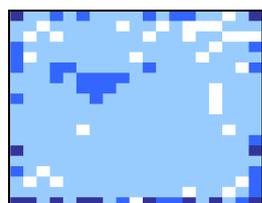
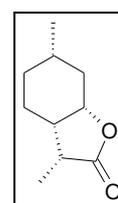
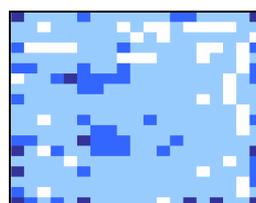
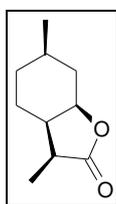
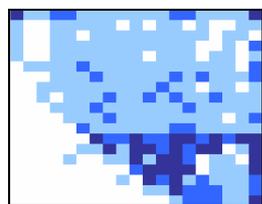
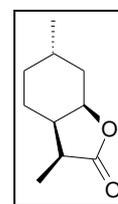
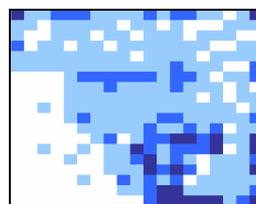
Belegungsdichte Map Lacton **2a1**Belegungsdichte Map Lacton **2a2**Belegungsdichte Map Lacton **2b1**Belegungsdichte Map Lacton **2b2**Belegungsdichte Map Lacton **2c1**Belegungsdichte Map Lacton **2c2**Belegungsdichte Map Lacton **2d1**Belegungsdichte Map Lacton **2d2**

Abbildung 7.6: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die 8 cis-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**

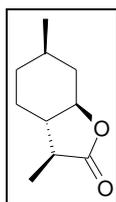
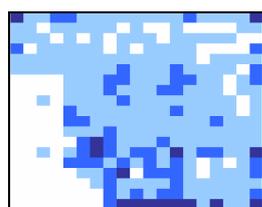
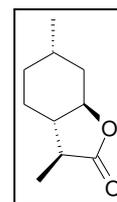
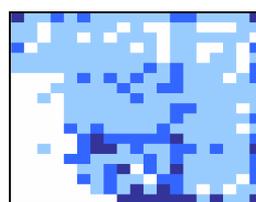
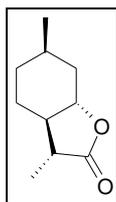
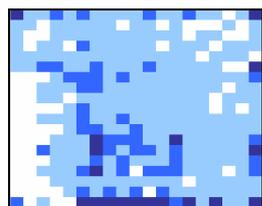
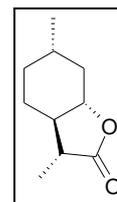
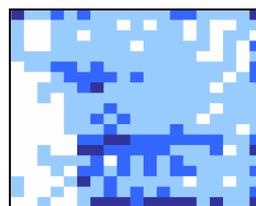
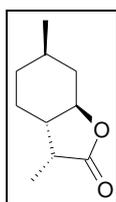
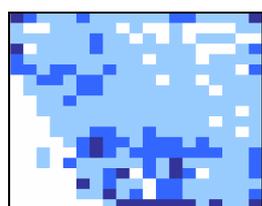
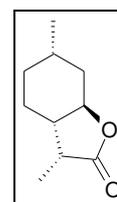
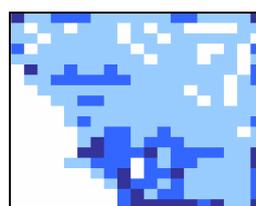
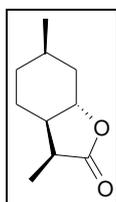
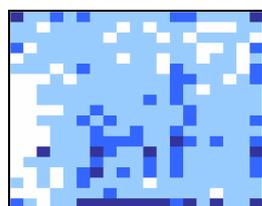
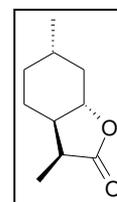
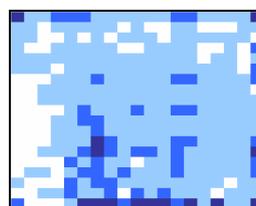
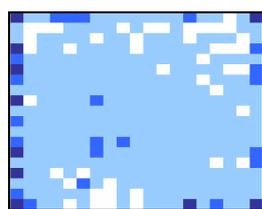
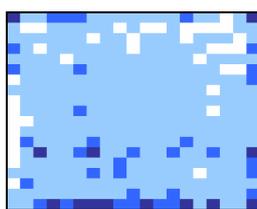
Belegungsdichte Map Lacton **2e1**Belegungsdichte Map Lacton **2e2**Belegungsdichte Map Lacton **2f1**Belegungsdichte Map Lacton **2f2**Belegungsdichte Map Lacton **2g1**Belegungsdichte Map Lacton **2g2**Belegungsdichte Map Lacton **2h1**Belegungsdichte Map Lacton **2h2**

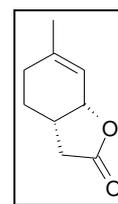
Abbildung 7.7: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für die 8 trans-konfigurierten Stereoisomere von 3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-3,6-dimethyl-2(3H)-benzofuranon. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**



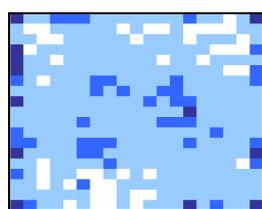
Konformer 1 (7c1)



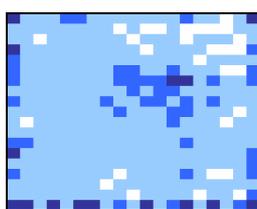
Konformer 2 (7c2)



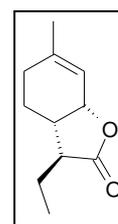
Belegungsdichte Map Lacton 7



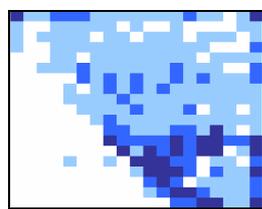
Konformer 1 (Ethyl1)



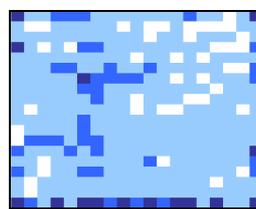
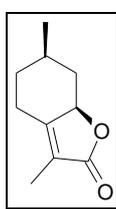
Konformer 2 (Ethyl2)



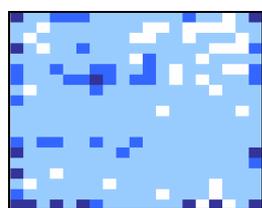
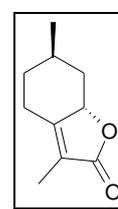
Belegungsdichte Map Lacton Ethylweinlacton



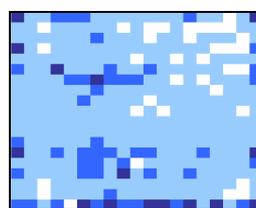
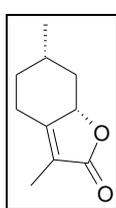
Belegungsdichte Map Mintlacton



Belegungsdichte Map Iso-mintlacton



Belegungsdichte Map E-Mintlacton



Belegungsdichte Map Dehydromintlacton

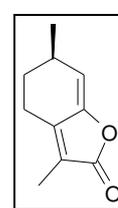


Abbildung 7.8: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählte Konformere weiterer bicyclischer Lactone. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**.

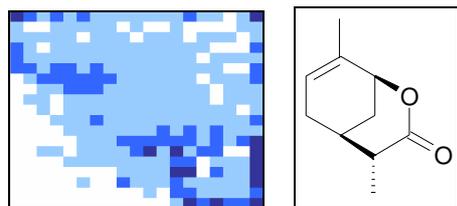
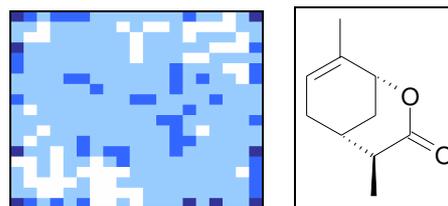
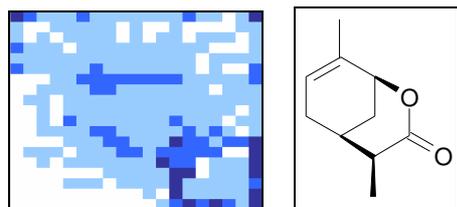
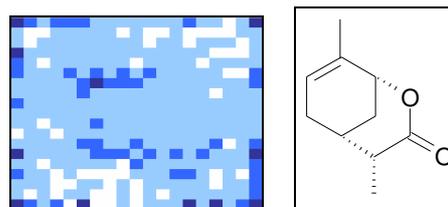
Belegungsdichte Map Lacton **3a**Belegungsdichte Map Lacton **3b**Belegungsdichte Map Lacton **3c**Belegungsdichte Map Lacton **3d**

Abbildung 7.9: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für ausgewählte Konformere weiterer bicyclischer Lactone. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**

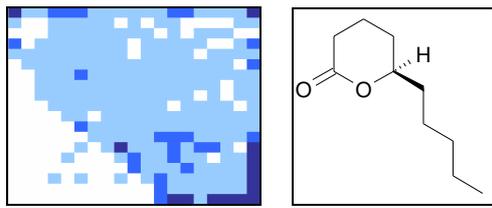
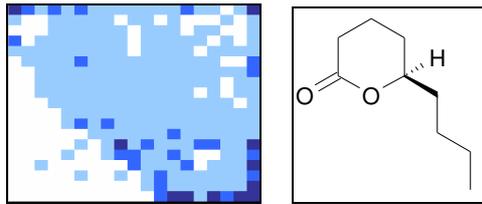
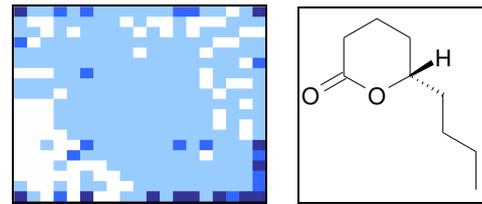
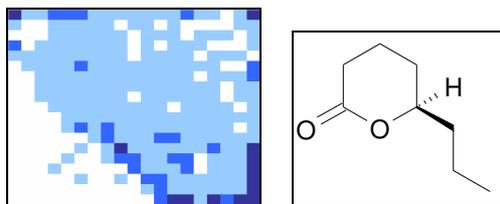
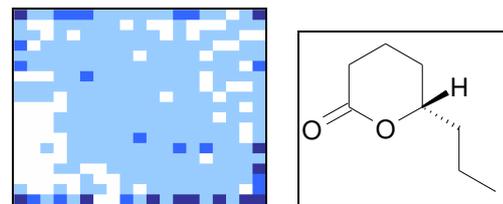
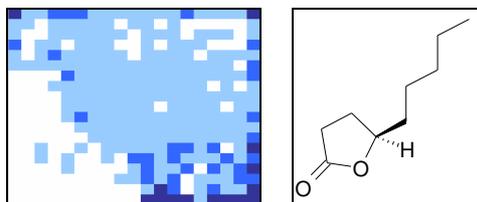
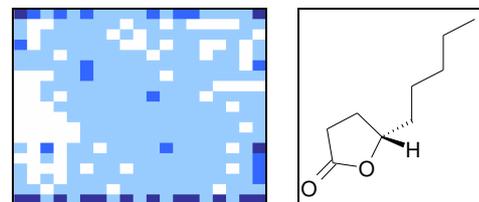
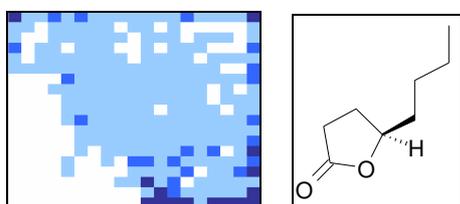
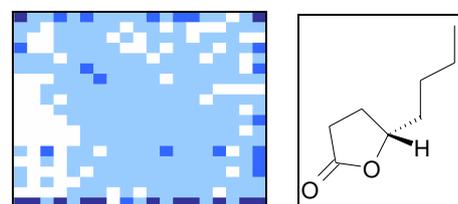
Belegungsdichte Map R- δ -Decalacton (**RD10**)Map R- δ -Nonalacton (**RD9**)Map S- δ -Nonalacton (**SD9**)Map R- δ -Octalacton (**RD8**)Map S- δ -Octalacton (**SD8**)Map R- γ -Nonalacton (**RG9**)Map S- γ -Nonalacton (**RG8**)Map R- γ -Octalacton (**RG8**)Map S- γ -Octalacton (**SG8**)

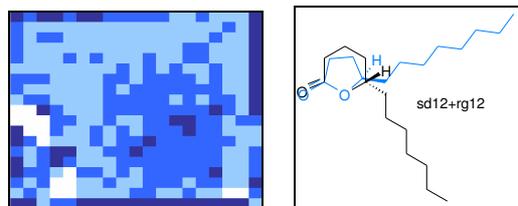
Abbildung 7.10: Belegungsdichte Maps nach Kohonen monocyclische Lactone der Geruchsqualität kokosartig. Farbkodierungsskala siehe **Abbildung 7.3**

7.5.3. Kohonen Maps zur Untersuchung Monocyclischer Lactone der Geruchsqualitäten pfirsich: Untersuchung von Struktur-Geruchsbeziehungen mit der energetisch günstigsten Molekülkonformation im Vergleich zu einem dynamischen Ansatz (Kapitel 3.3.2)

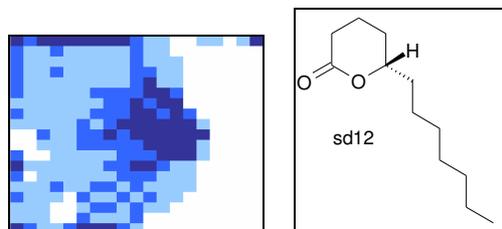
7.5.3.1. Nichtdynamischer Ansatz

Leitstruktur; Farbkodierung für die abgebildete Belegdichte

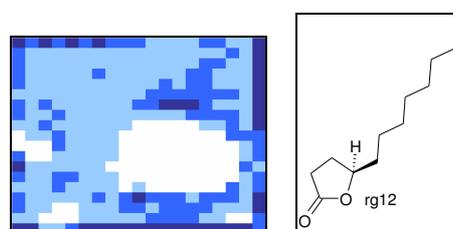
-  (weiß): keine Datenpunkte
-  (hellblau): 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron
-  (mittelblau) 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron
-  (dunkelblau) mehr als 10 Datenpunkte pro Neuron



Belegdichte Map, Training mit **sd12** und **rg12**



Bel.dichte Map Referenzmolekül 1 (**sd12**)



Bel.dichte Map Referenzmolekül 2 (**rg12**)

Abbildung 7.11: Belegdichte Maps nach Kohonen für die nichtdynamische Leitstruktur aus S- δ -Dodeca- und R- γ -Dodecalacton

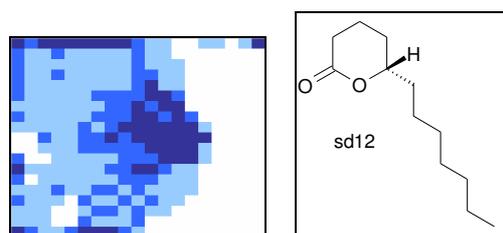
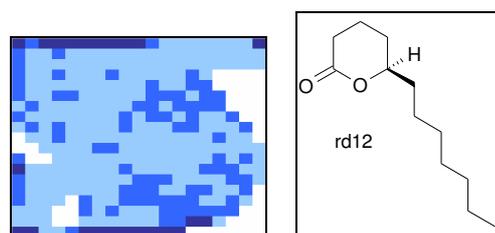
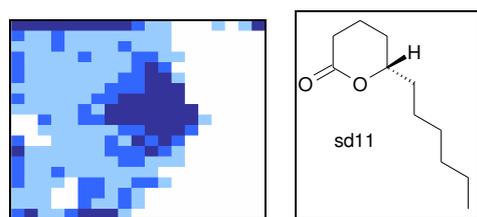
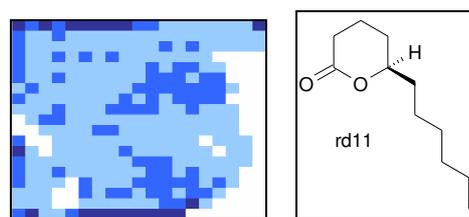
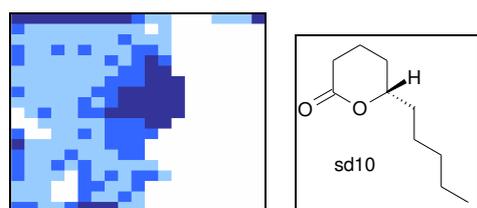
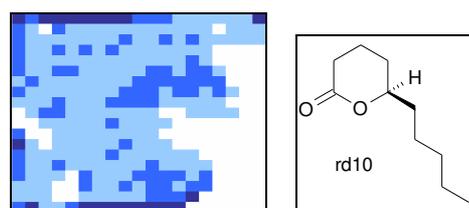
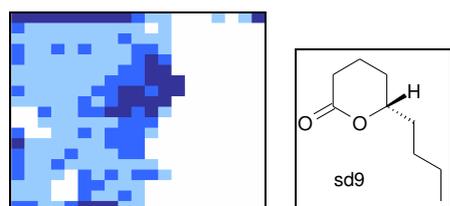
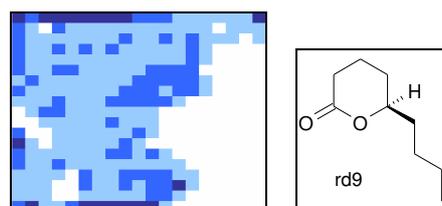
Nichtdynamischer Ansatz, δ -LactoneBelegungsdichte Map Lacton **sd12**Belegungsdichte Map Lacton **rd12**Belegungsdichte Map Lacton **sd11**Belegungsdichte Map Lacton **rd11**Belegungsdichte Map Lacton **sd10**Belegungsdichte Map Lacton **rd10**Belegungsdichte Map Lacton **sd9**Belegungsdichte Map Lacton **rd9**

Abbildung 7.12: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische δ -Lactone des nichtdynamischen Ansatzes. Farbkodierung gemäß **Abbildung 7.11**

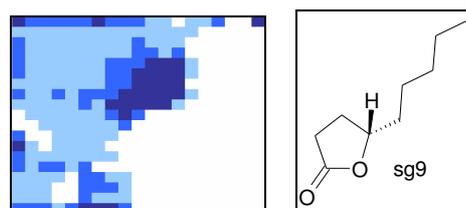
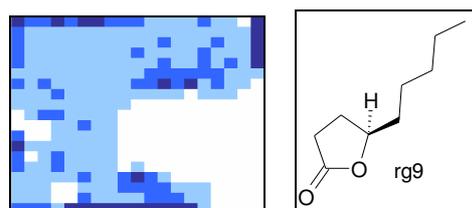
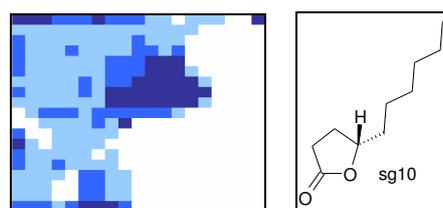
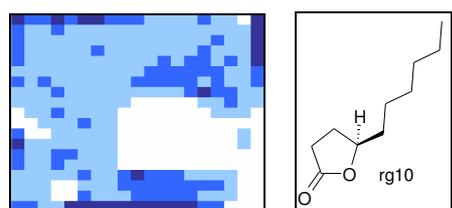
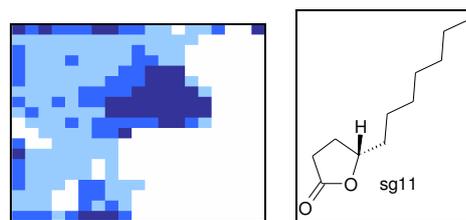
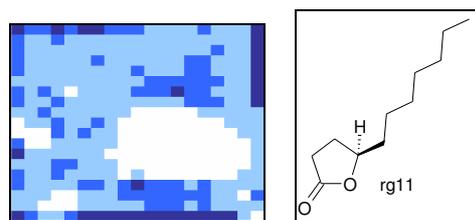
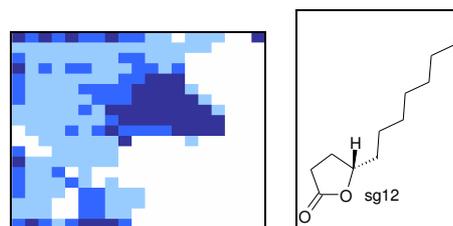
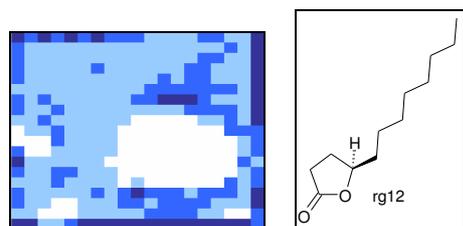
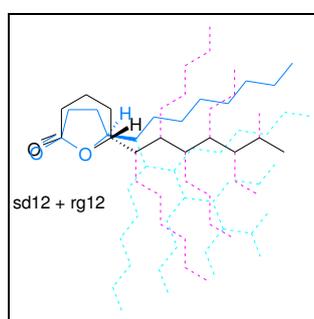
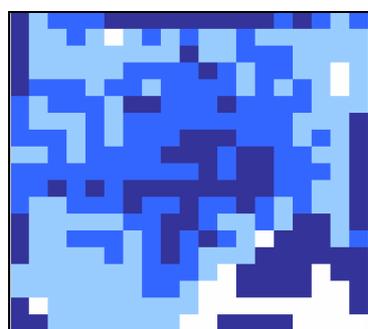
Nichtdynamischer Ansatz, γ -LactoneBelegungsdichte Map Lacton **rg9**Belegungsdichte Map Lacton **sg9**

Abbildung 7.13: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische γ -Lactone aus dem nichtdynamischen Ansatz. Farbkodierung gemäß **Abbildung 7.11**

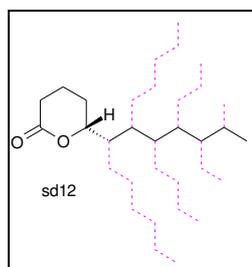
7.5.3.2. Dynamischer Ansatz

Leitstruktur; Farbkodierung für die abgebildete Belegungsdichte

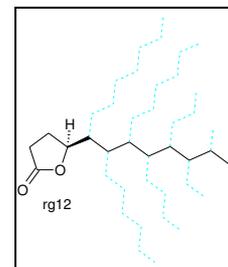
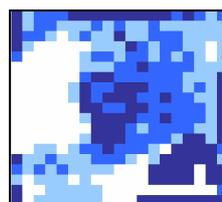
| | | |
|---|---------------|------------------------------------|
|  | (weiß): | keine Datenpunkte |
|  | (hellblau): | 1 bis 5 Datenpunkte pro Neuron |
|  | (mittelblau): | 6 bis 10 Datenpunkte pro Neuron |
|  | (dunkelblau): | mehr als 10 Datenpunkte pro Neuron |



Belegungsdichte Map, Training mit **sd12** und **rg12**



Bel.dichte Map Referenzmolekül 1, **sd12**



Bel.dichte Map Referenzmolekül 2, **rg12**

Abbildung 7.13: Belegungsdichte Maps nach Kohonen die dynamische Leitstruktur aus S- δ -Dodecalacton und R- γ -Dodecalacton. Farbige gestrichelte bindungen symbolisieren die freie Beweglichkeit der Seitenkette.

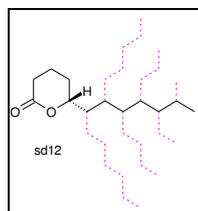
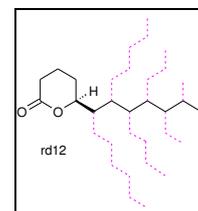
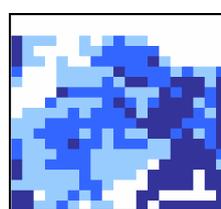
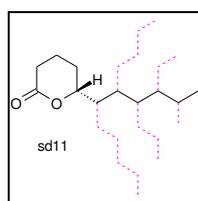
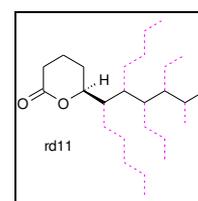
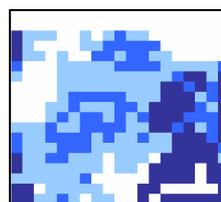
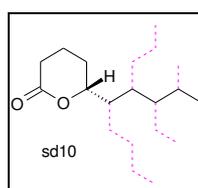
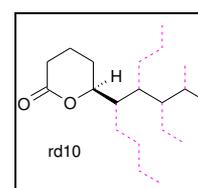
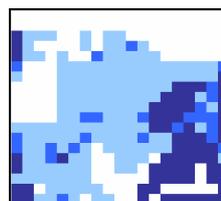
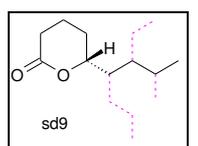
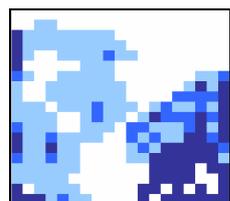
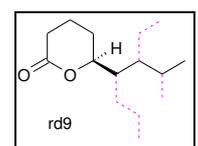
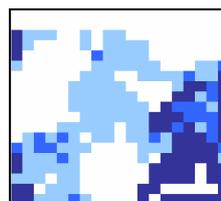
Dynamischer Ansatz, δ -LactoneBelegungsichte Map Lacton **sd12**Belegungsichte Map Lacton **rd12**Belegungsichte Map Lacton **sd11**Belegungsichte Map Lacton **rd11**Belegungsichte Map Lacton **sd10**Belegungsichte Map Lacton **rd10**Belegungsichte Map Lacton **sd9**Belegungsichte Map Lacton **rd9**

Abbildung 7.15: Belegungsichte Maps nach Kohonen für monocyclische δ -Lactone, dynamischer Ansatz. Farblich gestrichelte Bindungen symbolisieren die freie Beweglichkeit der Seitenkette. Farbkodierungsskala gemäß **Abbildung 7.14**

Dynamischer Ansatz, γ -Lactone

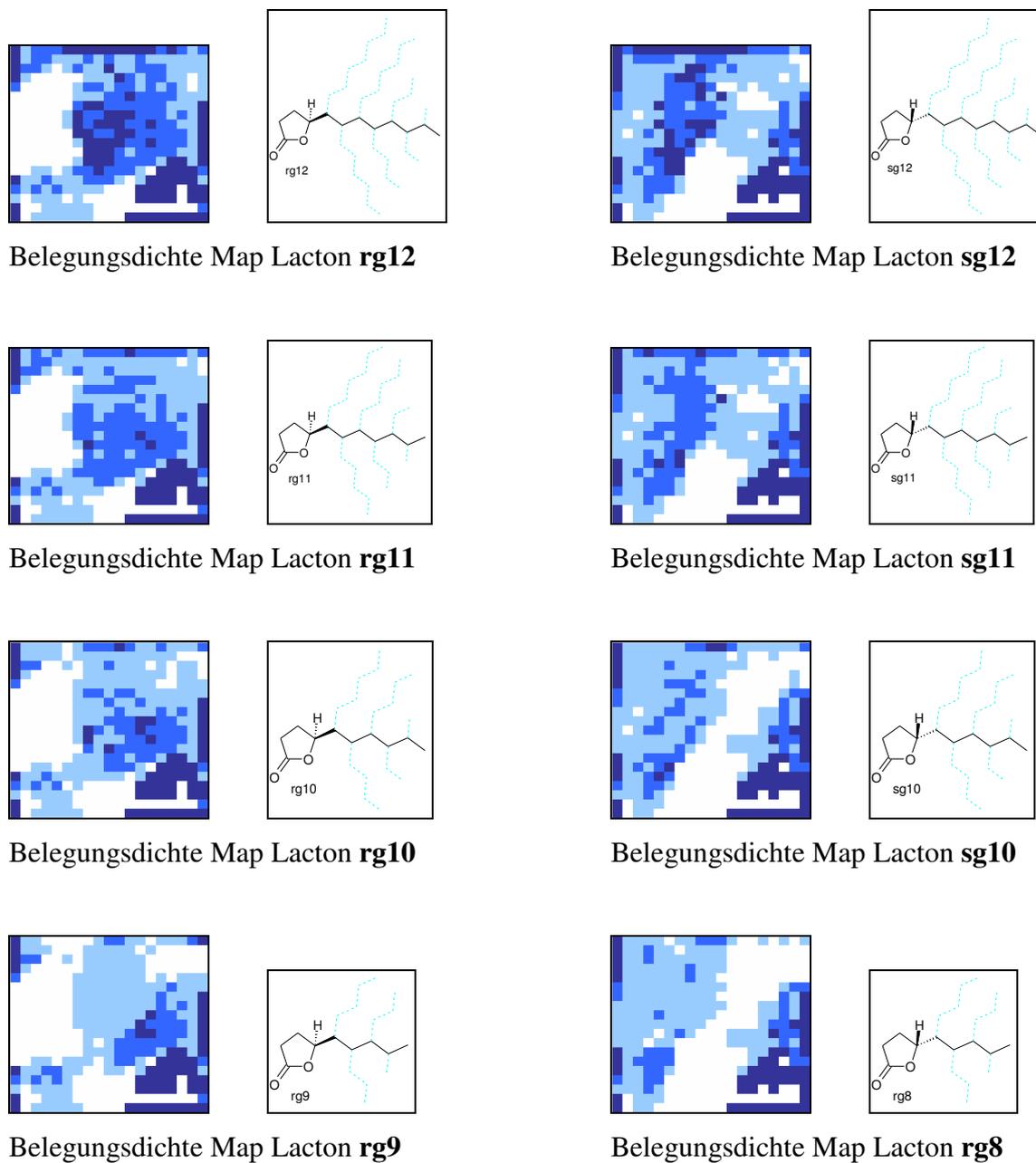


Abbildung 7.16: Belegungsdichte Maps nach Kohonen für monocyclische γ -Lactone, dynamischer Ansatz. Farblich gestrichelte Bindungen symbolisieren die freie Beweglichkeit der Seitenkette. Farbkodierungsskala gemäß **Abbildung 7.14**