

**Untersuchungen zur Biosynthese von  
Capsaicinoiden – Vorkommen und Einfluss von  
Acyl-Thioestern auf das Fettsäuremuster der  
Vanillylamide in *Capsicum spp.***

Dem Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der  
Bergischen Universität Wuppertal  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

Roland Thiele

Wuppertal 2008

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20080466

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20080466>]

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2004 bis August 2007 im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften an der Bergischen Universität Wuppertal in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Petz angefertigt.

Holzhacken ist deshalb so beliebt,  
weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein

## Abstract

Plants of the genus *Capsicum* (e.g. bell pepper and chili pepper) are among the oldest cultivated plants. Their fruits are used as spice for over 8000 years, as archaeological findings on millstones and pottery show. Pungency, a quality criterion in chili, is caused by a group of vanillylamides, the capsaicinoids. They are a unique category of alkaloids restricted to the genus *Capsicum*. More than 30 capsaicinoids, differing only in the fatty acid structures, have been described.

Capsaicinoids are synthesised by an enzymatic condensation of vanillylamine, a phenyl propanoid intermediate, and saturated and trans-monounsaturated fatty acids of medium chain length. The formation of the characteristic methyl-branched fatty acids starts from valine, leucine and isoleucine respectively their corresponding 2-oxocarboxylic acids. During the acyl chain elongation the intermediate is probably bound to acyl carrier protein (ACP). The enzyme capsaicin synthase (CS) accepts the fatty acids as Coenzyme A (CoA) derivatives. No further modifications of the fatty acid moieties are taking place after the condensation to the amide. Several enzymes, involved in capsaicin biosynthesis, are well characterised but the regulation of the pathway is not fully understood.

Considering the economic and agricultural importance of this pathway, it is surprising that relatively little is known, about how environmental influences affect the capsaicin content at the molecular level, concerning the pools of precursors required for pungency accumulation in chili. Hence control points for breeding species with a more evenly capsaicinoid content and defined pattern are searched for by several research groups.

Our research aim to detect the postulated acyl-ACP and acyl-CoA derivatives in placenta tissue, the place of capsaicinoid biosynthesis. By a modified method according to Kopka et al., it was possible to extract, separate and identify the acyl-thioesters, such as acyl-ACP, by selective formation of acyl-butylamides and subsequent analysis by gas chromatography/mass spectrometry. The reaction is specific for thioester-linked acyl groups in aqueous solution. In order to obtain plants of defined origin, *capsicum* plants were cultivated in the university's own greenhouse.

Precursors of capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin have been detected in two different species of *capsicum spp.* as acyl-thioesters in a narrow time slot during adolescence. They are present in picomolar range and their distribution pattern matches with the capsaicinoid pattern determined in parallel by liquid chromatography.

It was the first time that an unsaturated fatty acid moiety has been found in the acyl-ACP pool and thereby gives hints of the existence of a desaturase activity close to the enzymatic chain elongation of the fatty acids characteristic for capsaicinoids.

# Dank

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2004 bis August 2007 im Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften an der Bergischen Universität Wuppertal in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Petz angefertigt.

Herrn Prof. Michael Petz gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die weitgehende Freiheit bei der Bearbeitung sowie die fachliche und moralische Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gebührt Frau Dr. Erika Müller-Seitz, die durch ihre außerordentliche fachliche Kompetenz und ihren unermüdlichen Elan es verstand, alle kleinen und etwas größeren Steine des Weges beiseite zu räumen. Sie hatte immer ein offenes Ohr, nicht nur für wissenschaftliche Belange, und sorgte dadurch für ein besonders motivierendes Arbeitsumfeld.

An Herrn Prof. Helmut Guth richtet sich mein Dank für die Übernahme des Korreferates und die vielen Stunden gemeinsamen Reparierens, Lötens und Schraubens am Massenspektrometer. Weiterhin war seine Expertise bei der Synthese und Charakterisierung der analytischen Standards eine wertvolle Hilfe. Vielen Dank.

Herrn Denis Heuser möchte ich herzlich für die im Rahmen seines Forschungspraktikums gemachten HPLC-Messungen zur Gehaltsbestimmung von Capsaicinoiden in Einzelfrüchten und Fruchtepools danken.

Frau Melanie Dausend möchte ich für die LC/MS-Messungen zur Untersuchung der Thioester-Modellverbindungen danken.

Vielen Dank an das Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben für das zur Verfügung gestellte Saatgut zur Kultivierung diverser *Capsicum pubescens* Varietäten.

Der feinmechanischen Werkstatt um Herrn Axel Brakelmann bin ich für die allzeit schnelle und unbürokratische Hilfe zu großem Dank verpflichtet.

Herzlichen Dank an Tim Kreuzer für die stellvertretende Pflege und Bewässerung der Chili-Pflanzen während der Urlaubszeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen für die gute Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen und das fantastische Arbeitsklima danken.

Meinen Eltern danke ich besonders herzlich dafür, dass sie mir die akademische Ausbildung ermöglichten und mich ohne Unterlass nach besten Kräften während der Durchführung dieser Arbeit unterstützten.

Es war nicht immer leicht Karinna - aber du warst ja da. Danke

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>DANK</b> .....	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
1.1 <i>Capsicum</i> – eine alte Kulturpflanze.....	8
1.2 Anatomie der Pflanzen und ihrer Früchte .....	14
1.3 Capsaicinoide- das scharfe Prinzip in Chilis .....	16
1.4 <b>Wirtschaftliche Bedeutung</b> .....	<b>19</b>
1.4.1 Lebensmittelsektor .....	19
1.4.2 Pharmazeutische Industrie .....	19
1.4.2.1 Capsaicin in der Schmerztherapie .....	19
1.4.2.2 Capsaicin in der Krebstherapie.....	20
1.4.2.3 Capsaicin zur Gewichtskontrolle und zur Therapie von Adipositas .....	20
<b>2 BIOSYNTHESE DER CAPSAICINOIDE</b> .....	<b>22</b>
2.1 Biosyntheseweg des Vanillylamins .....	22
2.2 <b>Biosynthese des Fettsäurerestes</b> .....	<b>27</b>
2.2.1 Fettsäurebiosynthese in Pflanzen .....	27
2.2.2 Ablauf und Regulation der Fettsäurebiosynthese der Capsaicinoide .....	28
2.2.2.1 <i>De novo</i> Fettsäurebiosynthese .....	28
2.2.2.2 Primer für die Fettsäurebiosynthese verzweigter Fettsäuren .....	31
2.2.2.3 Verlängerung der Fettsäurevorstufen bei Capsaicinoiden und Einfluss der FAS .....	33
2.2.2.4 Einfluss des ACP auf die Fettsäurebiosynthese .....	33
2.2.2.5 Einfluss der 3-Ketoacyl-ACP Synthase (KAS) auf die Fettsäurebiosynthese .....	34
2.2.2.6 Einfluss der Thioesterasen auf die Fettsäurebiosynthese.....	36
2.2.2.7 Einfluss der Acyl-CoA-Synthasen auf die Fettsäurebiosynthese .....	37
2.2.2.8 Einführung einer Doppelbindung in der Fettsäurebiosynthese .....	37
2.3 <b>Kondensation von Vanillylamin und Fettsäure zum Capsaicinoid</b> .....	<b>39</b>
2.3.1 Die Capsaicin-Synthase (CS).....	39
2.4 <b>Genetische Regulation der Capsaicinoid-Biosynthese</b> .....	<b>40</b>
<b>3 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>43</b>
<b>4 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE</b> .....	<b>45</b>
4.1 <b>Analytischer Ansatz</b> .....	<b>45</b>
4.1.1 Aminolyse-Reaktion und Analytik der <i>N</i> -Butylamide .....	48
4.1.2 Untersuchung der <i>N</i> -Butylamide mittels GC/MS .....	49
4.1.3 Responsefaktorbestimmung .....	51
4.1.3.1 Vergleich der Responsefaktoren von <i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid und <i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid in Bezug auf <i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid .....	53
4.1.3.2 Bestimmung des Responsefaktors ( <i>R<sub>f</sub></i> ) für <i>N</i> -Butyloctanamid relativ zu <i>N</i> -Butyl-2-methylhexanamid (ASTD) .....	54

4.1.3.3	Lineare Kalibration mit internem Chromatographie-Standard (ISTD) zur Bestimmung analytischer Grenzwerte .....	54
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung des Testsystems für Acyl-Thioester .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	Bestimmung des Octanoyl-Coenzym A-Gehaltes.....	56
4.2.2	Charakterisierung des n-Octanoyl-CoA Standards mittels LC-TOF-MS.....	57
4.2.3	Aminolyse-Reaktion mit Octanoyl-Coenzym A .....	58
4.2.4	Verluste von Acyl-Coenzym A während der Anreicherung an DEAE-Sepharose .....	60
4.2.4.1	Verteilung der Thioester auf verschiedene Fraktionen bei der Elution mit unterschiedlichen Ionenstärken an LiCl .....	60
4.2.4.2	Wiederfindung von Octanoyl-CoA während der Festphasenanreicherung und Verluste durch Waschschrte .....	62
4.2.4.3	Wiederfindung nach der Aminolyse.....	63
<b>4.3</b>	<b>Kontrollexperimente.....</b>	<b>66</b>
4.3.1	Verhalten der Capsaicinoide während der Acyl-CoA-Anreicherung und der Aminolyse-Reaktion...66	
4.3.2	Enthalten Speicherlipide capsaicinoidtypische Fettsäuren?.....	69
4.3.3	Sind im Pflanzenmaterial (Plazenten) freie Fettsäuren nachweisbar?.....	71
4.3.4	Umsetzung freier Fettsäuren bei der Aminolyse-Reaktion .....	72
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung von Chili-Früchten.....</b>	<b>75</b>
4.4.1	<i>Capsicum chinense</i> var. <i>Habanero</i> .....	75
4.4.1.1	Nachweis von Acyl-CoA's in Pflanzenmaterial ( <i>Capsicum chinense</i> var. <i>Habanero orange</i> , 1. Ernte) .....	75
4.4.1.2	Nachweis von Acyl-Thioestern in Fruchtmaterial ( <i>Capsicum chinense</i> var. <i>Habanero orange</i> ) definierten Alters. ....	77
4.4.2	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> .....	86
4.4.2.1	Nachweis von Thioestern in Pflanzenmaterial ( <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> ) .....	86
4.4.2.2	Getrennte Messung von Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als <i>N</i> -Butylamide in unreifen Chili-Früchten ( <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> ) mit gestufter Elution .....	89
4.4.2.3	Messung von Acyl-CoA's als <i>N</i> -Butylamide in unreifen Chili-Früchten ( <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> ).....	92
4.4.2.4	Messung von Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als <i>N</i> -Butylamide in unreifen Chili-Früchten ( <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> ) nach gestufter Elution.....	94
4.4.2.5	Messung von Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als <i>N</i> -Butylamide in vollreifen Chili-Früchten ( <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> ).....	99
4.4.2.6	Untersuchung von Einzelfrüchten auf die 3 Hauptcapsaicinoide mittels HPLC/Fluoreszenz in <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> .....	100
4.4.2.7	Untersuchungen zur Fruchtentwicklung bei <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> .....	102
4.4.3	<i>Capsicum pubescens</i> var. <i>Yellow Tree Pepper Rocot</i> .....	105
4.4.3.1	Messung des Musters von Acyl-CoA's in <i>Capsicum pubescens</i> var. <i>CAP 1033</i> .....	105
4.4.3.2	Messung der Capsaicinoidmuster in <i>Capsicum annuum</i> var. <i>CAP 1033</i> .....	108
4.4.4	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>Tinkerbelle</i> .....	109
4.4.4.1	Messung des Musters von Acyl-Thioestern in reifen <i>Capsicum</i> -Früchten der Varietät <i>Capsicum annuum</i> var. „ <i>Tinkerbelle</i> “ .....	109
4.4.4.2	Messung des Musters von Acyl-Thioestern in unreifen <i>Capsicum</i> -Früchten der Varietät <i>Capsicum annuum</i> var. „ <i>Tinkerbelle</i> “ .....	111
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>113</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion zur Methodenentwicklung.....</b>	<b>113</b>
5.1.1	Charakterisierung der Methode zur gestuften Elution der Thioester .....	115
5.1.2	Kontrollexperimente .....	116
5.1.3	Quantifizierung .....	117
5.1.4	Fazit zur Methodenentwicklung:.....	119
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse aus der Untersuchung des Pflanzenmaterials.....</b>	<b>120</b>
5.2.1	Vorüberlegungen zur Wahl des Pflanzenmaterials .....	120
5.2.2	Erstmaliger Nachweis von Acyl-Thioestern in <i>Capsicum spp.</i> .....	121
5.2.3	Einführung der Doppelbindung in die 8-Methyl-6-nonansäure .....	122
5.2.4	Bestimmung des Acyl-ACP-Musters.....	123

5.2.4.1	Acyl-ACP-Muster in <i>Capsicum chinense</i> var. <i>Habanero</i> .....	123
5.2.4.2	Acyl-ACP-Muster in <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> .....	123
5.2.5	Bestimmung des Acyl-CoA-Musters .....	124
5.2.5.1	Acyl-CoA-Muster in <i>Capsicum chinense</i> var. <i>Habanero</i> .....	124
5.2.5.2	Acyl-CoA-Muster in <i>Capsicum annuum</i> var. <i>Jalapeno</i> .....	124
5.2.6	Weitere Aspekte zur Bestimmung der Acyl-Thioester .....	125
5.2.7	Bestimmung der Capsaicinoid-Muster .....	125
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>ARBEITSVORSCHRIFTEN .....</b>	<b>128</b>
<b>7.1</b>	<b>HPLC-Fluoreszenz .....</b>	<b>128</b>
7.1.1	Qualifizierung der Analyten .....	129
7.1.2	Quantifizierung der Analyten .....	131
<b>7.2</b>	<b>LC-TOF-MS .....</b>	<b>134</b>
<b>7.3</b>	<b>Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Capsaicinoide in Einzelfrüchten .....</b>	<b>135</b>
<b>7.4</b>	<b>Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Capsaicinoide in Zentrifugationsrückständen .....</b>	<b>137</b>
<b>7.5</b>	<b>GC/MS .....</b>	<b>137</b>
7.5.1	Arbeitsvorschrift zur linearen Kalibration mit ISTD zur Bestimmung analytischer Grenzwerte .....	138
<b>7.6</b>	<b>Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Acyl-Thioester in Früchtepools .....</b>	<b>138</b>
<b>7.7</b>	<b>Synthese analytischer Standards .....</b>	<b>141</b>
7.7.1	Synthese von <i>N</i> -Butylamiden aus Carbonsäurechloriden .....	141
7.7.2	Synthese von <i>N</i> -Butylamiden aus Carbonsäuren .....	142
7.7.3	Charakterisierung der synthetisierten analytischen Standards mittels <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR und GC-MS .....	143
7.7.3.1	<i>N</i> -Butyloctanamid .....	143
7.7.3.2	<i>N</i> -Butyldecanamid .....	144
7.7.3.3	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid .....	145
7.7.3.4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid .....	146
7.7.3.5	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6- <i>trans</i> -nonenamid .....	147
<b>7.8</b>	<b>Pflanzenanbau im Gewächshaus .....</b>	<b>148</b>
7.8.1	Bezugsquellen für Saatgut .....	148
7.8.2	Aussaat .....	148
7.8.3	Pikieren und Umtopfen .....	148
7.8.4	Bedingungen im Gewächshaus .....	148
7.8.5	Düngung .....	149
7.8.6	Pflanzenkrankheiten .....	149
7.8.7	Schädlingsbefall .....	150
7.8.8	Bestäubung .....	150
7.8.9	Ernte .....	150
<b>7.9</b>	<b>Substanzen und Laborbedarf .....</b>	<b>150</b>
7.9.1	Verwendete Chemikalien .....	150
7.9.2	Glasgeräte und sonstiger Laborbedarf .....	151
7.9.3	Technische Laborgeräte .....	152
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>154</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 *Capsicum* – eine alte Kulturpflanze

Die Gattung *Capsicum*, welche ihren Ursprung in Süd- und Mittelamerika hat, ist heutzutage in vielen Ländern der Erde verbreitet. Eshbaugh stellte die Hypothese auf, dass der Genus *Capsicum* seinen Ursprung in Bolivien habe. Er stellte aber auch klar, dass Bolivien nicht zwangsläufig die Wiege der domestizierten Arten sein müsse und vermutete diese für *Capsicum annuum* eher in Mexiko (1). Als eine der ältesten Kulturpflanzen wurde sie schon vor mehr als ca. 8000 Jahren zur Ernährung verwendet und seit etwa 6000 v. Chr. als Kulturpflanze angebaut. Die Chili-Pflanze wurde in Mittelamerika, u.a. auf dem heutigen Staatsgebietes Mexikos (*Capsicum annuum*), in der Andenregion Südamerikas (*Capsicum baccatum*) und im tropischen Flachland u.a. in Brasilien (*Capsicum chinense*) domestiziert, was zweifelsfrei durch archäologische Funde belegt werden konnte (2-4). Perry et al. belegten anhand von *Capsicum*-Stärkekörnchen, welche sich z.B. an Mühlsteinen und Töpferwaren befanden, eindeutig die frühe Domestikation dieser Pflanzen. Die Stärkekörner von *Capsicum* unterscheiden sich eindeutig von denen anderer Solanaceae und selbst die Unterscheidung Wild-Typ versus domestiziertem *Capsicum* ist mit dieser Methode möglich. Spuren domestizierter *Capsicum*-Arten wurden in sieben Regionen von den Bahamas bis zu den peruanischen Anden gefunden (s. Tabelle 1-1). Die ältesten Spuren fanden Perry et al. bei der Ausgrabung eines kleinen Dorfes im Südwesten Ecuador und bestimmten das Alter mit 6100 Jahren (2).

**Tabelle 1-1 Archäologische *Capsicum*-Funde von gut datierten Fundstellen mit klar definierter Schichtengeologie (2)**

Art	Pflanzenteil	Region	Fundstelle	Alter in Jahren
<i>C. annuum</i>	Frucht	Mexiko	Tehuacan Valley	500-6000
<i>C. annuum</i>	Samen und Stiele	El Salvador	Ceren	1400
<i>C. baccatum</i>	Frucht	Peru	Huaca Prieta, Punta Grande	4000
<i>C. chinense</i>	Frucht	Peru	Huaca Prieta, Punta Grande	4000
<i>C. chinense</i>	Frucht	Peru	Casma Valley	ca. 2500-3500
<i>Capsicum spp.</i>	Samen	Haiti	En Bas Saline	600
<i>Capsicum spp.</i>	Pollen	Venezuela	La Tigra	450-1000

Ebenso wie die Tomate (*Solanum lycopersicum*), die Aubergine (*Solanum melongena*), die Tabakpflanze (*Nicotiana*) oder beispielsweise auch die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gehört die Chili- bzw. Paprikapflanze zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*). Mit der Entdeckung der neuen Welt gelangten durch die ersten Seefahrer, wie Christopher Columbus, die *Capsicum*-Pflanzen nach Europa. Von dort aus verbreiteten sich die Pflanzen über Handelswege (z.B. Seidenstrasse nach Asien) über den gesamten Globus. Zudem brachten portugiesische Seefahrer auf ihren Schiffen die Früchte und Samen von der Karibik, Süd- und Mittelamerika nach Afrika und Indien (5, 6). Durch Mutation, gezielte Züchtung und Kreuzung bildete sich in den letzten 500 Jahren eine kaum überschaubare Vielzahl an Varietäten der Gattung *Capsicum* heraus. Generell spricht man von mehr als 25 Arten, von denen 5 Hauptarten am weitesten verbreitet sind: *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* und *Capsicum pendulum* (auch: *C. baccatum* var. *pendulum*).

Der spanische Arzt Dr. Alvarez Chanca, welcher mit Kolumbus die neue Welt bereiste, beschrieb erstmals 1494 in Briefen an seinen Auftraggeber in Europa die *Capsicum*-Pflanze. Nach der Entdeckung der fremden Pflanzen durch Kolumbus wurden viele europäische Naturwissenschaftler darauf aufmerksam und begannen die *Capsicum*-Pflanzen zu erforschen. Etwa 50 Jahre nach der Entdeckung durch Kolumbus erstellte ein Tübinger Medizinprofessor namens Leonard Fuchs die ersten genauen Illustrationen der Chili-Pflanzen. Er unterschied dabei bereits 2 Spezies: „Langer Indianischer Pfeffer“ und „Breiter Indianischer Pfeffer“. Daran erkennt man auch, dass er zu dieser Zeit die Pflanze für indischen Ursprung hielt.

Hans Staden aus Hessen hatte gegen 1550 die Gelegenheit aus erster Hand Eindrücke bezüglich der Chili-Pflanzen zu sammeln. Als Gefangener brasilianischer „Indianer“, der Tupinamba, lernte er deren Bräuche kennen und beschrieb ebenfalls die Chilifrüchte: So findet man in seinem Reisebericht („Warhaftige Historia und Beschreibung eyner Landtschafft der wilden, nacketen, grimmigen Menschfresser Leuthen in der Newenwelt America gelegen“ von 1557) etwas über gelbe und grüne Schoten, die an strauchartigen Pflanzen wachsen, in reifem Zustand von Einheimischen getrocknet werden und im Mund brennen (6).

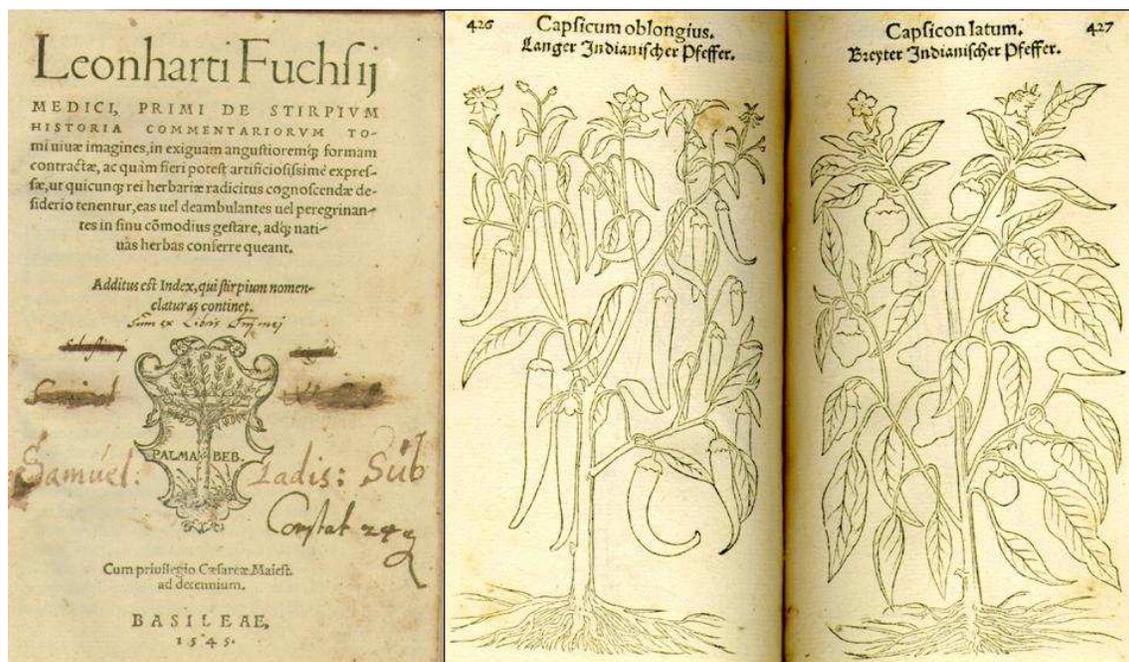


Abbildung 1-1 links: Kopie der ersten Seite aus dem von Leonard Fuchs 1545 zusammengestellten Kompendium zur Botanik rechts: Doppelseite mit der Darstellung zweier Chili-Pflanzen aus der Feder von L. Fuchs (7)

In der Folgezeit beschäftigten sich viele Europäer mit *Capsicum*-Pflanzen und -Früchten bis zur Mitte des 18. Jahrhunderts der schwedische Botaniker und Mediziner Carl von Linné erstmals versuchte Ordnung in die Pflanzenwelt zu bringen. Er führte die binäre Nomenklatur (bestehend aus Gattung und einem Attribut z.B.: *Capsicum annuum*) ein und wies den Chilis die Gattung *Capsicum* zu (6). Aus den Beschreibungen Carl von Linnés im Jahre 1753 gehen drei Arten des Genus *Capsicum* hervor: *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L. und *Capsicum frutescens* L..

Der Düsseldorfer Arzt Carl Anton Fingerhuth listet in seiner „Monographia Generis Capsici“ aus dem Jahr 1832 bereits 25 Spezies auf (8). Der Franzose Michel Felix Dunal, Professor für

Botanik, brachte es in seiner Abhandlung zur Taxonomie der Nachtschattengewächse im Jahr 1852 auf 50 Arten in der Gattung *Capsicum* (5). Ein halbes Jahrhundert später wurden dann durch H.C. Irish alle bekannten Arten systematisch den 2 Arten *Capsicum annuum* L. und *Capsicum baccatum* L. zugeordnet. Die Spezies *Capsicum frutescens* L. beschrieb er als mehrjährige Form von *Capsicum annuum* L. (5, 9). Der amerikanische Botaniker L. H. Bailey verkündete in seiner eigenen Zeitschrift „Gentes herbarium“ im Jahre 1923, dass sich die Gattung *Capsicum* nur auf eine Art beschränke, da ja schließlich auch *Capsicum annuum* eine mehrjährige Spezies sei. Er nannte lediglich *Capsicum frutescens* als alleinige Art der Gattung *Capsicum* (10).

Zwischen 1948 und 1957 trennten Paul G. Smith und Charles B. Heiser jr. die beiden Arten *C. frutescens* und *C. annuum* wieder. Weiterhin sorgten sie mit der Einführung der Art *C. pendulum* (heute *C. baccatum*) für weitere Konfusion (11). Als Smith und Heiser 1957 dann erstmals *Capsicum chinense* beschrieben, ordneten sie alle bis dato bekannten Spezies den schon zuvor erwähnten 5 Hauptarten zu (12). Das sind auch die bis heute domestizierten 5 Arten zu denen etwa 22 weitere Wildformen im Laufe der letzten 50 Jahre hinzukamen. Die Namen Eshbaugh, Heiser und Pickersgill sind mit diesen Untersuchungen z. T. heute noch eng verknüpft (5, 13-15).

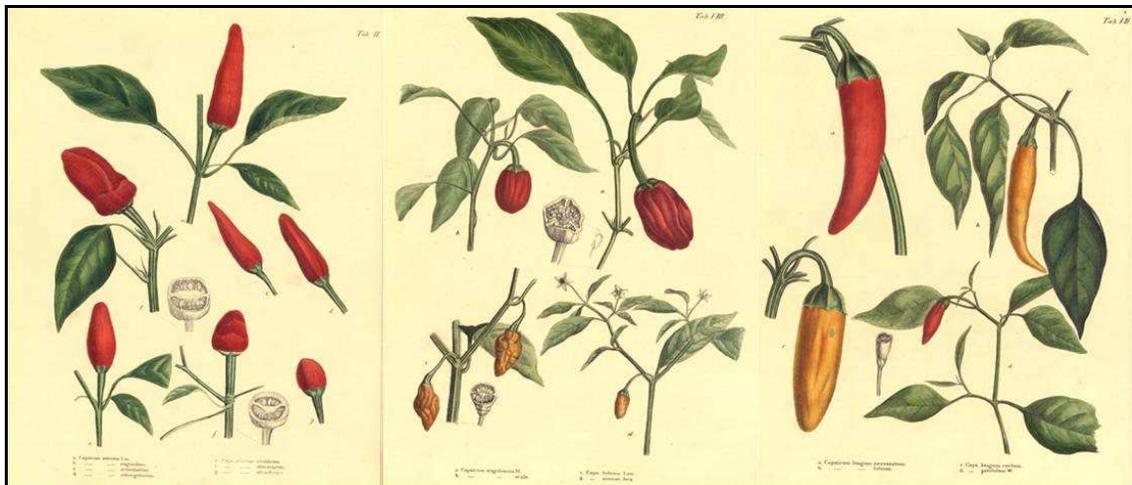


Abbildung 1-2 Die Abbildung zeigt drei Seiten des Anhanges der „Monographia Generis Capsici“ von Carl Anton Fingerhuth aus dem Jahr 1832 (16)

So vielfältig wie die verschiedenen Farben, Formen und Geschmacksrichtungen der *Capsicum*-Früchte, sind auch die regional spezifischen Bezeichnungen. Im deutschen Sprachgebrauch findet man Begriffe wie beispielsweise „Chili“ oder „Cayenne-Pfeffer“. Der Chinese sagt „Lup-Chew“, der Araber „Felfel“, der Japaner „Togarashi“ und möchte man *Capsicum* auf Suhaeli sagen, so benutzt man „Pilipili hoho“ (5).

Die Namens- und Artenvielfalt ist heute nahezu unüberschaubar geworden und so wurden zwischen 1950 und der Mitte der 1990er Jahre viele taxonomische Schlüssel entwickelt um die Varietäten morphologisch zu charakterisieren (15, 17, 18).

*Capsicum* zeigt eine deutliche morphologische Variation, besonders in Fruchtfarbe, -form und -größe. Die Oberflächenbeschaffenheit der Stämme, Stiele und Blätter reicht von kahl bis behaart („pubescent“ = fein behaart, flaumig). Der Blütenstand (bot. „Infloreszenz“) variiert zwischen einer und sieben Blüten pro Nodium. Die Kelche (bot. „Calyx“) zeigen

Kelchblätter, die von grün und lang bis zu verstümmelt und stark gemustert reichen. Die Blütenblätter (Blumenkrone; bot. „Corolla“) sind in den Farben grün über weiß mit gelben Punkten bis hin zu lila in verschiedenen Anordnungen der Blätter über alle Artengrenzen hinweg anzutreffen. Die Samen sind in der Regel cremefarben, jedoch bei *C. pubescens* schwarzbraun. Viele Spezies zeigen überlappende morphologische Eigenschaften, so dass sich das taxonomische Bild als fehlerbehaftet, unvollständig und nicht zuletzt als verwirrend darstellt (19). Bosland and Zewdie unternahmen 2001 den Versuch eines chemotaxonomischen Ansatzes. Sie untersuchten mittels HPLC 200 Varietäten von 6 verschiedenen Spezies in Bezug auf deren Capsaicinoidmuster und ermittelten den Gehalt von 7 Capsaicinoiden. Dabei stellten sie fest, dass es nicht möglich ist über das Muster der Capsaicinoide eine Aussage zur Taxonomie zu treffen. Selbst innerhalb einer Spezies variierte das Verhältnis der Capsaicinoide zueinander (20). Zwischen den Wildformen und den 5 heutzutage domestizierten Spezies gibt es klarere morphologische Unterschiede: Alle wilden *Capsicum*-Arten haben kleine, runde Früchte, die in Form und Farbe attraktiv für Vögel sind. Werden diese nicht von Vögeln gefressen, so fallen sie nach der Fruchtreife zu Boden und sind weiterhin keimfähig. Die domestizierten Arten variieren stärker in der Farbe und Form und bleiben nach der Fruchtreife eine sehr lange Zeit am Strauch hängen (19). Eine weitere Vorgehensweise das taxonomische Dilemma zu lösen, ist die Erstellung von enzymatischen Profilen. Diese ermöglichten die Gruppierung in taxonomische Kategorien (siehe Abbildung 1-3), die mit den Blütenfarben korrelieren (21).

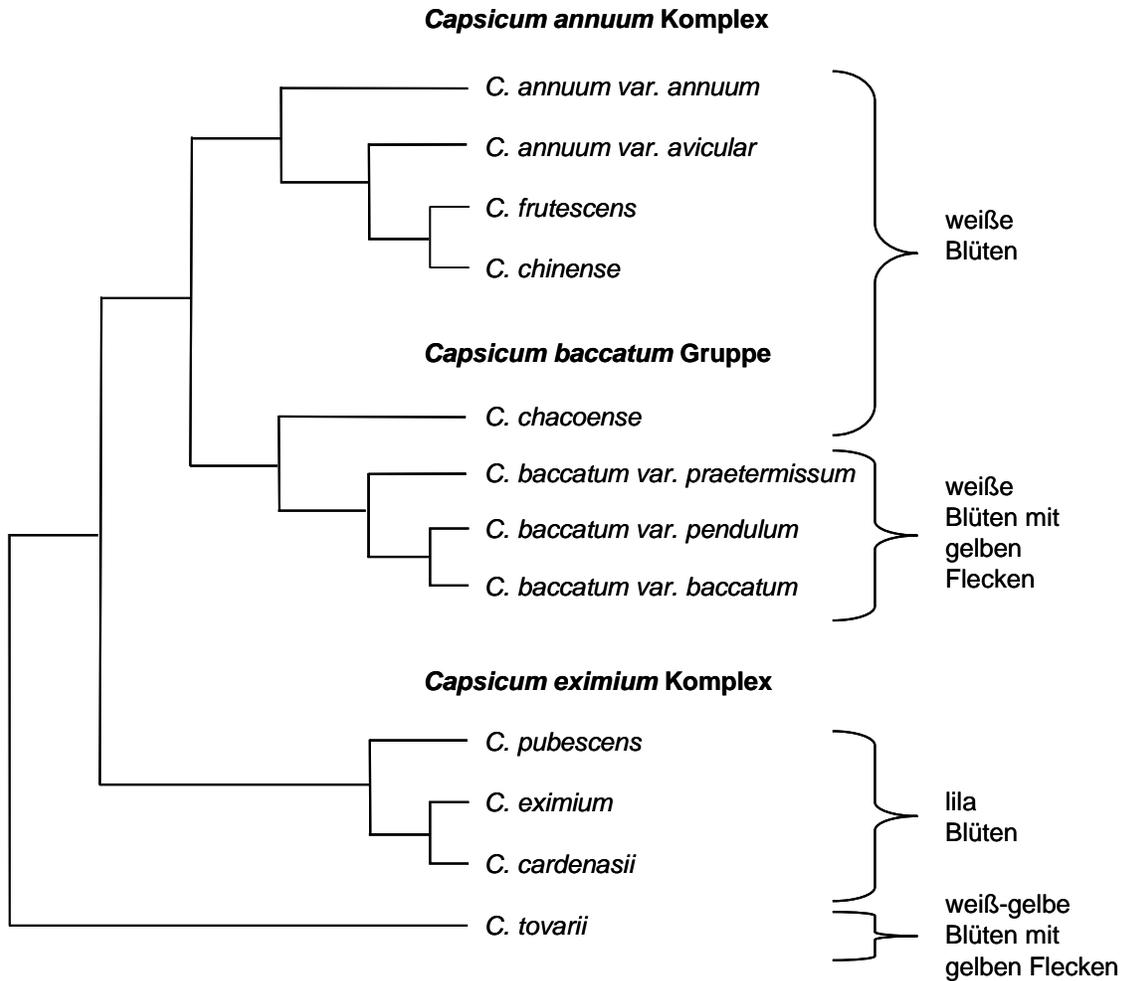


Abbildung 1-3 *Capsicum*-Dendrogramm, erstellt auf der Basis von Isoenzym-Untersuchungen in Gegenüberstellung zur Blütenfarbe nach McLeod (21).

An der Darstellung des Dendrogramms erkennt man, dass man ausschließlich mit der morphologischen Beschreibung nicht zu einer allumfassenden Erkenntnis bezüglich der verwandtschaftlichen Beziehungen der einzelnen Arten und Subspezies gelangt. Pickersgill et al. versuchten das Problem mit der Kreuzbarkeit der *Capsicum*-Arten zu lösen und vermuteten, dass z.B. die in Abbildung 1-3 gezeigte Spezies *Capsicum tovarii* eher nicht zum *Capsicum pubescens* Komplex zu zählen sei. Bei derartigen Versuchen zur unilateralen Kompatibilität verschiedener Arten besteht zudem die Gefahr, dass man von falschen Voraussetzungen ausgeht, indem eine Art aufgrund der Morphologie taxonomisch falsch eingeordnet wird, und so nicht die richtigen Schlüsse aus den Kreuzungsversuchen gezogen werden (22). Phylogenetische Studien mittels DNA-Analyse sind ein viel versprechender Ansatz Ordnung in den Genus *Capsicum* zu bringen. Walsh und Hood benutzten eine nichtcodierende Region des Chloroplasten-Genoms (zwischen „*atpB*“ und „*rbcL*“) und zusätzlich ein 900 bp langes Segment des *waxy*-Gens der Kern-DNA um über Sequenzhomologien verwandtschaftliche Beziehungen abzuschätzen (19). Sie untersuchten 11 *Capsicum*-Arten und 7 Spezies außerhalb des Genus *Capsicum* wie z.B. *Solanum lycopersicum*. Dabei erarbeiteten sie aus ihren eigenen Daten, den bis dato gemachten Isoenzym-Analysen und den morphologischen Untersuchungen eine Klassifikation des Genus

*Capsicum* mit vier Gruppen. Es blieben einige Arten übrig, die sich nicht einer dieser Gruppen zuordnen ließen:

**Tabelle 1-2 Klassifizierung des Genus *Capsicum* nach Walsh and Hood 2001**

<b>Gruppe</b>	<b>Arten</b>
Ciliatum Group	<i>Capsicum ciliatum</i>
Eximium Group	<i>Capsicum eximium</i> , <i>Capsicum cardenasii</i>
Baccatum Group	<i>Capsicum baccatum</i> , <i>Capsicum chacoense</i>
Annuum Group	<i>Capsicum annuum</i> , <i>Capsicum chinense</i> , <i>Capsicum frutescens</i> , <i>Capsicum galapagoense</i>
nicht zugeordnet	<i>Capsicum tovarii</i> , <i>Capsicum pubescens</i>

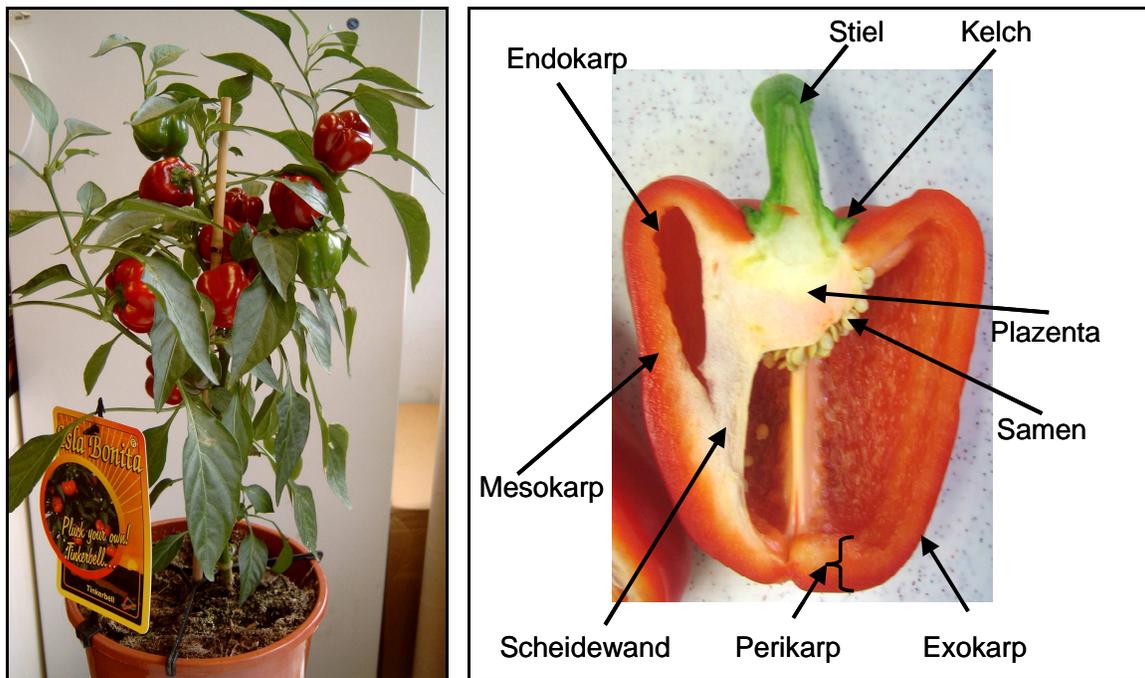
Die größten Unterschiede fanden sich zwischen *C. ciliatum*, *C. eximium* und *C. tovarii*. *Capsicum ciliatum* weist zudem noch eine Insertion von 4 Basen-Paaren (bp) im Genom auf, die bei keiner anderen Art des Genus zu finden war. Walsh und Hood merkten an, dass auch D'Arcy und Eshbaugh 1974 schon mutmaßten, *C. ciliatum* gehöre aufgrund der starken morphologischen Unterschiede (kleine, runde Früchte und gelbe Blüten) und ob des völligen Fehlens des Capsaicins zu einem eigenem Genus.

Beim Versuch weitere Aufklärungsarbeit zu leisten, konnten Bosland et al. eine mittlere genetische Übereinstimmung von 0,85 (*C. frutescens*) bzw. 0,8 (*C. chinense*) innerhalb der Spezies finden. Nach dem Vergleich der beiden Spezies miteinander und einer gefundenen mittleren genetischen Übereinstimmung von nur 0,38 resümierten sie, dass *Capsicum frutescens* und *Capsicum chinense* unterschiedlichen Arten angehören müssten (23).

Es ist also offensichtlich, dass noch weitere Untersuchungen notwendig sind, um alle 27 bisher beschriebenen Arten taxonomisch in Relation zueinander zu bringen (22). Vielleicht könnte es in Zukunft hilfreich sein, nicht von einem morphologisch geprägten Namen ausgehend die verwandtschaftliche Zuordnung vorzunehmen, sondern eher vorbehaltlos nach genetischer Untersuchung der Varietät einen Namen zuzuordnen.

## 1.2 Anatomie der Pflanzen und ihrer Früchte

*Capsicum annum* Pflanzen sind botanisch betrachtet Halbsträucher (eine krautige Pflanze, die teilweise verholzt ist) mit einer Größe von bis zu 1,5 m. *Capsicum*-Pflanzen sind dikotyl, d.h. sie besitzen 2 Keimblätter. Im Gegensatz zu *Capsicum pubescens*, wachsen die *C. annum* Pflanzen vornehmlich nach oben gestreckt. Der Stamm ist zur Wurzel hin verholzt und entgegen des Namens handelt es sich um eine mehrjährige Pflanze, deren Verholzung des Stammes mit den Jahren weiter zunimmt. Der Stamm zeigt zu Beginn wenige Verzweigungen, aber im Laufe der Zeit wird die Pflanze immer buschiger. Die dunkelgrünen Blätter, welche spiralförmig um die Äste angeordnet sind, variieren stark in der Größe. Sie besitzen einen Stiel und ihre Form ist symmetrisch, eiförmig und häufig zugespitzt. Die Blüten wachsen meistens einzeln aus den Nodien, sehr selten sind auch zwei oder drei Blüten in einer Verzweigung zu finden. In der Regel hängen die Blüten und Früchte nach unten (24, 25). Bei den Früchten handelt es sich um Beeren, deren Aufbau bei allen Varietäten sehr ähnlich ist (s. Abbildung 1-4).



**Abbildung 1-4 links: Strauch einer *Capsicum*-Pflanze (*Capsicum annum* var. *Tinkerbelle*); rechts: Längsschnitt durch eine *Capsicum*-Beere (*Capsicum annum* var. *annuum*)**

Nach der Befruchtung der Blüte entwickelt sich eine Frucht, die mit dem *Stiel* am Nodium befestigt ist. Der *Kelch* der ehemaligen Blüte ist bei den Früchten der verschiedenen Varietäten unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei einigen Sorten liegt dieser versenkt vor, bei anderen steht er vor und stülpt sich eventuell über den oberen Teil der Beere. Das *Perikarp* der Beere, was bei Gemüsepaprika als Fruchtfleisch verzehrt wird, ist aus drei Schichten aufgebaut. Die glänzende, ledrige Außenhaut stellt das *Exokarp* dar. Das *Mesokarp*, die je nach Sorte mehr oder weniger stark ausgeprägte Zwischenschicht, bildet das Fruchtfleisch. Zum inneren Hohlraum hin ist das Fruchtfleisch durch eine dünne Haut begrenzt, welche *Endokarp* genannt wird. Der Hohlraum im Inneren der Frucht wird durch *Scheidewände* kompartimentiert. Zwischen den oberen Enden der Scheidewände und dem Kelch ist in der Mitte des Hohlraumes die *Plazenta* angeordnet. An ihrer äußeren Schicht wachsen die meist

cremefarbenen, scheibenförmigen *Samen*. Die Samen enthalten bis zu 15 % Fett, jedoch keine Capsaicinoide (Scharfstoffe) (26, 27). Diese werden gebildet in der Epidermis der Plazenten und ausgeschieden in kleine Bläschen, die nach Überfüllung gegebenenfalls platzen (28, 29). Die Capsaicinoidmischung verteilt sich über den Hohlraum der Früchte und kommt mit den Samen in Kontakt.

Die Capsaicinoide sind neben der Farbe und dem Aroma ein maßgeblicher wertgebender Bestandteil von *Capsicum*-Früchten und werden in den folgenden Kapiteln detailliert dargestellt.

### 1.3 Capsaicinoide- das scharfe Prinzip in Chilis

Das scharfe Prinzip in Chilis stellt eine Gruppe von Vanillylalkylamiden (*N*-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl) alkylamide) dar, welche unter der Bezeichnung Capsaicinoide zusammengefasst werden. Es ist schon lange bekannt, dass Früchte von *Capsicum*-Spezies scharfe Substanzen bilden und akkumulieren. Im Jahr 1876 wurde von J. C. Tresh erstmals das scharfe Prinzip aus Chilis isoliert, als kristalline Substanz erhalten und mit dem Namen Capsaicin bedacht(30). K. Micko et al. zeigten 1899, dass die Summenformel  $C_{18}H_{28}NO_3$  ist und die Verbindung eine phenolische Methoxy- wie auch Hydroxyfunktion enthält (31, 32). Über einen Zeitraum von 13 Jahren (1910 bis 1923) beschäftigte sich E. K. Nelson intensiv mit der Strukturaufklärung und stellte für Capsaicin die Strukturformel *N*-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methyl-6-*trans*-nonenamid vor (27, 33).

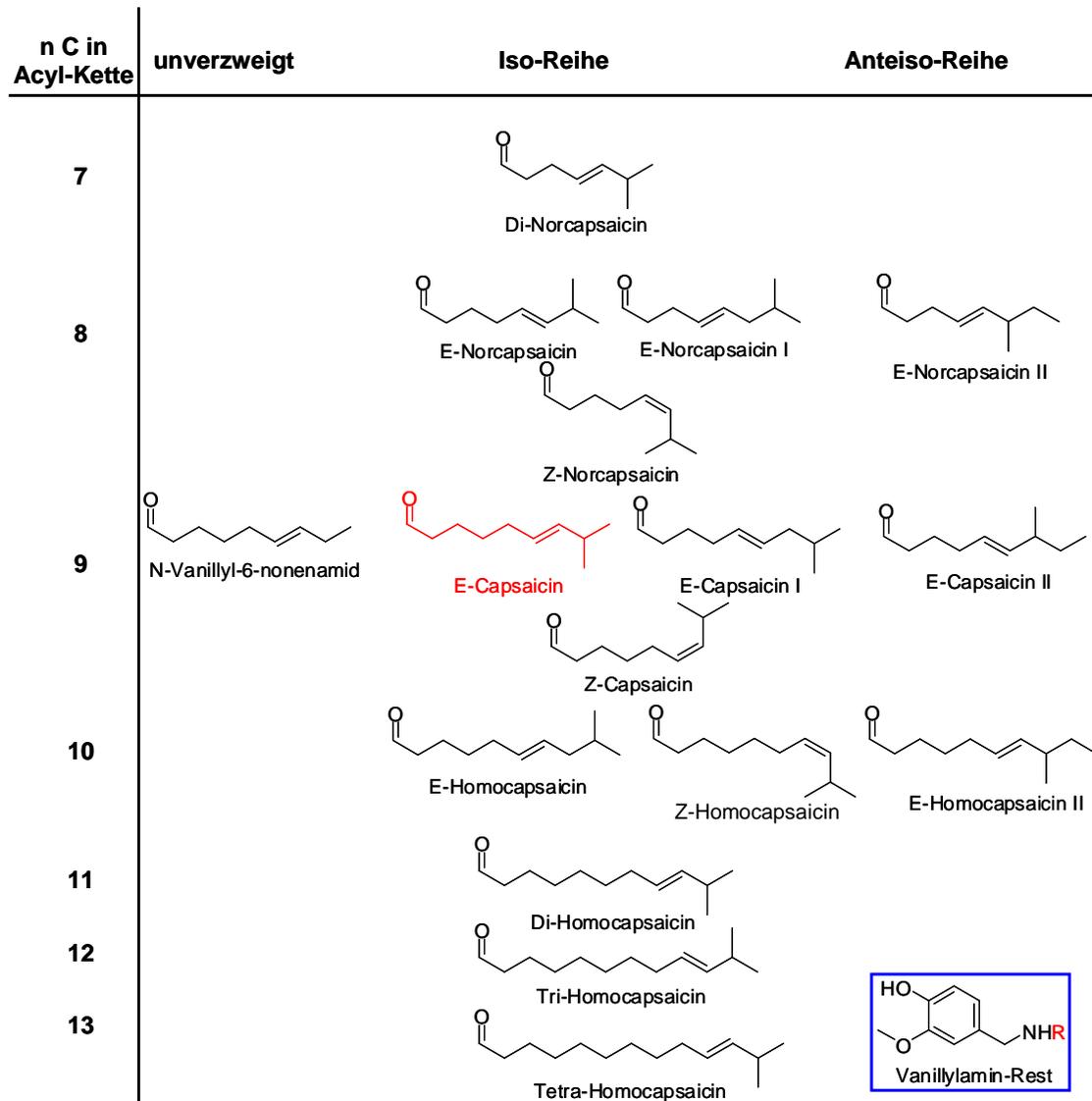


Abbildung 1-5 ungesättigte Fettsäurereste der Capsaicinoide geordnet nach Anzahl der C-Atome der längsten Kohlenwasserstoff-Kette und der Art der Verzweigung; unten rechts Vanillylamin

Mittels Papierchromatographie konnten Y. Kosuge et al. (34) 1958 zeigen, dass es sich beim „reinen“ Capsaicin um eine Mischung aus 2 sehr ähnlichen Verbindungen handelt, welche im

Verhältnis 2:1 vorliegen. In darauf folgenden Arbeiten wurde die zweite Verbindung als *N*-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnonanamid identifiziert und von Y. Kosuge ob der hydrierten Doppelbindung Dihydrocapsaicin genannt (27, 34).

Neue Analysetechniken (NMR, MS und Radioisotopenmarkierung) ermöglichten es Bennet und Kirby (35) 1968 weitere Capsaicinoide in dem natürlichen Gemisch zu identifizieren. Sie mutmaßten, dass es sich um mindestens 5 Verbindungen der Klasse der Vanillylamide handeln müsse und erweiterten die Liste um die heute als Nordihydrocapsaicin (*N*-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-7-methyl-octanamid), Homodihydrocapsaicin (*N*-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-9-methyldecanamid) und Homocapsaicin (*N*-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-9-methyldecanamid) bekannten Verbindungen (35).

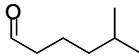
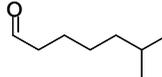
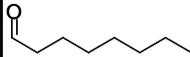
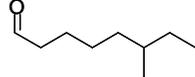
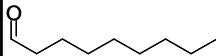
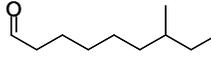
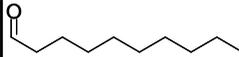
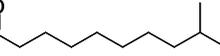
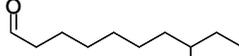
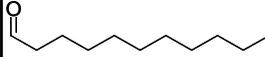
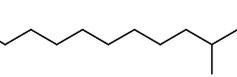
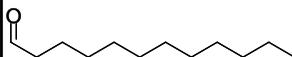
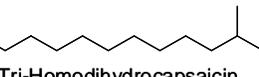
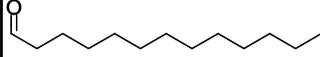
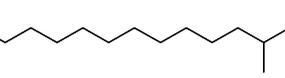
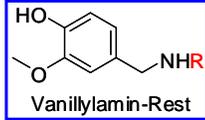
n C in Acyl-Kette	unverzweigt	Iso-Reihe	Anteiso-Reihe
6		 Tri-Nordihydrocapsaicin	
7		 Di-Nordihydrocapsaicin	
8	 N-Vanillyl-octanamid	 Nordihydrocapsaicin I	 Nordihydrocapsaicin II
9	 N-Vanillyl-nonanamid	 Dihydrocapsaicin	 Dihydrocapsaicin I
10	 N-Vanillyl-decanamid	 Homodihydrocapsaicin I	 Homodihydrocapsaicin II
11	 N-Vanillyl-undecanamid	 Di-Homodihydrocapsaicin	
12	 N-Vanillyl-dodecanamid	 Tri-Homodihydrocapsaicin	
13	 N-Vanillyl-tridecanamid	 Tetra-Homodihydrocapsaicin	 Vanillylamin-Rest

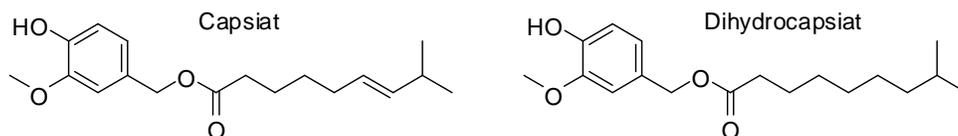
Abbildung 1-6 gesättigte Fettsäurereste der Capsaicinoide geordnet nach Anzahl der C-Atome der längsten Kohlenwasserstoff-Kette und der Art der Verzweigung; unten rechts Vanillylamin

Die Position der Doppelbindung beim Homocapsaicin ließen Bennet und Kirby offen. Y. Masada et al. (36) behaupteten, dass es sich um einen 7-en-Rest handele und J. Jurenitsch (37) postulierte 9-Methyl-6-*trans*-nonensäure als Acyl-Rest (27). Diese Problematik ist bis heute noch nicht endgültig geklärt und so analysierte R. Q. Thompson im Jahr 2007 ausgiebig die bisherige Literatur und machte Vorschläge zur Identifikation und Nomenklatur des Homocapsaicins (38). Die Liste der Capsaicinoide wurde durch J. Jurenitsch et al. (37, 39-

41), P.W. Bosland et al. (24, 42), Maillard et al. (43) und R.Q. Thompson et al. (38, 44-46) sukzessive auf 33 Capsaicinoide (s. Abbildung 1-5 und Abbildung 1-6) erweitert. Die Anzahl der Kohlenstoffatome des Acyl-Restes liegen zwischen 7 (Tri-Nordihydrocapsaicin) und 14 (Tetra-Homodihydrocapsaicin). Thompson et al. merkten an, dass die Nomenklatur ausgehend vom Wortstamm des jeweiligen Capsaicinoids über die Vorsilben „Nor“ bzw. „Homo“ sowie deren Kombination mit römischen Zahlen (z.B. Homocapsaicin I) nicht eindeutig und im Hinblick auf die große Anzahl der Capsaicinoide zu überdenken sei (45).

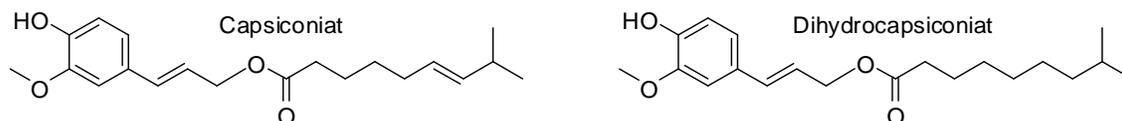
Die Zusammensetzung der Capsaicinoide variiert von Spezies zu Spezies und innerhalb der Varietät ist das Muster der Capsaicinoide ebenfalls nicht konstant (20). Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin machen i.d.R. > 95 % der Gesamtcapsaicinoide aus. Die anderen Capsaicinoide werden in der Literatur als Minorcapsaicinoide bezeichnet.

Watanabe et al. beschrieben 1998 Capsaicinoid-ähnliche Substanzen, gewonnen aus einer *Capsicum annum* Varietät namens „CH-19 sweet“ (47). Die Varietät CH-19 sweet stammt ursprünglich aus Thailand und enthält sehr wenig Capsaicin. Die neue Verbindungsklasse der Capsinoide konnte allerdings in größeren Mengen nachgewiesen werden. Bei den Capsinoiden handelt es sich Ester des Vanillylalkohols und einer Fettsäure, die ein mit Capsaicin nahezu identisches Potenzial als TRPV1-Agonist (siehe 1.4.2.1) besitzen. Das Fettsäuremuster entspricht dem der Capsaicinoide, wobei die mengenmäßig wichtigste Verbindung das Capsiat ((4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methyl-trans-6-nonenester) ist (48).



**Abbildung 1-7 Strukturformeln der beiden wichtigsten Capsinoide, links Capsiat und rechts Dihydrocapsiat**

Watanabe et al. ließen sich diese nicht scharfen Capsinoide patentieren (49). 2008 veröffentlichten Watanabe et al. die Isolierung einer weiteren Verbindungsklasse aus *Capsicum baccatum* var. *praetermissum*, die ebenfalls die ungewöhnlichen Fettsäuren der Capsaicinoide beinhalten (50). Es handelt sich dabei um Ester des Coniferylalkohols (3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-trans-2-propenylalkohol). Watanabe et al. gaben der neuen Verbindungsklasse den Namen Capsiconiate. Die bislang beschriebenen 2 Verbindungen (s. Abbildung 1-8) sind nicht scharf und zeigen eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptor von ca. 20 % im Vergleich zu Capsaicin.



**Abbildung 1-8 Strukturformeln der bislang beschriebenen Capsiconiate; links Capsiconiat und rechts Dihydrocapsiconiat**

## 1.4 Wirtschaftliche Bedeutung

### 1.4.1 Lebensmittelsektor

Die weltweite Chili-Produktion (Unterteilung: Paprika (milde Sorten), Gewürzpaprika (mittelscharf, aromatisch) und Peperoni bzw. Chili (scharf bis sehr scharf) (51)) steigt von Jahr zu Jahr, weil immer mehr Menschen den Geschmack von Chilis schätzen und allgemein die Popularität von „Ethno Food“ immer mehr zunimmt. Die wichtigsten Chili-Produzenten der Welt sind in absteigender Reihenfolge Indien, China, Pakistan, Mexiko, Südkorea und Bangladesch; sie sind zusammen für mehr als 80 % des weltweiten Handelsvolumen verantwortlich (5).

Insgesamt wurden 2006 Gewürze im Wert von 176,5 Millionen Euro nach Deutschland eingeführt (52). Wie aus einer Mitteilung des Statistischen Bundesamt hervorgeht, war Pfeffer mit einem Wertanteil von 30% an den Gesamteinfuhren von Gewürzen (ohne Gewürzmischungen) das wichtigste importierte Würzmittel im Jahr 2006 in Deutschland. An zweiter Stelle folgten Gewürzpaprika und Piment mit einem Anteil von zusammen 24%. Paprika und Piment wurden im Wert von 39,0 Millionen Euro importiert und stammten hauptsächlich aus China (26%), Brasilien (24%) und Spanien (15%).

Seit 2001 werden jährlich 11000 bis 14000 Tonnen Gewürzpaprika nach Deutschland importiert. Noch wird dieser Wert nur durch den Pfefferimport übertroffen, welcher allerdings rückläufig ist (2004 bis 2005 minus 25,5 %). Im selben Zeitraum nahmen die Gewürzpaprikaimporte um 26,9 % zu (26).

### 1.4.2 Pharmazeutische Industrie

Seit langer Zeit sind Chili aufgrund des enthaltenen Capsaicins für pharmakologische Anwendungen und Forschungen interessant. Die ersten Untersuchungen der Chili-Scharfstoffe begannen um 1810, doch bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts wurde das Augenmerk weder auf pharmakologische noch auf biochemische Aspekte gelegt. Die Fa. Beiersdorf brachte im Jahr 1928 ein therapeutisches Pflaster mit Pflanzenextrakten aus Arnika (*Arnica montana*), Belladonna (*Atropa belladonna*) und *Capsicum* (*Capsicum spp.*) unter dem Namen „ABC Wärme-Pflaster“ auf den Markt. Durch die gefäßerweiternde Wirkung von Arnika und die durchblutungsfördernde Wirkung des Capsaicins kann es gegen Rückenschmerzen, Hexenschuss, Ischias und Muskelverspannungen eingesetzt werden. Das Tollkirschengift Belladonna ist heutzutage nicht mehr enthalten (26). Weiterhin gibt es eine Reihe weiterer Arzneimittel zur topischen Anwendung, welche in ihren Rezepturen Capsaicin enthalten (53, 54).

Jährlich erscheinen ca. 500 wissenschaftliche Publikationen in der medizinischen Literatur ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)) unter dem Stichwort Capsaicin. Es gibt viel versprechende Untersuchungen, dass Capsaicin u.a. bei drei wichtigen Fragestellungen von großem Nutzen sein könnte:

#### 1.4.2.1 Capsaicin in der Schmerztherapie

Der Capsaicinrezeptor TRPV<sub>1</sub> (transient receptor potential cation channel vanilloid subfamily 1), der ursprünglich als Rezeptor für Schärfe identifiziert wurde, kann spezifisch durch schmerzhafte chemische (Ethanol–Brennschmerz bei Applikation alkoholischer

Desinfektionsmittel; erniedrigter pH-Wert) und thermische (Temperaturen > 42 °C) Reize aktiviert werden. TRPV<sub>1</sub> ist jedoch nicht nur an der Detektion akut schmerzhafter Reize beteiligt, sondern spielt auch eine zentrale Rolle im Rahmen von Entzündungsprozessen. Durch anhaltende Sensibilisierung sowie eine gesteigerte Expression ist dieser Membrankanal daher auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen beteiligt. Für verschiedene Humanerkrankungen wurde ein gesteigertes Vorkommen von TRPV<sub>1</sub> in betroffenen Geweben (z.B. entzündlichen Darmerkrankungen) nachgewiesen. Somit stellt TRPV<sub>1</sub> eine exzellente Zielstruktur für eine pharmakologische Schmerztherapie dar und unterstreicht das therapeutische Potenzial einer pharmakologischen Manipulation des TRPV<sub>1</sub> (55, 56).

#### 1.4.2.2 Capsaicin in der Krebstherapie

Mori et al. beschreiben, dass Capsaicin einen Effekt auf die Apoptose (programmierter Zelltod) von Prostata-Krebszellen zeigt. Bei Krebszellen funktioniert die Apoptose wegen des Eingreifens eines Proteins (NF-κB) nicht mehr, so dass sich die Zellen unkontrolliert teilen. Capsaicin unterdrückt die Aktivierung von NF-κB. Capsaicin wirkt zusätzlich über einen weiteren Mechanismus in der Cancerogenese, die Androgenrezeptoren (AR) der Krebszellen. Das männliche Geschlechtshormon Testosteron kann über die zahlreichen Bindestellen auf Krebszellen interagieren und das Wachstum der Zellen stimulieren. Capsaicin inhibiert diesen Regulationsmechanismus *in vitro* [LNCaP, PC-3 und DU-145 Zell-Linien] wie auch *in vivo* [BNX *nu/nu* Mäuse, männlich]. Beide Mechanismen haben einen synergistischen Effekt, jedoch müsste ein 100 kg schwerer Mann dreimal pro Woche ca. 400 mg Capsaicin verzehren, um die in den Versuchen wirksame Dosis zu sich zu nehmen (57, 58). Das entspricht etwa 40 der von uns kultivierten, sehr scharfen Habanero-Früchte (durchschnittlich ca. 10 mg/Frucht; siehe Abbildung 4-32).

Ito et al. schlugen Capsaicin als Therapeutikum zur Bekämpfung von Leukämie vor und zeigten die Wirksamkeit von Capsaicin, ebenfalls begründet durch den Einfluss auf die Apoptose (59). Kim et al. konnten eine Korrelation von Capsaicin-Zusatz und der Apoptose von Darmkrebszellen (SNU-1) *in vitro* feststellen und schlugen weitere Untersuchungen vor (60). Buthani et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Suppression der Tumorgenese bei Knochenkrebs und der Anwesenheit von Capsaicin belegen. Capsaicin blockiert dabei den Transkriptionsaktivator 3 (STAT3) und spielt somit eine potente Rolle in der Behandlung und Prävention von Multiplen Myelomen (61).

#### 1.4.2.3 Capsaicin zur Gewichtskontrolle und zur Therapie von Adipositas

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts ist Fettsucht zu einer der am meisten verbreiteten Stoffwechselerkrankungen geworden. Sie stellt ein ernsthaftes gesundheitliches Problem in vielen Industrienationen dar, da Übergewicht als Risikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes Mellitus Typ II, Koronare Herzerkrankungen und Krebs anzusehen ist (62). Genetische Prädisposition, individuelle Verhaltensweisen und Ernährungsgewohnheiten interagieren bei der Entstehung von Übergewicht (63). Während sich die beiden letztgenannten Faktoren relativ problemlos beeinflussen lassen (wenn auch soziokulturelle Einflüsse dem entgegenstehen), so kann einer genetische Veranlagung vielfach nur mit medizinischen oder pharmazeutischen Mitteln entgegengetreten werden.

Im Tierversuch konnte an Ratten gezeigt werden, dass sich nach der Injektion von Capsaicin (6 mg/kg Körpergewicht) eine Beschleunigung des Energie- und Lipidstoffwechsels einstellte

(64, 65). Hsu et al. benutzten Fettzellenvorläufer (Prädipozyten, 3T3-L1) aus Mäuse-Embryos und versetzten diese mit 0-250  $\mu\text{M}$  Capsaicin. Sie beobachteten nach 72 h bei der Höchstkonzentration an Capsaicin einen Rückgang auf unter 40 % der Zellpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Capsaicin blockiert die Umwandlung von Fettzellenvorläufern in reife, fettgefüllte Fettzellen und erhöht die Anzahl der Zellen mit programmiertem Zelltod (ähnlich dem Einfluss in der Cancerogenese) (66).

Auch an Menschen konnte der positiver Effekt auf den Stoffwechsel nach der oralen Gabe von 10 g Chili (30 mg Capsaicin) zu den Mahlzeiten gezeigt werden. Es zeigte sich eine erhöhte Oxidation von Kohlenhydraten respektive Lipiden über einen Zeitraum von bis zu 210 min nach der Aufnahme des Capsaicins. Der Körper verbrannte einen größeren Teil der zugeführten Energie direkt wieder (67-69). Der limitierende Faktor bei dieser Art der Gewichtskontrolle ist allerdings, was schnell einleuchtet, die maximal tolerierbare Schärfe der Speisen (70).

Das von Watanabe et al. beschriebene Capsiat ((4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methyl-*trans*-6-nonenester) ist im Gegensatz zum Capsaicin nicht scharf, zeigt jedoch die selben Effekte in Bezug auf die Erhöhung des Energie-Stoffwechsels und die Unterdrückung der Fetteinlagerung (71). Da sie die wirtschaftliche Relevanz entsprechend hoch einschätzten, ließen Watanabe et al. die Verwendung von Capsiaten in „Functional Food“ u.a. für Sportgetränke und Schokolade patentieren (49).

Am Beispiel dieser Forschungsschwerpunkte zum Verständnis der Wirkmechanismen des Capsaicins lässt sich die ökonomische Bedeutung des Capsaicins ablesen. Um den Wirkstoff zu nutzen, ist es erstrebenswert Pflanzenmaterial definierter Schärfe zu erzeugen. Dazu ist das Verständnis der Biosynthese der Capsaicinoide erforderlich.

## 2 Biosynthese der Capsaicinoide

Die Capsaicinoide befinden sich ausschließlich in den Früchten der *Capsicum*-Pflanzen. Die Capsaicinoid-Biosynthese findet in den Epidermiszellen der Plazenta statt (27). Diese scheiden eine ölige, leicht gelbliche Flüssigkeit unter die Cuticula in kleine Bläschen aus. Diese Bläschen (auch *blister* oder *vesicle*) können mit zunehmender Füllung platzen und die Capsaicinoide können sich über den Innenraum der Beere verteilen (28, 29, 72). Die Capsaicinoide setzen sich aus je einem Vanillylamin-Rest und einem Fettsäurerest zusammen. Die Bildungswege dieser beiden Molekülteile unterscheidet sich maßgeblich. Das Vanillylamin wird über den Phenylpropanoidstoffwechsel bereitgestellt und der Fettsäurerest stammt aus der Fettsäurebiosynthese der *Capsicum*-Pflanzen. Aus diesem Grund scheint es angebracht, die beiden Stoffwechselwege getrennt zu betrachten. Die Biosynthese des Vanillylamins wird als erster Punkt detaillierter betrachtet. Anschließend liegt der Fokus auf der Entstehung des Fettsäurerestes.

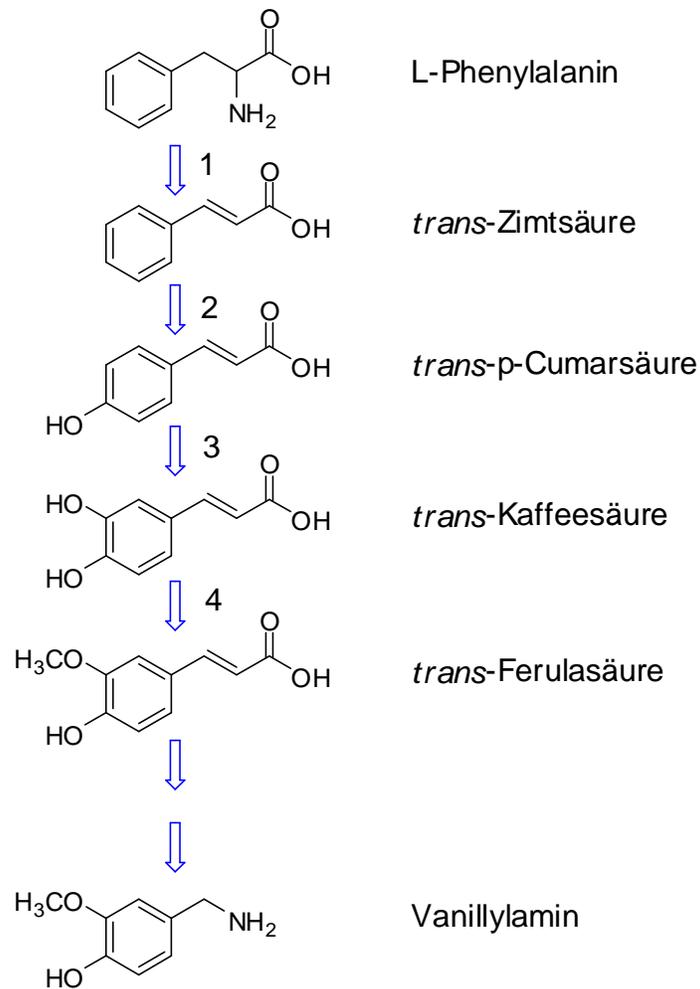
### 2.1 Biosyntheseweg des Vanillylamins

Etwa zeitgleich untersuchten die britischen Wissenschaftler Bennett und Kirby (35) sowie die amerikanischen Forscher Leete und Louden (73) in den späten Sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts die Biosynthese der Capsaicinoide. Mittels Radioisotopen-Techniken (Tritium-Markierung der aromatischen Ringe phenolischer Verbindungen) zeigten Bennett und Kirby durch *in vivo* Experimente an Früchten von *Capsicum annuum*, dass Phenylalanin, p-Cumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure und Vanillylamin biosynthetisch in Capsaicin eingebaut werden und sich die Radioaktivität im Benzolring wieder findet. Dies gelang im Gegensatz dazu nicht mit Tyrosin. Als Fazit aus ihren Arbeiten mutmaßten Bennett et al., dass der Einbau von Phenylalanin in das Capsaicin über den üblichen Biosyntheseweg, welcher als Phenylpropanoidweg (74, 75) bekannt ist, verläuft.

Kurze Zeit später zeigten Leete und Louden durch *in vivo*-Experimente an Früchten von *Capsicum frutescens* durch Zugabe von Phenylalanin, DL-[3-<sup>14</sup>C]-Tyrosin und L-[methyl-<sup>14</sup>C]-Methionin, dass ausschließlich Phenylalanin zu einer radioaktiven Markierung der Methylgruppe des Vanillylamins führt.

Damit wurde verifiziert, dass der Vorläufer des Capsaicins im Phenylpropanoidzweig das Phenylalanin ist. Dies bestätigte auch Rangoonwala (76), als er mittels [<sup>15</sup>N]-markierten Aminosäuren belegte, dass der Stickstoff im Capsaicin aus dem Phenylalanin stammt.

Ende der Siebziger-/ Anfang der Achtziger Jahre gelang es Iwai et al. erstmals biosynthetische Studien an intakten *Capsicum*-Zellen (im Gegensatz zu zellfreien Systemen, welche ein nicht so realistisches Abbild der Vorgänge *in vivo* widerspiegeln) durchzuführen. Aus jungen *Capsicum*-Früchten (10 bis 20 Tage nach Blüte) wurden Protoplasten aus zerkleinerten Früchten isoliert und mit radioaktiv markiertem Phenylalanin und Valin inkubiert. Nach der Bestimmung resultierender radioaktiver Zwischenstufen (*trans*-Zimtsäure, *trans*-p-Cumarsäure, *trans*-Kaffeesäure und *trans*-Ferulasäure) wurde unter Berücksichtigung der Erkenntnisse über den Phenylpropanoidweg ein Biosyntheseweg des Vanillylamin-Restes der Capsaicinoide postuliert (77).



**Abbildung 2-1** Bildung des Vanillylamins über den Phenylpropanoidweg nach Fujiwake et al. (77). Die beteiligten Enzyme wurden wie folgt bezeichnet: 1. Phenylalanine ammonia lyase; 2. *trans*-Cinnamate 4-monooxygenase; 3. *trans*-p-Coumarate 3-monooxygenase; 4. Caffeic acid O-methyltransferase

Fujiwake et al. beschrieben ausgehend vom Phenylalanin die bis zum Schritt der *trans*-Ferulasäure beteiligten Enzyme. Die weiteren Schritte ausgehend von der *trans*-Ferulasäure zum Vanillylamin sind hinsichtlich der Mechanismen und beteiligten Enzyme zu diesem Zeitpunkt unklar.

Die vielfältigen Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels sind allen höheren Pflanzen gemein und führen zur Bildung von z.B. Flavonoiden, Tanninen, verseifbaren phenolischen Zellwand-Bestandteilen und ligninartigen Verbindungen (78, 79). Der letzte Teil des Biosyntheseweges von der Ferulasäure über das Vanillin zum Vanillylamin wurde hingegen bisher nur in Früchten und Zellkulturen aus *Capsicum frutescens* nachgewiesen.

In *Capsicum*-Früchten konnten Sukrasno und Yeoman als einzige frei vorliegende phenolische Verbindungen die Capsaicinoide nachweisen (80). Sie vermuteten, dass die Umsetzung von der einen Verbindung in die darauf folgende sehr schnell verlaufen müsse und deshalb der Nachweis von Zwischenstufen der Biosynthese nicht gelänge. Glykosylierte Phenole lassen sich hingegen nachweisen und bestimmen. Weiterhin zeigten sie, dass während der Fruchtreife der Gehalt an Capsaicin und den ligninartigen Verbindungen in vergleichbarem Maße ansteigt, wie die Konzentration an deren Glykosiden abnimmt. Diese

beiden Endprodukte des Phenylpropanoidweges, Capsaicin und Lignin, stehen demnach in einem Wettbewerb um die gleichen Vorläufer.

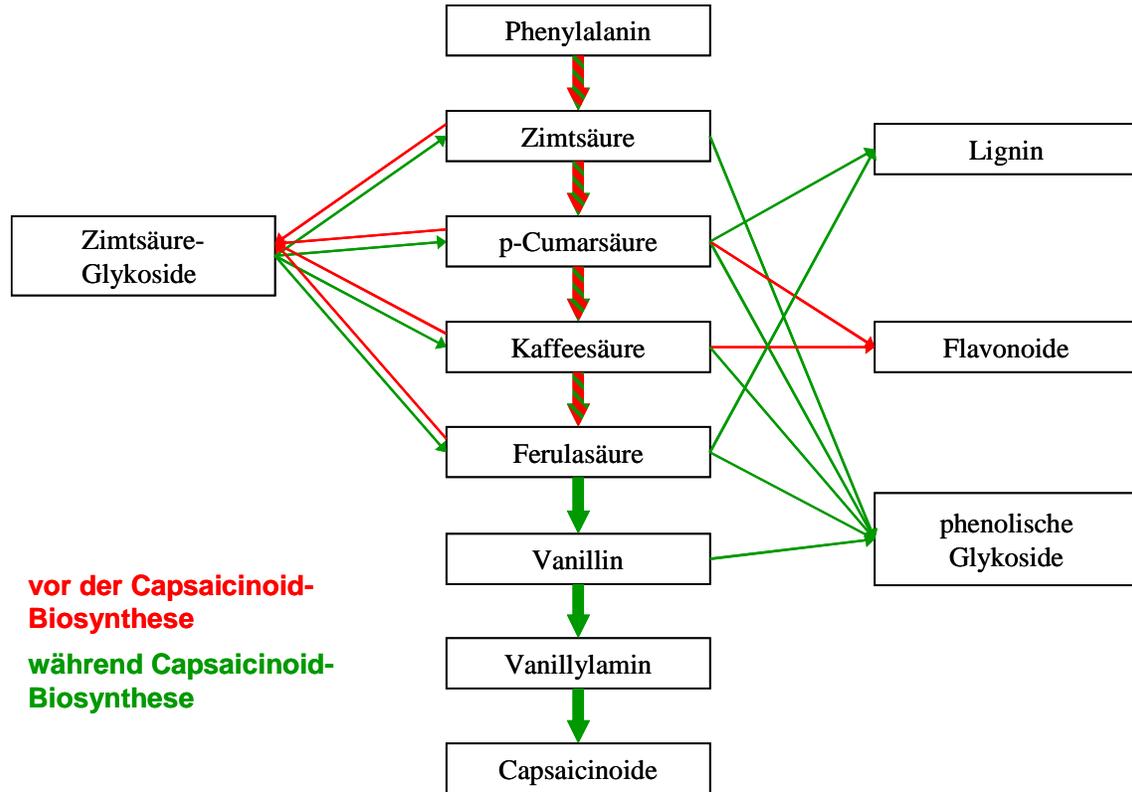


Abbildung 2-2 Biosynthetische Beziehung diverser phenolischer Verbindungen zu den Capsaicinoiden nach Yeoman et al. (80). Die roten Pfeile zeigen den Fluss der Metaboliten vor dem Start der Biosynthese der Capsaicinoide. Die grünen Pfeile symbolisieren den Stoffstrom der Metaboliten während der Capsaicinoid-Biosynthese.

Im Jahr 2007 trugen Stewart et. al (72) den aktuellen Erkenntnisstand zusammen, um zur Bildung des Vanillylamins einen Biosyntheseweg zu postulieren (siehe Abbildung 2-4). Das Phenylalanin wird zunächst durch das Enzym Pal (Phenylalanine Ammonia Lyase) zu Zimtsäure umgesetzt. Die Ca4H (Cinnamic Acid 4-hydroxylase) fügt in *para*-Stellung eine Hydroxylgruppe ein, so dass *p*-Cumarsäure entsteht. Nach der Aktivierung dieser Säure zum entsprechenden Coenzym A-Derivat (s. Abbildung 2-3) mittels 4CL (4-coumarate CoA Ligase) gelangt das *p*-Cumarsäure-CoA in einen 3-stufigen Zyklus, in dem eine zweite Hydroxylgruppe eingefügt wird. Das *p*-Cumarsäure-CoA wird mittels HCT (Hydroxycinnamoyl-Transferase) auf Shikimisäure übertragen. Das phenolische Zwischenprodukt liegt danach zunächst als *p*-Cumarsäure-Shikimisäureester und nach der durch C3H (Coumaroyl Shikimate/Quinate 3-hydroxylase) katalysierten Reaktion als Kaffeesäure-Shikimisäureester vor.

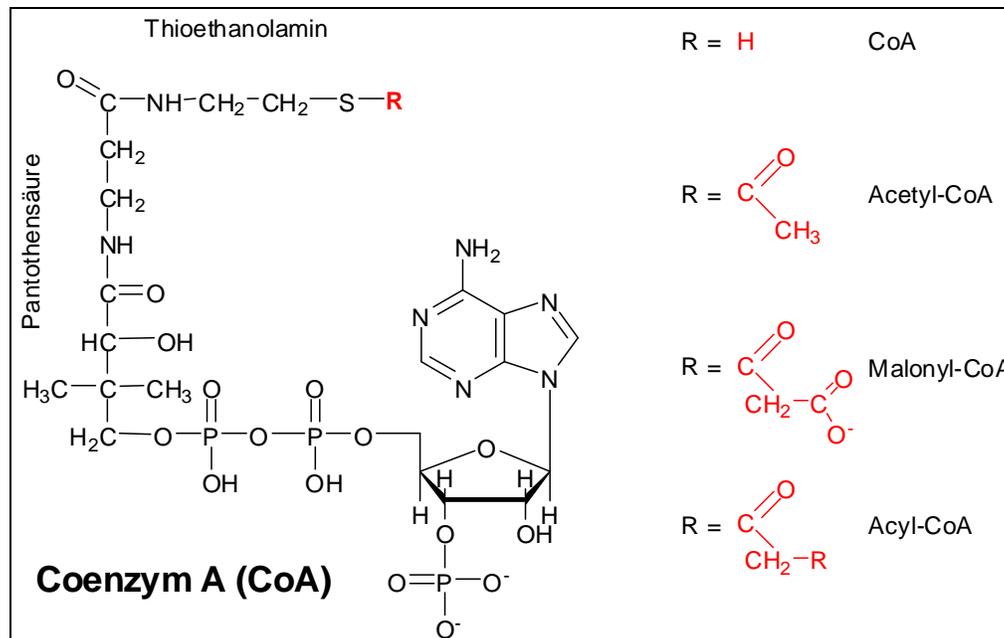


Abbildung 2-3 Coenzym A setzt sich aus drei Molekülteilen zusammen: Adenosin-3', 5'- diphosphat, Pantothenäurephosphat und Thioethanolamin (= Cysteamin). Die beiden letztgenannten stellen zusammen Pantethin dar (81). Rechts sind CoA-Derivate dargestellt, die für viele Stoffwechselfvorgänge (z.B. Fettsäurebiosynthese) notwendig sind.

Anschließend verlässt Shikimisäure den Zyklus wieder, indem HCT den Transfer auf ein Coenzym A rückgängig macht. Das vorliegende CoA-Derivat besitzt nun zwei Hydroxylgruppen und wird, während es an CoA gebunden ist, mittels COMT (Caffeic Acid O-methyltransferase) zum Ferulasäure-CoA umgesetzt. Für den nächsten Schritt zum Vanillin wurde kein Enzym benannt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass pAMT (Aminotransferase) die Reaktion von Vanillin zu Vanillylamin katalysiert. Zu diesen Stoffwechselfvorgängen liegen nur lückenhafte Untersuchungen vor. Für die beteiligten Enzyme Pal, Ca4H, COMT und pAMT (in Abbildung 2-4 mit Unterstrich versehen) wurde gezeigt, dass deren codierende Gene differenziell (fakultative Bildung unterschiedlicher Proteine aus einem Gen) in Plazenten scharfer *Capsicum*-Früchte expremiert sind (82, 83). Sie wurden aber noch nicht funktionell charakterisiert.

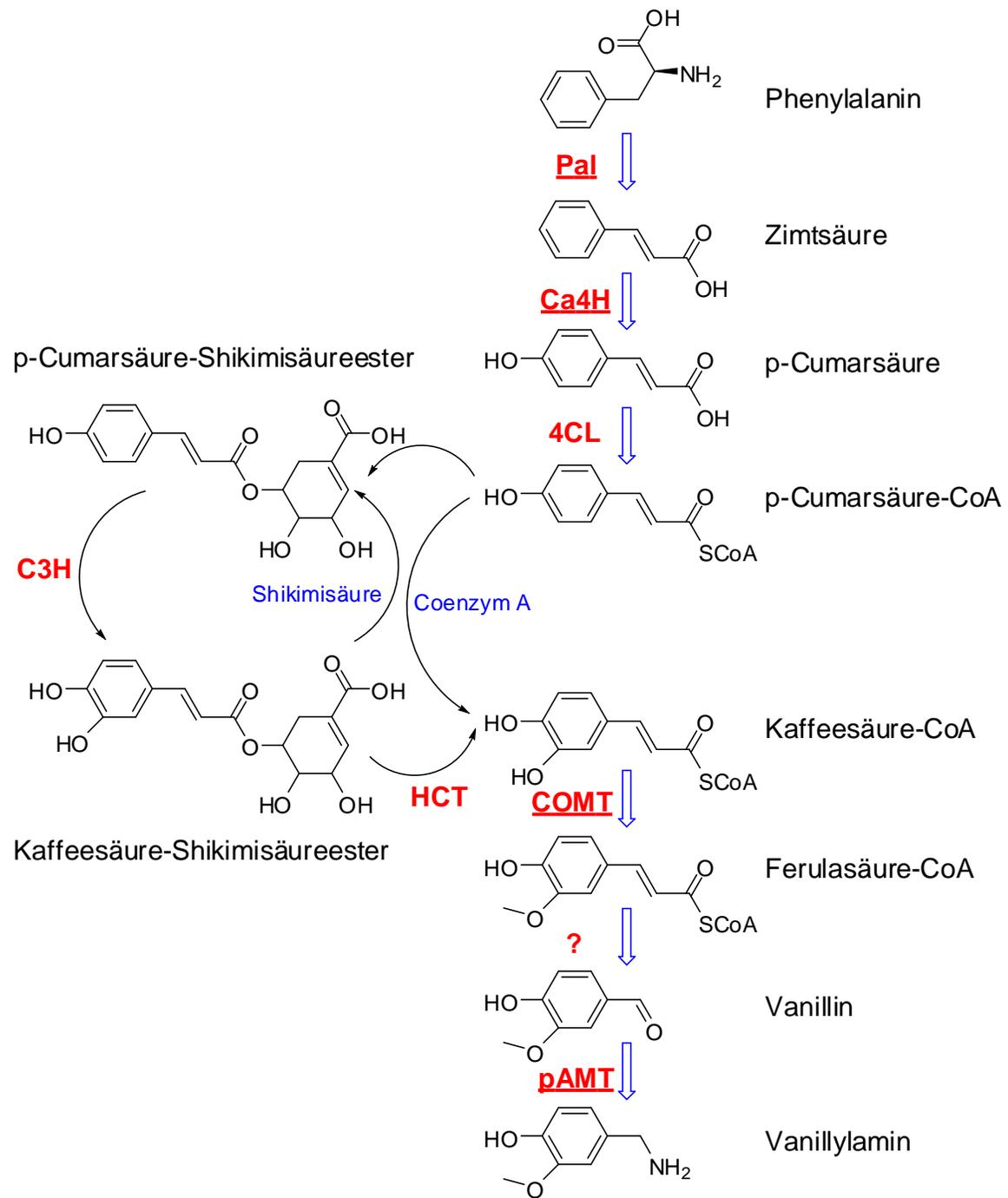


Abbildung 2-4 Postulierter Biosyntheseweg des Vanillylamins über den Phenylpropanoidstoffwechsel nach Stewart et al. (72, 84)

## 2.2 Biosynthese des Fettsäurerestes

### 2.2.1 Fettsäurebiosynthese in Pflanzen

Lipide sind für alle Pflanzenzellen lebensnotwendig. In vegetativen Zellen liegen 5-10 % des Trockengewichtes als Lipide vor. Dies sind vornehmlich Membranlipide, welche als eine Doppelschicht die Kompartimentierung der Zelle gewährleisten. Aber nicht nur als Strukturelement in Zellwänden spielen Lipide eine zentrale Rolle. Fette sind für Pflanzen die wichtigste Möglichkeit Kohlenstoff zu speichern. Speicherlipide findet man häufig in Samen, wo sie bis zu 60 % der Trockenmasse ausmachen. Epidermiszellen produzieren Ester aus Fettalkoholen und Fettsäuren (Wachse der Cuticula), die als hydrophobe Barriere den Wasserverlust der Pflanzenzelle minimieren und gleichzeitig Schutz gegen Pathogene und andere Stressfaktoren bilden. Zusätzlich zu diesen häufig vorkommenden Lipiden sind kleine Mengen der Fettsäuren als Vorstufen für Phytohormone (z. B. Jasmonsäure) oder sekundäre Pflanzenstoffe (z. B. Alkaloide wie die Capsaicinoide) von großer Bedeutung. Sekundäre Pflanzenstoffe tragen ihre Bezeichnung, da sie nicht in jeder Zelle gefunden werden und wahrscheinlich nicht essentiell für die Pflanze sind.

Die Fettsäurebiosynthese ist ein primärer Stoffwechselweg, denn sie findet in allen Zellen statt und ist essentiell für das Wachstum. Fettsäuren werden in Zellen so gut wie nie in Form von „freien“ Fettsäuren gefunden. In der Regel liegt die Carboxylgruppe in veresterter Form (meistens als Glycerid) vor.

Der grundlegende Unterschied bei der Fettsäurebiosynthese in Pflanzen auf der einen Seite und Säugetieren, Bakterien und Pilzen auf der anderen Seite liegt im Ort der Biosynthese begründet. Der Großteil der Biosynthese bei Säugern, Bakterien und Pilzen findet im Zytosol, bei Pflanzen in den Plastiden und im Zytosol statt. Dessen ungeachtet ist der biochemische Reaktionsverlauf (Verlängerung um jeweils 2 C-Atome) im Prinzip in allen Fällen der gleiche.

Wenn nun aber die Pflanze ihre Fettsäuren innerhalb der Plastiden synthetisiert, dann muss ein Mechanismus existieren die Produkte der Synthese aus den Plastiden zu anderen Orten der Zelle zu transportieren. Weiterhin ist unklar, wie die Zelle den Bedarf an Fettsäuren im Bereich außerhalb der Plastiden an die Plastiden kommuniziert. Diese regulatorischen Fragestellungen sind bisher noch nicht geklärt (85, 86).

## 2.2.2 Ablauf und Regulation der Fettsäurebiosynthese der Capsaicinoide

Um zu verstehen, warum die Fettsäurebiosynthese der Capsaicinoide ein außergewöhnlicher Vorgang ist, wird die Fettsäuresynthese bei Pflanzen rekapituliert. Grundsätzlich stehen der Pflanze zwei Möglichkeiten zur Verfügung gesättigte Fettsäuren zu synthetisieren:

1. Durch Neubildung (*de novo* Synthese) aus C<sub>2</sub>- bzw. C<sub>3</sub>-Einheiten
2. über die Verlängerung vorhandener Acyl-Verbindungen (z.B. Aminosäuren) durch Anlagerung von C<sub>2</sub>-Bauelementen (87).

Um die komplexen Abläufe und Regulationsmechanismen *in vivo* zu umreißen, ist es erforderlich einige Einflussgrößen näher zu betrachten und den Kenntnisstand aus mehr als 40 Jahren Forschung zur Lipidbiosynthese in Pflanzen zu erörtern.

### 2.2.2.1 *De novo* Fettsäurebiosynthese

Ein wichtiges Substrat für die Fettsäuresynthese ist Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA, s. Abbildung 2-3), welches in Plastiden von Spinat und Erbsen nachgewiesen wurde (88). Post-Beittenmiller et al. zeigten, dass in Chloroplasten nur 31 bis 54 µM, eine Konzentration die zur Fettsäurebiosynthese für ein paar Sekunden ausreicht, zu finden sind. Trotzdem wurde der Acetyl-CoA-Pool als relativ konstant beschrieben. Es muss demnach ein System zur Bereitstellung von Acetyl-CoA vorliegen, welches schnell dieses Substrat nachliefern kann. Bisher ist der Mechanismus, obwohl viele Möglichkeiten denkbar sind, nicht bekannt.

Bei der *de novo*-Synthese der Fettsäuren, also ausgehend vom Acetyl-CoA als Grundbaustein, wird Acetyl-CoA als Startmolekül benötigt. Die weitere Verlängerung der Kohlenwasserstoff-Kette um jeweils C<sub>2</sub>-Einheiten erfolgt indirekt über den Umweg des Malonyl-CoA (s. Abbildung 2-3). Die Bereitstellung von Malonyl-CoA erfolgt in einer Zwei-Stufen-Reaktion am Enzymkomplex Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase). Diese Enzyme katalysieren die Carboxylierung von Acetyl-CoA mittels Biotin als prosthetische Gruppe in einer ATP-abhängigen Reaktion. Das Biotin ist kovalent an das Enzym gebunden und übernimmt zunächst das CO<sub>2</sub> um es an Acetyl-CoA weiterzugeben. Ohlrogge und Browse (85) beschreiben, dass zwei Formen der ACCase in Pflanzen zu finden sind. Die erste Form, eine multifunktionale Struktur (MF-ACCase), hat drei funktionelle Regionen und beschreibt aufgrund seiner Eigenschaften eher den „eukaryotischen Weg“ zur Bildung des Malonyl-CoA's. Dieser Komplex wird als „eukaryotisch“ bezeichnet, weil entsprechende Strukturen im Hefen und tierischen Zellen gefunden wurden. Die zweite Variante, eine Multi-Untereinheiten Struktur (MS-ACCase), stellt den „prokaryotischen Weg“ dar. Hier zeigen sich Analogien einer Untereinheit (34 bis 38 kDa), welche im plastidischen Genom identifiziert wurde, mit der Carboxyltransferase-Untereinheit der *Escherichia coli*-ACCase.

In allen bisher untersuchten zweikeimblättrigen Pflanzen (Dicotyledonen) kommt MS-ACCase in den Plastiden vor. Es wird vermutet, dass bei diesen Pflanzen im Zytosol MF-ACCase der Enzymkomplex ist, der die Carboxylierung des Acetyl-CoA's übernimmt. *Capsicum spp.* gehört zu den Dicotyledonen und besitzt somit beide Enzymkomplexe. Dieses Enzym ist zumindest an der Regulation der Fettsäurebiosynthese beteiligt (88, 89). In Blättern wird die Bildung von Malonyl-CoA durch Licht beeinflusst und an Zellkulturen von Tabak-Pflanzen *Nicotiana tabacum* konnte die Bildung durch Zufuhr exogener Ölsäure gehemmt werden (90). Ist das Malonyl-CoA einmal gebildet, so findet die darauf folgende Reaktion der Transacylase, welche das Malonyl-CoA auf das ACP überträgt, sowohl im Hellen als auch im

Dunklen statt. Dieser Schritt stellt das Malonyl-ACP zur Kettenverlängerung bereit und ist nicht limitierend für die gesamte Biosynthese (91).

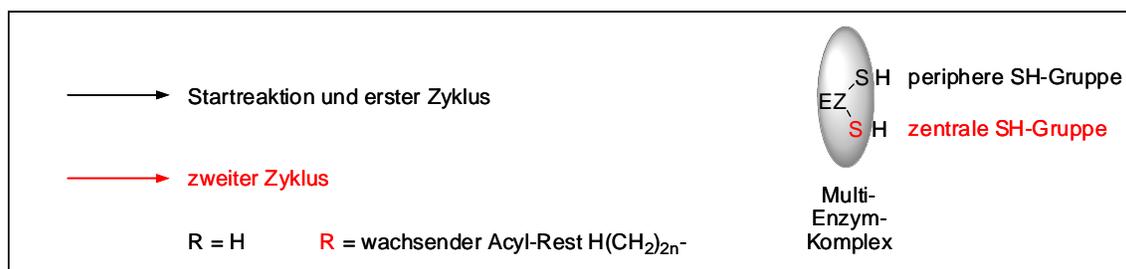
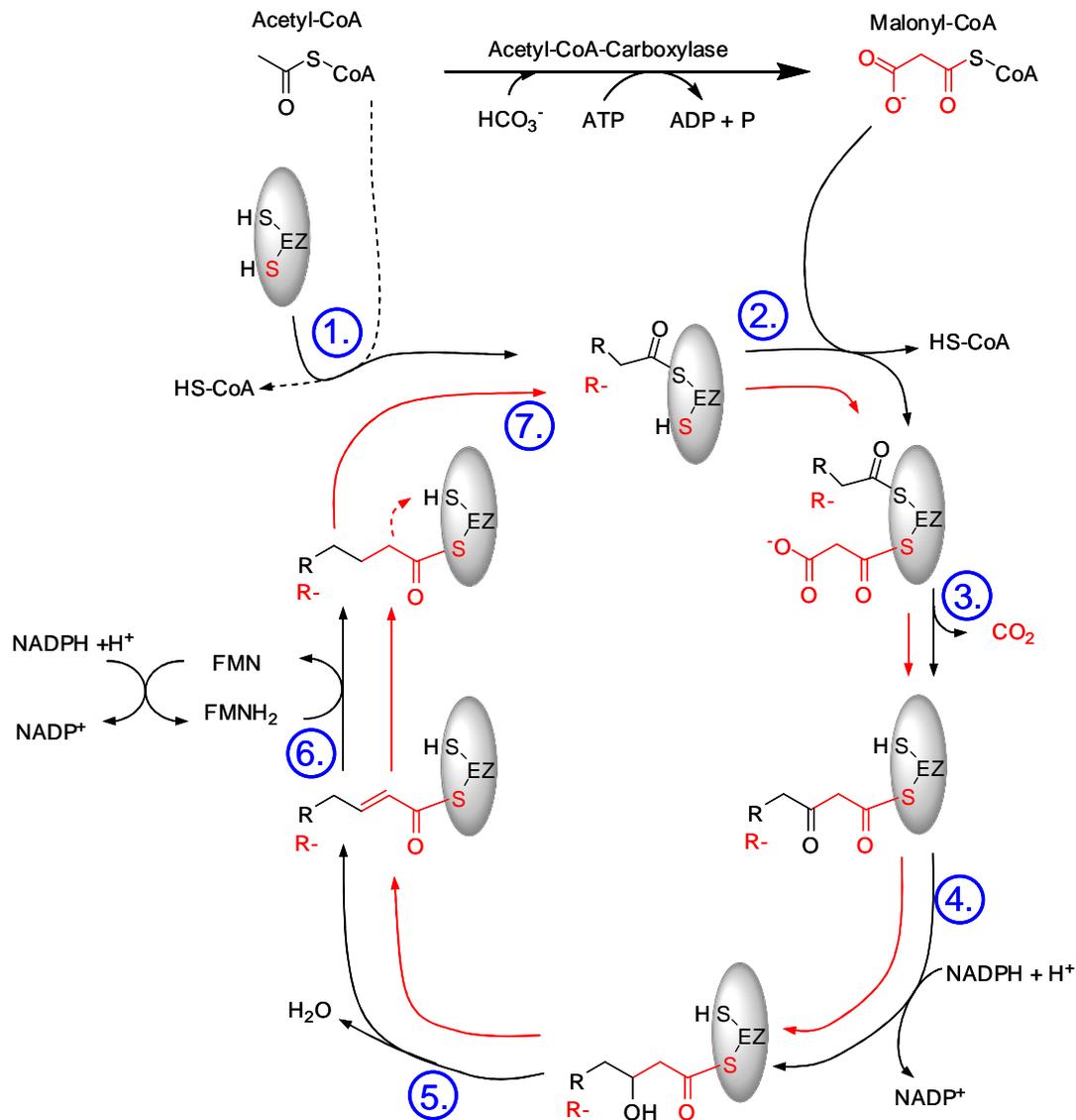
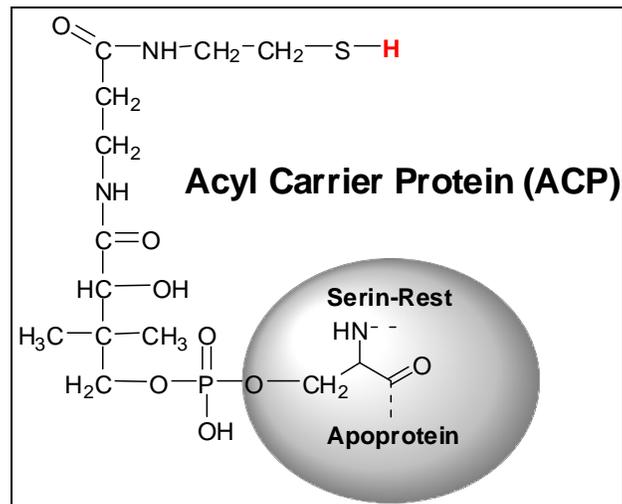


Abbildung 2-5 Vereinfachtes Schema der Fettsäurebiosynthese: **1.** Acetyl-Transfer (*Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase)*), **2.** Malonyl-Transfer (*Malonyl-CoA:ACP Transacylase*), **3.** Kondensation zum 3-Oxoacyl-Rest unter  $CO_2$ -Abspaltung (*3-Ketoacyl-ACP Synthase (KAS)*), **4.** Reduktion zum 3-Hydroxyacyl-Rest (*3-Ketoacyl-ACP-Reduktase*), **5.** Dehydratisierung zum Enoyl-Rest (*Hydroxy-acyl-ACP-Dehydratase*), **6.** Reduktion zum Acyl-Rest (*Enoyl-ACP-Reduktase*), **7.** Acyl-Transfer von der zentralen auf die periphere SH-Gruppe

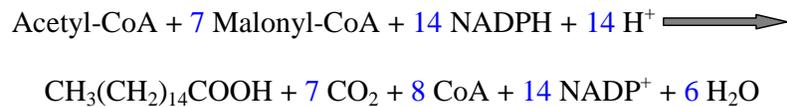
Die molekulare Organisation bei der Fettsäurebiosynthese in Pflanzen unterscheidet sich maßgeblich von der in anderen Eukaryoten. Zur Synthese von einer C16- oder C18-Fettsäure ausgehend von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA sind mindestens 30 enzymatische Reaktionen erforderlich. Bei Tieren, Pilzen und einigen Bakterien werden all diese Reaktionsschritte durch einen einzigen multifunktionalen Polypeptid-Komplex (Fatty Acid Synthase Typ I, FAS Typ I), welcher sich im Zytosol befindet, katalysiert. In Pflanzen sind die verschiedenen Enzyme dieses Syntheseweges getrennt voneinander lösliche Komponenten, die in den Stromathylakoiden lokalisiert sind (FAS Typ II). Der zentrale Kohlenstofflieferant für die Kettenverlängerung ist das Malonyl-CoA. Vor dem Eintritt in den zyklischen Fettsäurebiosyntheseweg muss die Malonyl-Gruppe jedoch vom CoA auf einen Protein-Cofaktor, das Acyl-Carrier-Protein (ACP, siehe Abbildung 2-6) übertragen werden. Acyl-Trägerproteine, welche aus Chloroplasten von Avocado-Früchten isoliert werden konnten, zeigten in den gereinigten Präparaten eine relative Molekülmasse von 10 kDa (z. Vergleich *E. coli*-ACP: 8,9 kDa) (87). Das bestätigten auch Untersuchungen von ACP-Isoformen aus Samen von Köcherblumen (*Cuphea lanceolata*), welche Molekulargewichte von 8,6 kDa bzw. 8,7 kDa und 9,3 kDa aufwiesen (92).



**Abbildung 2-6** Das Acyl Carrier Protein (ACP) trägt einen Pantethein-Rest (wie das CoA), welcher über Phosphorsäure an einen Serin-Rest des Apoenzyms gebunden ist. Über die reaktive SH-Gruppe erfolgt die Anknüpfung des Acyl-Restes (87).

Ab diesem Zeitpunkt bis zur Fertigstellung des C16- respektive C18-Produktes verbleibt der immer länger werdende Acyl-Rest am ACP. Nach dem Transfer auf das ACP gelangt der Malonyl-Thioester in eine Reihe von Kondensationen wobei das Acyl-ACP (zu Beginn das Acetyl-CoA) der Akzeptor ist. Diese Reaktion führt zur Freisetzung des zuvor durch ACCase gebundenen CO<sub>2</sub>. Durch das Freisetzen des CO<sub>2</sub> verlagert sich das Reaktionsgleichgewicht vollständig auf die Seite des 3-Ketoacyl-ACP und macht diesen Schritt irreversibel. Mindestens drei separate, kondensierende Enzyme (3-Ketoacyl-ACP-Synthasen, KAS) werden zur Bildung einer C18-Fettsäure benötigt. Die erste Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-ACP zur Bildung eines C4-Intermediates wird durch KAS III katalysiert (93). Es wird angenommen, dass ein zweites Enzym, das KAS I, für die Synthese von Kettenlängen zwischen C6 und C16 verantwortlich ist. Und letztlich wird für die Verlängerung von Palmitoyl-ACP zu Stearoyl-ACP ein weiteres Enzym (KAS II) benötigt. Bei Pflanzen sind diese Enzyme Teile eines Multienzymkomplexes, der Fettsäuresynthase (FAS Typ II) (94, 95).

Das erste Zwischenprodukt jeder dieser Kondensationen ist ein 3-Ketoacyl-ACP. Es bedarf danach drei weiterer Reaktionsschritte, bis daraus ein gesättigter Fettsäure-Rest entstanden ist. Das Enzym 3-Ketoacyl-ACP-Reduktase reduziert dabei mittels NADPH als Elektronen-Donator die Ketogruppe zur Hydroxylgruppe. Im nächsten Reaktionsschritt spaltet eine Hydroxy-acyl-ACP-Dehydratase Wasser ab. Die daraus resultierende *trans*- $\Delta^2$ -Doppelbindung wird im letzten Schritt des Zyklus durch das Enzym Enoyl-ACP-Reduktase mittels NADPH reduziert und somit gesättigt (85). Die Bilanz der Synthese von Palmitinsäure sieht folgendermaßen aus:



Danach schließen sich die Schritte 2-7 in Abbildung 2-5 an. Die Vollendung des 6. Schrittes stellt eine biochemische Drehscheibe dieses Stoffwechselweges dar.

Das Produkt aus Schritt 6 kann durch erneutes Ablaufen des Zyklus ab Schritt 2 weiter verlängert werden. Alternativ könnte das Verlängerungsprodukt auch durch eine Thioesterase als freie Fettsäure abgespalten werden um danach als CoA-Derivat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) weiterbefördert zu werden. Dies würde den „Eukaryotischen Weg“ zur Bildung von Membran- und Speicherlipiden darstellen. Das Verlängerungsprodukt aus Schritt 6 kann aber auch den „Prokaryotischen Weg“ zur Bildung von Lipiden beschreiten. Dies geschieht durch den Einfluss einer Transferase, welche den Fettsäurerest unmittelbar auf ein Glycerol-3-Phosphat überträgt. Eine weitere Möglichkeit im Anschluss an die Verlängerung nach Schritt 6 ist die Einführung einer *cis*-Doppelbindung unter dem Einfluss einer Desaturase.

Oleoyl-ACP nimmt, als fakultatives Endprodukt der Kettenverlängerung, eine Schlüsselposition als Verzweigungspunkt bei der Biosynthese ein. Oleoyl-ACP I ist ein besseres Substrat für die Thioesterase-Reaktion (Hydrolyse und Export aus dem Plasmid), Oleoyl-ACP II für die Transferase-Reaktion (Transport zur Lipidvorstufe) (96).

Der hier gezeigte Syntheseweg produziert ausschließlich gesättigte bzw. *cis*-ungesättigte Fettsäuren. Mehr als 75 % aller in Pflanzengewebe vorkommenden Fettsäuren sind ungesättigt. So auch der Fettsäurerest des Capsaicins (8-Methyl-*trans*-6-nonensäure). Nicht nur die *trans*-Doppelbindung ist ungewöhnlich, sondern auch die Verzweigung des Fettsäurerestes des Capsaicins deutet eine weitere Besonderheit im Hinblick auf die Biosynthese an:

Der Primer der Biosynthese von methylverzweigten Fettsäuren in Capsaicinoiden kann nicht Acetyl-CoA sein!

#### 2.2.2.2 Primer für die Fettsäurebiosynthese verzweigter Fettsäuren

Die Methylverzweigung der Capsaicinoide stammt aus dem Aminosäurestoffwechsel, namentlich von Valin, Leucin oder Isoleucin (27). Valin und Leucin besitzen Pyruvat als Vorläufer, welches durch die Glykolyse zur Verfügung gestellt wird. Valin und Leucin gehören biosynthetisch zur „Pyruvat-Familie“ (87). Weiterhin ist Threonin im Aminosäurestoffwechsel auch der Vorläufer des Isoleucins. Beide Aminosäuren gehören zur „Aspartat-Familie“ des Aminosäurestoffwechsels. Die gemeinsame Vorstufe von Threonin und Isoleucin ist Oxalacetat, welches im Citratzyklus gebildet wird.

Die Aminosäuren sind biochemisch nicht unabhängig voneinander. So kann die korrespondierende  $\alpha$ -Ketosäure des Valins in drei enzymatisch katalysierten Schritten (Bindung von Acetyl-CoA durch 2-Isopropylmalatsynthase, OH-Wanderung durch 3-Isopropylmalatisomerase und oxidative Decarboxylierung durch 3-Isopropylmalatdehydrogenase) in die zu Leucin korrespondierende  $\alpha$ -Ketosäure umgewandelt werden (97). Die Aminosäuren liegen in einem enzymatisch katalysierten Gleichgewicht mit den entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäuren vor. Diese werden oxidativ (mittels  $\text{NAD}^+$ ) decarboxyliert und, um als Primer für die Fettsäurebiosynthese zu fungieren, in aktivierte Coenzym A-Derivate überführt. Eine Ausnahme stellt das Threonin dar, welches metabolisch eng mit  $\alpha$ -Ketobutyrat, dem Primer der ungeradzahligen, unverzweigten Fettsäuren zusammenhängt. In diesem Fall sind zwei Schritte notwendig um aus dem Threonin als Hydroxy-Aminosäure die  $\alpha$ -Ketosäure entstehen zu lassen. Das katalysierende Enzym ist die Threonin-Dehydratase (TD), welche bereits in Tomaten beschrieben wurde (98, 99). TD, die auch als Threonin-Desaminase bekannt ist, katalysiert beide Schritte: 1. Die Desaminierung (Freisetzung von Ammoniak) und 2. die Dehydratisierung zum  $\alpha$ -Ketobutyrat (100, 101). Biosynthetisch ist dieser erste Schritt des Isoleucin-Pathways essentiell, weshalb man die Inhibierung der TD als Target für Herbizide nutzt (102).

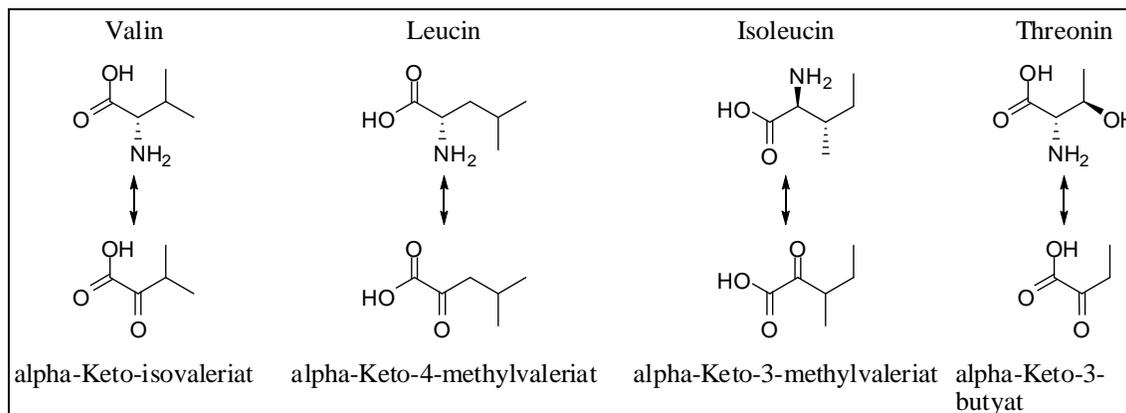


Abbildung 2-7 Die Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Threonin bzw. deren korrespondierende  $\alpha$ -Ketosäuren sind die Primer für die Fettsäurebiosynthese der Capsaicinoide

Für die Capsaicinoide mit geradem, unverzweigtem Fettsäure-Rest (z. B. *N*-Vanillyl-decanamid) bedarf es keines speziellen Primers aus dem Aminosäure-Stoffwechsel. Diese Fettsäure-Reste können durch die *de novo* Fettsäurebiosynthese ausgehend von Acetyl-CoA synthetisiert werden. Verzweigte Fettsäuren sind bei Pflanzen nicht ungewöhnlich, denn Pflanzen können die Aminosäuren für die notwendigen Primer selbst synthetisieren. So

Tabelle 2-1 Zuordnung der Primer zu den entsprechenden Capsaicinoidklassen in Bezug auf den Fettsäurerest.

AS	korrespondierende $\alpha$ -Ketosäure	CoA-Derivat	Primer für Fettsäure-Reste
Valin	$\alpha$ -Ketoisovaleriat	Isobutyryl-CoA	der <b>iso-Reihe</b> , gerade C-Zahl z.B. in DC und C
Leucin	$\alpha$ -Keto-4-Methylvaleriat	3-Methylbutyryl-CoA	der <b>iso-Reihe</b> , ungerade C-Zahl z.B. in NDC, HDC I, HC I
Isoleucin	$\alpha$ -Keto-3-methylvaleriat	2-Methylbutyryl-CoA	der <b>ante-iso-Reihe</b> , ungerade C-Zahl z.B. in HDC II, HC und NDC II
Threonin	$\alpha$ -Ketobutyriat	Propionyl-CoA	<b>unverzweigt</b> , ungerade C-Zahl z.B. Pelargonsäurevanillylamid (PSVA)

berichten Wolff et al. über verzweigte, langkettige Fettsäuren, vor allem ante-iso C17:0, die mit 1,2 % Gesamtgehalt im Speicherlipid der Samen von *Pinaceen* gefunden wurden (103). Auch in der Familie der *Solanaceen* gibt es ein weiteres Beispiel für verzweigte Fettsäuren: Kroumova et al. untersuchten die Kettenverlängerung von verzweigten Fettsäuren, die in Zuckerestern auf Blättern von u.a. Tomaten- und Tabak-Pflanzen zu finden sind (97). Im Tierreich werden nach mikrobiellem Abbau des Chlorophylls im Pansen von Kühen die Fettsäuren Pristansäure und Phytansäure gebildet, die man auch im Milchfett nachweisen kann.

### 2.2.2.3 Verlängerung der Fettsäurevorstufen bei Capsaicinoiden und Einfluss der FAS

Zwischen 1994 und 2002 gab es widersprüchliche Ansichten darüber, ob die Verlängerung bei der Fettsäurebiosynthese in 1-C-Atom-Schritten oder in 2-C-Atom-Schritten verläuft. Die zuvor erwähnte Arbeitsgruppe um Kroumova et. al. vertrat die Ansicht, dass durch eine mehrfache Wiederholung der  $\alpha$ -KAE-Reaktion ( $\alpha$ -Ketoacidelongation, ein Reaktionsweg zur Verlängerung von u.a. der  $\alpha$ -Ketoisovaleriansäure zu  $\alpha$ -Ketoisocaprionsäure im Vorfeld der eigentlichen FAS-Reaktion) eine Verlängerung um jeweils 1 C-Atom stattfindet (97). Van der Hoeven und Steffens gingen hingegen von der „normalen“ Kettverlängerung der FAS-Fettsäuresynthese um jeweils 2 C-Atome aus (104). Möglicherweise liegen, je nach Spezies, beide Mechanismen vor. Zwei Jahre später, im Jahr 2002, verwendete die Arbeitsgruppe von Robins eine neue Methode zur Untersuchung der Fettsäurebiosynthese, welche über die Isotopenverteilung von D/H die Herkunft bestimmter Wasserstoffatome der Fettsäurereste belegt. Mit dieser quantitativen  $^2\text{H}$ -NMR-Technik wurden die Fettsäurereste der Capsaicinoide untersucht und es konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Kettenverlängerung bei den Capsaicinoiden um jeweils 2 C-Atome erfolgt, also über die FAS (105).

Die aktivierten Primer (CoA-Derivate) werden dann, wie bei Pflanzen üblich, an einem Multienzymkomplex namens FAS Typ 2 (Fatty Acid Synthase) verlängert. Durch gezielte genetische Veränderung einzelner Enzymaktivitäten dieses Komplexes konnte gezeigt werden, dass diese als Regulationszentren in Bezug auf die Lipidproduktion einen Einfluss haben (94, 95). So können beispielsweise für die (Lebensmittel-) Industrie maßgeschneiderte Fette mit genetisch modifizierten Rapspflanzen produziert werden, die bestimmte Fettsäuren (Ölsäure) mit einem Anteil von mehr als 90 % enthalten.

### 2.2.2.4 Einfluss des ACP auf die Fettsäurebiosynthese

Bis zu 60 % des ACP, an dem die Kettenverlängerung stattfindet, liegen in freier Form vor. Höhere Pflanzen produzieren verschiedene ACP-Isoformen in einem für jedes Gewebe und jede Spezies unterschiedlichen Muster (106). Bonaventure und Ohlrogge (107) untersuchten das ACP-Muster in *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand), einer Modell-Pflanze bei genetischen Fragestellungen, und zeigten, dass sowohl der Kohlenhydratstoffwechsel als auch die Lichtverhältnisse einen Einfluss auf die Ausprägung des ACP-Musters haben.

Gut charakterisiert wurden ACP I und ACP II in *Spinacia oleracea* (Spinat). In Spinatblättern liegt kein unterschiedliches Muster bezüglich der Veresterung von ACP I- und ACP II-Isoformen vor. In den Samen wird dagegen mehr Malonyl-ACP II und nur Oleoyl-ACP II gefunden. Dies zeigt, dass die Unterschiede der Veresterung gewebespezifisch sind (89).

Der Einfluss des ACP auf die Regulation der Stoffwechselwege wurde auch an Samen der *Cuphea lanceolata* (Köcherblume) untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Isoform ACP I in

der Samenschale ein konstitutives Protein darstellt, welches für die Biosynthese langkettiger Membranlipide unabdingbar ist. Im Embryo dieser Pflanze ist zusätzlich eine Isoform, welche mit ACP 2 (hier ist unklar ob ACP 2 = ACP II ist) bezeichnet wurde, vorhanden. Diese Beobachtung korreliert mit der Bildung von bis zu 90 % mittelkettigen Fettsäuren in den Speicherlipiden. Demnach wird die Thioesterase-Reaktion gegenüber der Kettenverlängerung gefördert (92). Allerdings ist das ACP 2 nicht der einzige Regulator dafür. Bei Versuchen zur Rekonstitution des FAS-Komplexes durch Pflanzenextrakte aus den drei Spezies *Cuphea*, *Brassica* und *Spinacia*, mit den beiden Isoformen ACP I und ACP II aus *Cuphea lanceolata* und ACP aus *E. coli*, zeigten sich Unterschiede in der Akkumulation von mittelkettigen Fettsäuren. Da die Medium-Chain-acyl-ACP-Thioesterase keine Diskriminierung der beiden Isoformen ACP I und ACP II zeigte, wurde als Ursache für die Beobachtung der Akkumulationsunterschiede ein noch unbekannter Mechanismus („Metabolon“) genannt (108). Suh et al. überprüften die spezifische Aktivität einer Desaturase indem sie verschiedene Substrate (u.a. Palmitoyl-ACP von Koriander (*Coriandrum sativum*) versus Palmitoyl-ACP von *E. coli*) einsetzten und deren Umsetzungs-Raten zu den entsprechenden einfach ungesättigten Fettsäure (hier  $\Delta 4$ - und  $\Delta 6$ -Hexadecensäure) dokumentierten. Dazu isolierten sie einen cDNA Klon, *CS-ACP-I*, welcher für eine ACP-Isoform codiert, die im Entwicklungsstadium von Koriander-Endosperm zu finden ist. Die nach der Expression dieser cDNA in *E. coli* erhaltene ACP-Isoform co-migrierte mit der hauptsächlich in Koriander-Endosperm-Gewebe exprimierten ACP-Isoform. Sie konnten belegen, dass die Dehydrierung zu den ungewöhnlichen, einfach-ungesättigten Fettsäuren durch die Desaturase aus *C. sativum* zehnfach schneller geschieht, als mit C16:0-ACP aus *E. coli*. Selbst im Vergleich mit C16:0-ACP aus Spinat (*Spinacia oleracea*) verlief die Umsetzung um den Faktor 4 schneller (109). Die Ergebnisse zeigen, dass spezifische ACP-Isoformen in die Biosynthese dieser ungewöhnlichen, einfach-ungesättigten Fettsäuren involviert sind.

Da war es nahe liegend den Schlüssel für die Bildung der besonderen Fettsäuren der Capsaicinoide in dem Einfluss der ACP-Isoformen zu suchen. Aus scharfen, unreifen Chili-Früchten (*C. chinense* var. *Habanero*, *C. annuum* var. *Jalapeno* und *C. annuum* var. *New Mexico 6-4*) wurde durch Aluru et al. (82) für Chili-ACP ein cDNA Klon gewonnen, welcher eine mehr als 70 % ige Sequenzhomologie mit anderer Pflanzen-ACP aufweist. Das Vorkommen von Transkriptions-Produkten für dieses Gen korreliert positiv mit dem Vorhandensein von Schärfe. In Plazenta-Gewebe ist der Gehalt doppelt so hoch wie im Perikarp. In anderen Pflanzenteilen, wie Wurzel, Stamm, Blatt, Blüte und Samen wurden Transkriptionsprodukte in geringer Konzentration gefunden. Da dieses ACP konstitutiv exprimiert ist und sich geringfügig auch in nicht scharfem *Capsicum* findet, kann es nicht ausschließlich für die Regulation der Synthese von Capsaicinoid-Fettsäuren verantwortlich sein (84).

#### 2.2.2.5 Einfluss der 3-Ketoacyl-ACP Synthase (KAS) auf die Fettsäurebiosynthese

Die KAS ist Teil des Multienzymkomplexes FAS Typ II und katalysiert den 3. Schritt bei der zyklischen Verlängerung des Fettsäurerestes (Abbildung 2-5). KAS besitzt eine Bindestelle für Malonyl-ACP und eine Bindestelle für Acyl-ACP. Bei der Kondensation im 3. Schritt wird der Acyl-Rest vom ACP abgespalten und auf das  $\alpha$ -C-Atom des Malonyl-ACP übertragen und CO<sub>2</sub> freigesetzt. Es gibt mindestens 4 KAS Isoenzyme, die sich einerseits darin unterscheiden, welchen Acyl-Rest sie als Primer akzeptieren und andererseits bis zu welcher Kettenlänge die Wiederholung des Verlängerungszyklus erfolgen kann. Eine

analytische Unterscheidung dieser Isoformen ist durch die selektive Inhibition durch Cerulenin, respektive Thiolactomycin, möglich (91).

**Tabelle 2-2 KAS-Isoformen und deren Eigenschaften**

Isoenzym	akzeptierte Primer	isoliert aus	Inhibition durch	Literatur
<b>KAS I</b>	kurzkettige Acyl-ACP's	<i>Cuphea lanceolata</i>	Cerulenin	Schuch et al. 1994 (110)
<b>KAS II</b>	C14- und C16-ACP	Samen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	Cerulenin (teilweise)	Leonard et al. 1998 (111)
<b>KAS III</b>	Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, Butyryl-CoA und weniger gut: Acetyl-ACP	Samen aus <i>Cuphea lanceolata</i>	C10-ACP	Schuch et al. 1994 (110), Brück et al. 1996 (112)
<b>KAS IV</b>	C4- und C6-ACP (bis C10), wenig C12-ACP	Samen aus <i>Cuphea lanceolata</i>	Cerulenin	Schutt et al. 2002 (113), Dehesh et al. 1998 (114), Abbadi et al. 2000 (115)
<b>mt-KAS*</b>	alle FS ausgehend von Malonyl-CoA	Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i>	Cerulenin (wie KAS I)	Yasuno et al. 2004 (116)

**\*(mitochondrial; Sequenzhomologie zu KAS II aus *E. coli* am größten)**

Es werden aber auch KAS-Enzyme beschrieben, die aufgrund ihrer Eigenschaften (Inhibitoren, akzeptierte Substrate etc.) nicht eindeutig zugeordnet werden können. So spielt bei der Verlängerung von  $\Delta 4$ -Z-Hexadecensäure zu Petroselinensäure ( $\Delta 6$ -Z-C18:1-FS) in Koriander-Samen (*Coriandrum sativum*) ein Cerulenin-sensitives KAS I eine wichtige Rolle, welches aber im aktiven Zentrum in der Aminosäuresequenz von KAS I und KAS II abweicht (117).

Dehesh et al. (118) zeigten, dass eine Überexpression von KAS II zu einer Verringerung des für die anderen KAS-Enzyme ebenfalls benötigten Malonyl-ACP als Substrat führt und damit das Fettsäurespektrum verändert wird. Die Konzentration an Malonyl-ACP wird zum limitierenden Faktor und führt zu einer Verringerung der Konzentration aller Lipide und zu einer Verringerung der Verlängerung von C16:0-ACP zu C18:0-ACP. Diesen Einfluss konnten sie für mehrere Pflanzenarten (Spinat (*Spinacia oleracea*), Tabak (*Nicotiana tabacum*), Raps (*Brassica napus*) etc.) und unabhängig von der Gewebeart demonstrieren.

Über die Verlängerung von verzweigten Primern ist relativ wenig bekannt. Ein KAS II aus Bakterien (*Bacillus subtilis*) startet auch mit iso- und anteiso-verzweigtem Acyl-CoA (119). Speziell im Hinblick auf die Capsaicinoide ist dieser Umstand beachtenswert. Aus der Plazenta von scharfen unreifen *Capsicum*-Früchten (*C. chinense*) erhielten Curry et al. einen cDNA-Klon, mit 75 % Sequenzhomologie zu den pflanzlichen KAS-Genen und höchster Ähnlichkeit mit KAS I (83). Der cDNA-Klon wurde in *E. coli* exprimiert, das gebildete Enzym isoliert und anschließend in Bezug auf seine Aktivität getestet. Zur Aktivitätsprüfung des rekombinanten Proteins wurde *E. coli*-ACP, Isobutyryl-CoA und  $^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA eingesetzt. Die Hemmung der Reaktion durch 20  $\mu\text{M}$  Cerulenin ist charakteristisch für KAS I. Mit dem rekombinanten Protein wurden in Kaninchen polyklonale Antikörper erzeugt. Mit diesen Antikörpern konnten in der Plazenta unreifer Früchte, speziell in der Epidermis in der Nähe der Blasen („receptacles“), ein positiver Nachweis (Immunoblotting) auf dieses KAS geführt werden. Im Perikarp, wie auch in Samen, verlief der Nachweis negativ. Das gewebespezifische Auftreten deutet auf die Beteiligung bei der Synthese der verzweigten

Fettsäuren oder auf eine Beteiligung bei der Bildung von Strukturen dieser Blasen hin (82). Dieses Isoenzym darf als wesentliches Element für die Steuerung der Fettsäuresynthese angesehen werden, besonders im Zusammenspiel mit der auch durch einen cDNA-Klon kodierten speziellen Thioesterase (s. 2.2.2.6).

Bei der Biosynthese von Zuckerestern (s. 2.2.2.1) erfolgt die Kettenverlängerung der verzweigten Fettsäuren möglicherweise zuerst durch KAS III (oder KAS IV) bis zur Iso-C9-Fettsäure und dann weiter durch KAS I bis zur Iso-C11-Fettsäure (104).

Prasad et al. zeigten an Zellkulturen von *C. frutescens*, dass Cerulenin die Biosynthese von Capsaicin hemmt und dabei Vanillylamin akkumuliert (120). Die dort getroffene Aussage, dass 8-Methyl-6-nonensäure als Precursor im gleichen Ausmaß verringert ist, muss angezweifelt werden, da die beschriebene Analytik nicht zuverlässig zwischen freier und im Amid gebundener Fettsäure unterscheidet. Die Bestimmung der freien Säure liefert falsch-positive Werte und kann als zusätzliche Parallelbestimmung der Capsaicinoide gedeutet werden. Weder eine Hemmung der Biosynthese von Dihydrocapsaicin noch der gesättigten Fettsäure 8-Methyl-nonensäure als Precursor wird von Prasad et al. thematisiert, obwohl Werte auch für Dihydrocapsaicin in den 3 untersuchten Species angeführt werden.

#### 2.2.2.6 Einfluss der Thioesterasen auf die Fettsäurebiosynthese

Die für die Regulation sehr wichtigen Thioesterasen, welche aus den ACP-Derivaten die freien Fettsäuren abspalten, klassifizieren sich nach einem DNA-Stammbaum in zwei Hauptzweige (121):

1. FATA (Fatty Acid Thioesterase A, ist konstitutiv expremiert, spaltet bevorzugt C18:1-ACP)
2. FATB (Fatty Acid Thioesterase B, unterschiedliche Spezifitäten für gesättigte Acyl-ACP)

Die Oleoyl-ACP spaltende FATA ist hochspezifisch für die *cis*- $\Delta$ 9-Konfiguration. Es gibt jedoch auch Thioesterasen, die langkettige Fettsäuren anderer Konfiguration (z. B. in Koriander Petroselinensäure (*cis*- $\Delta$ 6-C18:1-FS)) spalten können (122).

FATB-Thioesterasen haben einen entscheidenden Einfluss auf den Export der Fettsäuren aus dem Plastid (eukaryotischer Weg der Lipidbiosynthese), das Pflanzenwachstum und die Synthese von Wachsen (123).

In transgenen Pflanzen kann man die Fettsäuresynthese auf dem Niveau der mittelkettigen Fettsäuren stoppen, allerdings erfolgt die Regulation durch ein Zusammenspiel von speziellem KAS-Typ und Thioesterase (124, 125). Dieser Komplex mit ACP wurde mit dem Begriff „metabolon“ bezeichnet (108).

Ein cDNA-Klon aus der Plazenta von *Capsicum*-Früchten kodiert für eine Thioesterase, die wegen der Homologie den Oleoyl-ACP spaltenden Isoformen (FATA) zugeordnet wurde (82). Von der enzymatischen Spezifität her sollte man sie in dem anderen Zweig erwarten. Jedenfalls ist sie zusammen mit der KAS der bislang wahrscheinlich wichtigste Faktor für die Ausprägung des Capsaicinoid Musters. Vermutlich spielt auch hier die Konkurrenz mit der Kettenverlängerung, wie bei mittelkettigen unverzweigten Fettsäuren, eine Rolle.

### 2.2.2.7 Einfluss der Acyl-CoA-Synthasen auf die Fettsäurebiosynthese

Nach der Freisetzung der Fettsäuren durch eine Thioesterase ist ein bislang ungeklärter Transport aus dem Plasmid erforderlich um die Fettsäure, z.B. für die Bildung von Triglyceriden oder Membranlipiden, zu verwenden (86). An der Membran werden die Fettsäuren zu CoA-Derivaten umgesetzt und dann evtl. noch zu VLCMFA (very long chain monounsaturated fatty acid) verlängert oder stehen direkt zur Synthese von Folgeprodukten bereit (126, 127). Über die dazu benötigten Acyl-CoA-Synthasen ist in *Arabidopsis thaliana* einiges bekannt. Shockey et al. berichten von einer großen Familie (63 verschiedene Gene) von Acylaktivierenden Enzymen, von denen eine Gruppe auch kurz- und mittelkettige Fettsäuren (C4- bis C8-FS) zu aktivieren vermag (128). Eine aus *Pinus radiata* isolierte Acyl-CoA-Synthase akzeptierte *in vitro* auch Iso-butyrat als Substrat (129). Die an *Capsicum* untersuchten Aspekte hierzu betrafen lediglich ein Acyl-CoA-Synthase-Gen, welches aus Blüten erhalten wurde (130). Früchte wurden nicht untersucht, obwohl Fujiwake et al. (131) das Vorliegen von Acyl-CoA-Derivaten als notwendige Bedingung zur Kondensation von Acyl-Rest und Vanillylamin zum Capsaicinoid formulierten und darstellten, dass das Capsaicinoidmuster maßgeblich vom Acyl-CoA-Pool abhängen müsse.

### 2.2.2.8 Einführung einer Doppelbindung in der Fettsäurebiosynthese

Doppelbindungen werden in Fettsäuren nur eingefügt, wenn sie an ACP, CoA oder Lipide gebunden sind. Die katalysierenden Enzyme sind verschiedene Klassen von Desaturasen (132). Für die Desaturierung zu der sehr wichtigen Ölsäure (*cis*- $\Delta^9$  C18:1-FS) kommt die löslich Stearoyl-ACP-Desaturase häufig vor. Die Einführung einer *cis*-Doppelbindung stellt demnach keinen ungewöhnlichen Vorgang dar (133). Es gibt weitere Beispiele für die Einführung erster *cis*-Doppelbindungen durch speziesspezifische Desaturasen (häufig mit Ferredoxin als Cofaktor) (134). Das Muster der dabei gebildeten einfach ungesättigten Fettsäuren wird vermutlich durch einen membrangebundenen Multienzymkomplex kontrolliert (135).

Für die Einführung der ersten Doppelbindung in lipidgebundenen Fettsäuren sind membrangebundene Desaturasen verantwortlich (136).

Das Besondere an der 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure ist die *trans*-Konfiguration der Doppelbindung. Es liegt für den prokaryotischen Weg lediglich ein Beispiel vor, bei dem als erste Doppelbindung eine *trans*-Doppelbindung in den Acyl-Rest einer Fettsäure (*trans*- $\Delta^3$  C16:1-FS) eingeführt wird (132). Das Enzym für diese einzigartige Bildung einer ersten Doppelbindung in *trans*-Konfiguration ist noch nicht charakterisiert. Bekannt ist die Mutante FAD4 (Fatty Acid Desaturase 4) in *Arabidopsis*, jedoch nicht die entsprechende Gensequenz (137). Diese Fettsäure findet sich auch im Phosphatidylglycerol des LHC II (Light-Harvesting-Complex II) in der Thylakoidmembran der Chloroplasten in Winterroggen (*Secale cereale*). Bei Winterroggen aus dem Gewächshaus wurden höhere Gehalte dieser Fettsäure gefunden als im Sommer bei dem auf dem Feld gewachsenen (138). Die Bildung wird demnach durch Licht und die Temperatur beeinflusst.

In Chloroplasten aus *Capsicum*-Früchten findet sich keine *trans*- $\Delta^3$  C16:1-Fettsäure, wohl aber in Blättern, passend zur Funktion im Chlorophyllkomplex der Photosynthese (139).

Eigentlich geht man davon aus („believed“, Dörmann et al. 2000 (140)), dass im eukaryotischen Weg, außerhalb der Chloroplasten keine *trans*-Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren von Lipiden eingeführt werden, trotzdem findet man in Samen von *Thalictrum*

(Familie *Ranunculaceae*) einfach ungesättigte *trans*-Fettsäuren (*trans*- $\Delta^5$  C16:1-FS und *trans*- $\Delta^5$  C18:1-FS) (141). Weiterhin werden *trans*- $\Delta^3$  C16:1-FS und *trans*- $\Delta^3$  C18:1-FS in *Grindelia* (Familie *Asteraceae*) und anderen, sowie *trans*- $\Delta^6$  C16:1-FS und *trans*- $\Delta^6$  C18:1-FS in *Picramnia* (Familie *Simaroubaceae*) gefunden, auch in Kombination mit weiteren *cis*-Doppelbindungen (142).

Die Arbeitsgruppe von Iwai et al. untersuchte 1979 (143) die Biosynthese der Capsaicinoide und vermutete wegen des konstanten Fettsäuremusters während der Fruchtreifung keine Veränderung der an Vanillylamin gebundenen Fettsäuren. Für die beiden Hauptcapsaicinoide bestätigte Jurenitsch et al., dass weder die Einführung der Doppelbindung noch eine Hydrierung an der im Vanillylamin gebundenen ungesättigten Fettsäure erfolgt (144). Die Doppelbindung muss also vor der Kondensation zum Vanillylamid im Acyl-Rest der Fettsäure gebildet werden. Auch die Arbeitsgruppe Blum et al. (145) vermutet die Einführung der Doppelbindung vor der Kondensation zum Amid und bildete in einem Schema zum Biosyntheseweg der Capsaicinoide, zwischen dem 8-Methylnonansäure-CoA und dem daraus entstehenden 8-Methyl-6-nonensäure-CoA, die Desaturase ab.

Prasad et al. (120) veröffentlichten 2006 ein Biosyntheschema, welches eine 8-MNAD (8-methyl-nonanoic acid dehydrogenase) aufführt, ohne dies zu kommentieren, ein Zitat anzuführen oder experimentelle Daten vorzulegen. In ihrer Diskussion der Publikation bezeichnen sie 8-Methylnonansäure als Precursor von 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure.

Damit bleibt die Frage weiterhin offen, zu welchem Zeitpunkt die Doppelbindung eingeführt wird und welche biochemische Umsetzung dafür verantwortlich ist.

## 2.3 Kondensation von Vanillylamin und Fettsäure zum Capsaicinoid

Nachdem der Phenylpropanoidweg als Biosyntheseweg für das Vanillylamin auf der einen Seite und die Fettsäurebiosynthese auf der anderen Seite unter Berücksichtigung der vielschichtigen Einflussmöglichkeiten betrachtet wurde, muss der Mechanismus der eigentlichen Capsaicinoid-Synthese betrachtet werden.

### 2.3.1 Die Capsaicin-Synthase (CS)

Fujiwake et al. (131) klärten zweifelsfrei auf, dass die Fettsäuren als CoA-Derivate für die Kondensation mit Vanillylamin benötigt werden. Wichtige Indizien erhielten sie durch die Solubilisierung, Ammoniumsulfatfällung und anschließende Anreicherung der CS. Sie wurde an der Membran von Tonoplasten/Vakuolen der Plazenta lokalisiert. In zellfreien Systemen, die nicht 1:1 die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln können, boten sie der CS eine Mischung verschiedener Substrate, wie 5-Methylhexansäure-CoA, 6-Methylheptansäure-CoA, 7-Methyloctansäure-CoA, 8-Methylnonansäure-CoA, 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure-CoA und 9-Methyldecansäure-CoA an. Dieses Modell konnte zeigen, dass das Fettsäuremuster in den Capsaicinoiden nicht durch die Spezifität dieses Enzyms bestimmt wurde. Somit muss der Pool der CoA-Derivate dafür verantwortlich sein. Die Umsatzrate für Acyl-CoA-Derivate war dabei 6,4-mal höher als für freie Fettsäuren.

26 Jahre später nahmen Prasad et al. (146) dieses Thema mittels einer „enzyme to gene“-Strategie wieder auf und reinigten die CS 200-fach bis zu einer einheitlichen 35 kDa Bande (SDS-PAGE) auf und charakterisierten anschließend das Enzym (pH-Wert- und Temperatur-Optimum,  $K_m$  und  $v_{max}$ ) für die Substrate Vanillylamin und 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure (andere Substrate wie CoA-Derivate wurden bedauerlicherweise nicht untersucht). Die für die Aktivierung der Fettsäuren benötigte Acyl-CoA-Synthase ist also entweder eine Eigenschaft des CS-Enzyms selbst oder wurde mit ihm zusammen aufgereinigt. Gegen das aufgereinigte Enzym wurden polyklonale Antikörper erzeugt und damit CS in peripheren Zellen der Plazenta von Früchten 28 Tage bis 50 Tage nach Blüte nachgewiesen, parallel zu Capsaicin-Gehalten. Aus dem N-terminalen Ende der AS-Sequenz des Enzyms wurde ein Primer für die PCR (Polymerase Chain Reaktion) abgeleitet und ein 981 bp langes Amplifikat erhalten. Dieses als *cys1* bezeichnete Gen ist exprimiert in Plazenta-cDNA und im Genom unterschiedlich scharfer *Capsicum*-Varietäten und konnte in schärfefreiem *Capsicum* nicht nachgewiesen. Da die CS nicht glykosiliert ist, konnte sie in *E. coli* heterolog exprimiert werden und für die o.a. Charakterisierungen, für die nur wenige Details vorliegen, verwendet werden. Nach der Übersetzung dieses Gens in eine AS-Sequenz wurde ein Sequenzvergleich mit bekannten CoA-abhängigen Acyltransferasen unternommen. Dabei wurde keine Homologie mit den Genen (*SB2-66* bzw. *Pun1*) gefunden, die man zuvor als möglichen „Schalter“ für das Vorhandensein von Schärfe oder auch CS in Chilis diskutiert hatte (147). Da die CS-Enzymaktivität sich nur auf das Plazenta-Gewebe beschränkt, handelt es bei *cys1* um ein Strukturgen (84).

Anhand der Biosynthese der Capsinoide, den Vanillylalkoholestern aus *Capsicum annum* var. *CH-19 sweet*, kann man mutmaßen, dass die CS auch den Vanillylalkohol als Substrat akzeptiert und nicht zwangsläufig das Amin benötigt (47, 48, 148).

## 2.4 Genetische Regulation der Capsaicinoid-Biosynthese

Die Frage nach dem Nutzen der Capsaicinoid-Biosynthese für die Pflanze verbietet sich eigentlich, denn damit würde man implizieren, dass eine intelligenter „Zweck“ die Evolution lenkt. Trotzdem gibt es einige interessante Aspekte rund um die Capsaicinoid-Biosynthese, die den mit der Synthese verbundenen Aufwand zu rechtfertigen scheint. Umweltstudien geben Hinweise darauf, dass Capsaicinoide evolutionär einen Vorteil darstellen, zum Zweck der Abschreckung von Fraßfeinden aus der Klasse der Säugetiere (149). Vögel sind die bevorzugten Samen-Verbreiter von wilden *Capsicum*-Pflanzen. Nach der Aufnahme der Chilis durch die Vögel transportieren sie die Samen in ihrem Verdauungstrakt und scheiden diese an Plätzen (z.B. unter Bäumen) wieder aus, die für *Capsicum* optimale Lichtverhältnisse bereitstellen. Darüber hinaus wird die Samenschale aufgeweicht und so die Keimung der Samen nach der Magen- und Darmassage bei den Vögeln verbessert. Im Gegensatz dazu sind Säugetiere extrem sensitiv gegenüber Capsaicinoiden, sie verspüren Schmerz, sobald Capsaicinoide mit epidermalem Gewebe in Kontakt kommen. Der Schmerz wird durch eine Aktivierung des TRPV1 hervorgerufen, bei Vögeln spricht dieser nicht auf Capsaicinoide an (55, 150). Säugetiere kauen darüber hinaus ihre Nahrung und die drastischen, stark sauren Bedingungen in den Mägen der Säugetiere schaden den Samen (149).

Die Pflanze hat gewisse Vorteile Capsaicinoide zu synthetisieren. Warum gibt es dann aber *Capsicum*-Pflanzen, die völlig frei von Schärfe sind? Sind die Capsaicinoide vielleicht nur ein Nebenprodukt eines anderen biosynthetischen Weges? In Populationen von drei in Bolivien wild vorkommenden ursprünglichen Species (*C.chacoense*, *C.baccatum* und *C.eximium*) wurden neben Pflanzen mit scharfen auch solche mit nicht-scharfen Früchten gefunden. Tewksbury (151) machte diese Beobachtungen in freier Natur durch sensorische Tests. In geographisch höheren Lagen war Schärfe häufiger und ausgeprägter anzutreffen. An einem Ort wurden individuelle Pflanzen 3 Jahre beprobt, von 5 *C.chacoense* Populationen wurden aus Samen im Gewächshaus Pflanzen gezogen und Früchte gepoolt (hierzu wurden keine Details angegeben), getrocknet und per HPLC untersucht. Das Auftreten von Schärfe war konsistent, also in der Pflanze genetisch stabil. Auch Zewdie und Bosland (20) hatten schon die Polymorphie innerhalb einer Spezies gezeigt und daraufhin das Capsaicinoidmuster als taxonomisches Kriterium ausgeschlossen.

Welche Eigenschaft zeigt die ursprüngliche *Capsicum*-Pflanze; trägt sie scharfe oder nicht-scharfe Früchte? Walsh und Hoot (19) behaupten, dass *Capsicum ciliatum* mit Früchten ohne Schärfe phylogenetisch basal zu allen anderen *Capsicum*-Spezies ist.

Die Bildung von Capsaicinoiden ist auf den Genus *Capsicum* beschränkt. Frühe genetische Studien ab 1935 zeigten, dass ein einzelnes dominantes Gen, der so genannte Locus „C“, notwendiger Weise vorhanden sein muss um Schärfe in Früchten zu generieren (152). Pflanzen, die homozygot rezessiv in Bezug auf den Locus C sind, können unabhängig vom Genotyp an anderen Loci keine Schärfe in Früchten entwickeln (153). Lange Zeit gab es jedoch keine Anhaltspunkte für die zelluläre Ausprägung des Locus C. Das Gen liegt auf dem Chromosom 2 und ist komplett dominant für Schärfe, es kontrolliert allerdings nicht den Grad der Schärfe (152).

Auf der Suche nach dem „genetischen Schalter“ für Schärfe waren in den letzten Jahren die Arbeitsgruppen um Molly Jahn sehr aktiv (72, 84, 154, 155). In diesem Zusammenhang wurde auch von Kim et al. (147) ein *Capsicum* cDNA Klon (SB2-66) charakterisiert mit einer Homologie zu CoA-abhängigen Acyltransferasen (AT3), welche in der Lage sind Fettsäuren

auf Alkohole und Amine zu übertragen. Zwei Arbeiten aus dem Jahr 2005 deuten darauf hin, dass dieser Locus C, welcher jetzt *Pun1* genannt wird, dieses *SB2-66 Gen* ist, und dass eine Deletion (2.5 kb) für das Ausbleiben von Schärfe verantwortlich ist. Sie liegt in allen untersuchten nicht scharfen Varietäten vor, ist daher wohl in einem sehr frühen Stadium der Domestikation von *Capsicum annuum* passiert (84, 156).

Das Gen *SB2-66* (AT3) wurde in *E. coli* exprimiert und polyklonale Antikörper für ein Immunoblotting erzeugt. Damit konnte das Protein exklusiv in der Plazenta von Früchten 20 bis 40 Tage nach Blüte gefunden werden. Eine Enzymaktivität konnte noch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz wird es zur BAHD-Superfamilie der Acyltransferasen gerechnet, die Acetyl-, Malonyl- und aromatische Acyl-Reste transferieren (84).

Es stellt sich allerdings die Frage, ob diese BAHD-Acyltransferase auch aliphatische, längerkettige Fettsäuren transferiert?

2007 konnten Stewart et al. (72) zeigen, dass es neben dem Allel *pun1* mit der 2.5 kb-Deletion eine weitere Verlustmutante *pun1*<sup>2</sup> mit einer 4b-Deletion gibt, die in *C. chinense* var. *NMCA 30036* zum Ausbleiben von Schärfe führt. Dies machte sich auch im Phänotyp durch eine glatte Epidermis der Scheidewände ohne Bläschen (receptacles/blisters) bemerkbar. Diese beiden rezessiven Allele *pun1* und *pun1*<sup>2</sup> führen bei einer Kreuzung nicht zum Auftreten von scharfen Früchten in der F1-Generation, werden also nicht komplementiert. Das dem intakten *Pun1* Gen entsprechende Protein wird ab 20 Tage nach Blüte in der Scheidewand (interocular septum) nachgewiesen, allerdings nicht mehr nach 50 Tagen nach Blüte. Damit zeitlich korrelierend erfolgt eine koordinierte Hoch-Regulation mehrerer Biosynthese-Gene (*Pal*, *AT3* und *Kas*).

Votava und Bosland (157) berichteten im Vorfeld dieser Erkenntnisse von Kreuzungsversuchen nicht-scharfer Varietäten, bei denen in der F1-Generation scharfe Früchte gebildet wurden. Sie benutzten die von ihnen mit *lov* benannten Mutanten (loss of vesicle), *C. chinense* var. *NMCA 30036* und *C. chinense* var. *PI 543190*. Diese wurden sowohl untereinander, als auch mit der nicht-scharfen Varietät *C. annuum* var. *Keystone Resistent Giant* gekreuzt. Diese Komplementierung legt den Schluss nahe, dass es sich um unterschiedliche Allele oder Gene handelt (für *Pun* und *lov*). Also müssten auch die Varietäten *C. chinense* var. *PI 543190* und *Keystone Resistant Giant* betreffend *Pun* und *lov* charakterisiert werden.

Die Gruppe um Ochoa-Alejo (158) benutzen Fragmente der COMT, pAMT und KAS Gene, um diese mittels eines PHYVV-Vectors (*Pepper Huasteco Yellow Veins Virus*) auszuschalten. Damit sollte der Einfluss dieser Enzyme auf die Capsaicinoid-Biosynthese untersucht werden. Chili-Pflanzen, die unter dem Namen Serrano bekannt sind (*C. annuum* var. *Tampiqueño*), wurden im Alter von 1 Monat durch den Beschuss mit Wolfram-Mikropartikeln, welche mit der PHYVV-DNA überzogen waren, infiziert. Der Erfolg der Infektion wurde mittels Dot-Blot der verschiedenen Gewebe, wie Blätter, Perikarp und Plazenta, überprüft. Durch unterschiedliche Vektoren (PHYVV::*COMT*, PHYVV::*pAMT* und PHYVV::*KAS*) war es möglich die Gene für die Enzyme unabhängig voneinander zu deaktivieren (silencing). Bei allen drei Modellen war ein Rückgang des Capsaicins und des Dihydrocapsaicins um etwa 80 %, verglichen mit dem Mittelwert von Früchten einer Kontrollgruppe, zu beobachten. Allerdings hatten Stewart et al. (84) 2005 gezeigt, dass bereits die Infektion von *Capsicum*

mit einem leeren Virus-Vektor zu einer um 70 % verringerten Capsaicinoidproduktion führt. Dies wurde mit dem Stress für die Pflanze durch eine virale Infektion erklärt.

Zudem zeigten die Pflanzen, in denen COMT und KAS ausgeschaltet waren, ein verringertes Wachstum und einige weitere morphologischen Veränderungen. Das führt zu der Annahme, dass diese Gene auch in anderen Geweben exprimiert sind und in weiteren metabolischen Wegen eine Rolle spielen. Ochoa-Alejo et al. konnten allerdings nicht genau spezifizieren, welche Gene durch das Ausschalten genau betroffen sind, da z.B. alleine vom KAS acht Kopien auf sieben verschiedenen Chromosomen in *Capsicum* zu finden sind, wie ein Gen-Mapping von Blum et al. ergab (145). Es kann also keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine hypothetische Veränderung in der Synthese von methylverzweigten Fettsäuren der Capsaicinoid-Biosynthese das kümmerliche Wachstum hervorruft, oder ob ein anderes Mitglied der KAS-Genfamilie dafür verantwortlich ist. Das Ausschalten von pAMT schadete der Pflanze, äußerlich betrachtet, nicht. Hingegen ist die Umsetzung von Vanillin zu Vanillylamin (durch pAMT) für die Pflanze nicht essentiell. Die Rolle von pAMT bei der Synthese von Vanillylamin ist aber noch wenig erforscht.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass es vermutlich nicht nur einen genetischen Faktor gibt, der das Vorhandensein von Schärfe determiniert (155).

### 3 Zielsetzung

Capsaicinoide, wie auch die Capsinoide, sind durch ihre Wirkung als TRPV1-Agonisten in vielfältiger Form in der Pharmakologie im Einsatz. Sie zeigen viel versprechende Eigenschaften bei der Unterdrückung der Cancerogenese (57-61). Weiterhin könnten Capsaicinoide durch den Einfluss auf den Lipidstoffwechsel helfen, Zivilisationskrankheiten wie Adipositas zu verringern (62-70). Die Kultivierung von *Capsicum*-Pflanzen stellt eine große Herausforderung dar. Insbesondere im Hinblick auf die starke Heterogenität im Schärfegehalt von verschiedenen Früchten der selben Pflanze (159). Um für die vielfältigen Einsatzgebiete der Capsaicinoide Pflanzen zu kultivieren, die ein Minimum an Schwankungen im Capsaicinoidgehalt aufweisen, ist es notwendig, die Biosynthese der Capsaicinoide zu untersuchen.

Obwohl seit vier Dekaden die Forschung zur Biosynthese der Capsaicinoide in mehreren Arbeitsgebieten gleichzeitig vorangetrieben wird, sind einige zentrale Aspekte noch nicht verstanden. So ist bislang völlig unklar, warum die besonderen Fettsäuren, speziell die 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure in keinem anderen Genus gefunden wurde. Für die Fettsäurebiosynthese ist es darüber hinaus sehr ungewöhnlich, dass als erste und einzige Doppelbindung eine *trans*-Doppelbindung eingeführt wird. Dies wurde bislang ebenfalls nicht aufgeklärt.

Auf der Grundlage des heutigen Verständnisses der Fettsäurebiosynthese im Hinblick auf die regulatorischen Einflüsse von Acyl-CoA-Synthasen und die verschiedenen Acyl-Carrier-Protein-Isoformen (ACP-Isoformen) ist die genauere Betrachtung der Fettsäureintermediate ein möglicher Forschungsansatz. Fujiwake et al. (131) zeigte, dass *in vitro* die Kondensation des Fettsäurerestes mit Vanillylamin zum Capsaicinoid um den Faktor 6,4 schneller verläuft, wenn als Substrat die entsprechenden CoA-Derivate anstatt der freien Fettsäuren angeboten werden. Mit molekularbiologischen Techniken und mittels genetischer Untersuchungen wurden zwar verschiedene Enzyme der Capsaicinoid-Biosynthese charakterisiert, ein analytischer Ansatz zur Untersuchung des Fettsäurepools der Thioester wurde hingegen bislang noch nicht beschrieben.

In dieser Arbeit soll der Pool der an ACP gebundenen Fettsäuren untersucht werden. Die Verlängerung der Fettsäurereste während der Biosynthese findet am FAS II-Enzymkomplex statt, dabei ist die Fettsäure an Acyl-Carrier-Protein gebunden. FAS II-Enzymkomplex stellt eine biosynthetische Drehscheibe dar, von der aus die Produkte zum Zeitpunkt verschiedener Stadien der Kettenverlängerung zur endgültigen Verwendung in der Pflanze in unterschiedliche Richtung transportiert werden. Aus diesem Grund ist es besonders interessant zu erforschen, ob zu diesem Zeitpunkt das Muster der Capsaicinoide schon durch das Muster der Acyl-ACP's festgelegt ist.

Diese Fettsäurederivate stellen aktivierte, hochempfindliche Analyten dar, die besondere Maßnahmen zur analytischen Erfassung erfordern. Der erste wichtige Punkt auf der Agenda ist die Etablierung einer empfindlichen und spezifischen Methode zum Nachweis und zur Bestimmung von Acyl-Thioestern von verzweigten mittelkettigen Fettsäuren aus dem Pflanzen-Material.

Aus diesem Grund ist es notwendig, in Eigenleistung *Capsicum*-Pflanzen zu kultivieren. Dadurch ist sichergestellt, dass Untersuchungsmaterial definierter Herkunft und geeigneter Beschaffenheit (Frische, Schärfe, erwartetes Capsaicinoidmuster) und Menge zur Verfügung steht.

Falls sich Acyl-Thioester zur richtigen Zeit (Bildung der Capsaicinoide ab etwa 20 Tage nach Blüte) am richtigen Ort (Ort der Biosynthese: Plazenta-Gewebe) nachweisen lassen, ist es von besonderem Interesse, diese mit dem Muster der bis zu diesem Zeitpunkt gebildeten Capsaicinoide zu vergleichen.

Hieraus lassen sich dann Rückschlüsse ziehen, ob einige der Acyl-Thioester als Vorstufen der Capsaicinoide fungieren. Bislang konnten derartige Zwischenstufen nicht direkt analysiert werden.

## 4 Untersuchungen und Ergebnisse

### 4.1 Analytischer Ansatz

Aufgrund der apparativen Voraussetzungen wird zur Bestimmung von Acyl-Thioestern ein analytischer Ansatz gewählt, welcher auf einer GC/MS-Untersuchung nach Derivatisierung zu den entsprechenden *N*-Butylamiden basiert. Mit dieser Methode konnten Kopka et al. (160) Acyl-Thioester in Spinatblättern bestimmen. Ihr Ziel war die Bestimmung von Thioestern, welche sich aus einem Acyl-Rest und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) zusammensetzen. Durch die Probenaufarbeitung und Anreicherung an einem Anionenaustauschermaterial (DEAE-Cellulose) konnten interferierende Derivate des Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA), welche ein analoges Reaktionsverhalten aufweisen, entfernt und Acyl-ACP im pmol-Bereich nachgewiesen werden. Die Methode darf als sehr selektiv angesehen werden, da zuerst eine Thioester-Anreicherung stattfindet, bei der evtl. störende Matrixbestandteile wie z.B. freie Fettsäuren und Lipide durch Waschschrte entfernt werden. Hierauf folgt die Entfernung der Acyl-CoA's mittels einer Lithiumchlorid-Lösung (0,15 M LiCl). Nach einem weiteren Waschschrte können die Acyl-ACP's Thioester mit erhöhter Ionenstärke (0,5 M LiCl) eluiert werden. Darauf folgt in wässriger Lösung eine Aminolyse-Reaktion. Durch die Thioester-Funktionalität sind Acyl-ACP's und Acyl-CoA's sehr reaktionsfähig und bilden unter den gewählten Bedingungen selektiv mit *n*-Butylamin *N*-Butylamide. Die erhaltenen *N*-Butylamide lassen sich mittels flüssig-flüssig Extraktion isolieren und per GC/MS bestimmen.

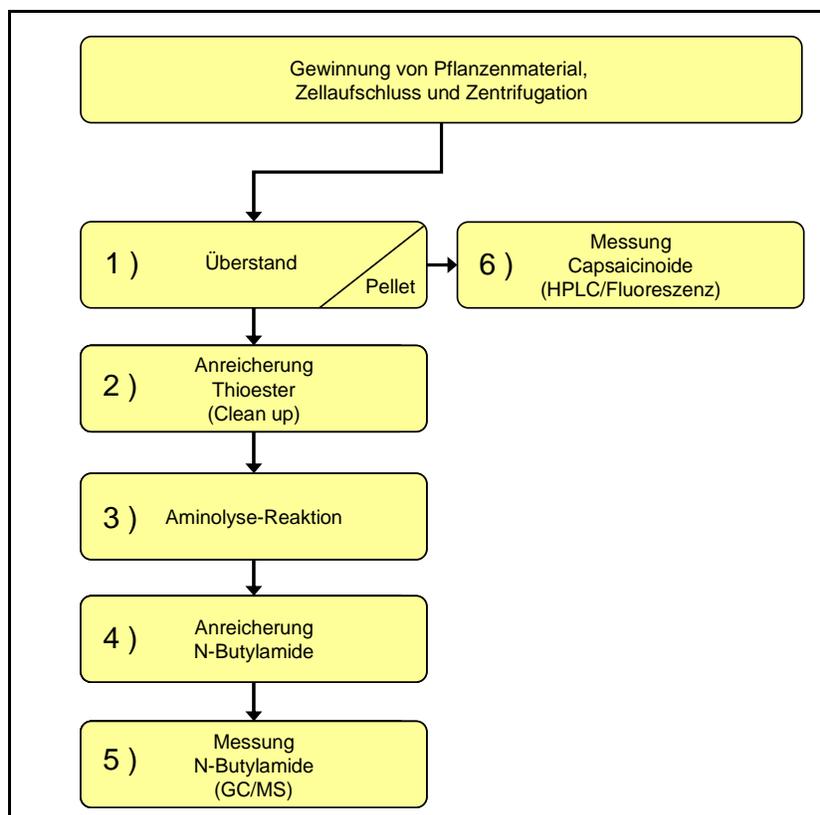


Abbildung 4-1 Fließschema zur Untersuchung der Thioester als *N*-Butylamide

Kopka et al. beschreiben, dass sich nach zehnmütiger Reaktionszeit mit Butylamin etwa 90 % der eingesetzten Thioester zu *N*-Butylamiden umgesetzt haben. Da auch nach längerer Reaktionszeit (30 min) lediglich Spuren von *N*-Butylamiden durch die Umsetzung von Triacylglyceriden und freien Fettsäuren zu verzeichnen waren, kann die Methode, mit dieser Probenvorbereitung und kurzer Reaktionszeit während der Aminolyse-Reaktion, als hochselektiv für Thioester angesehen werden.

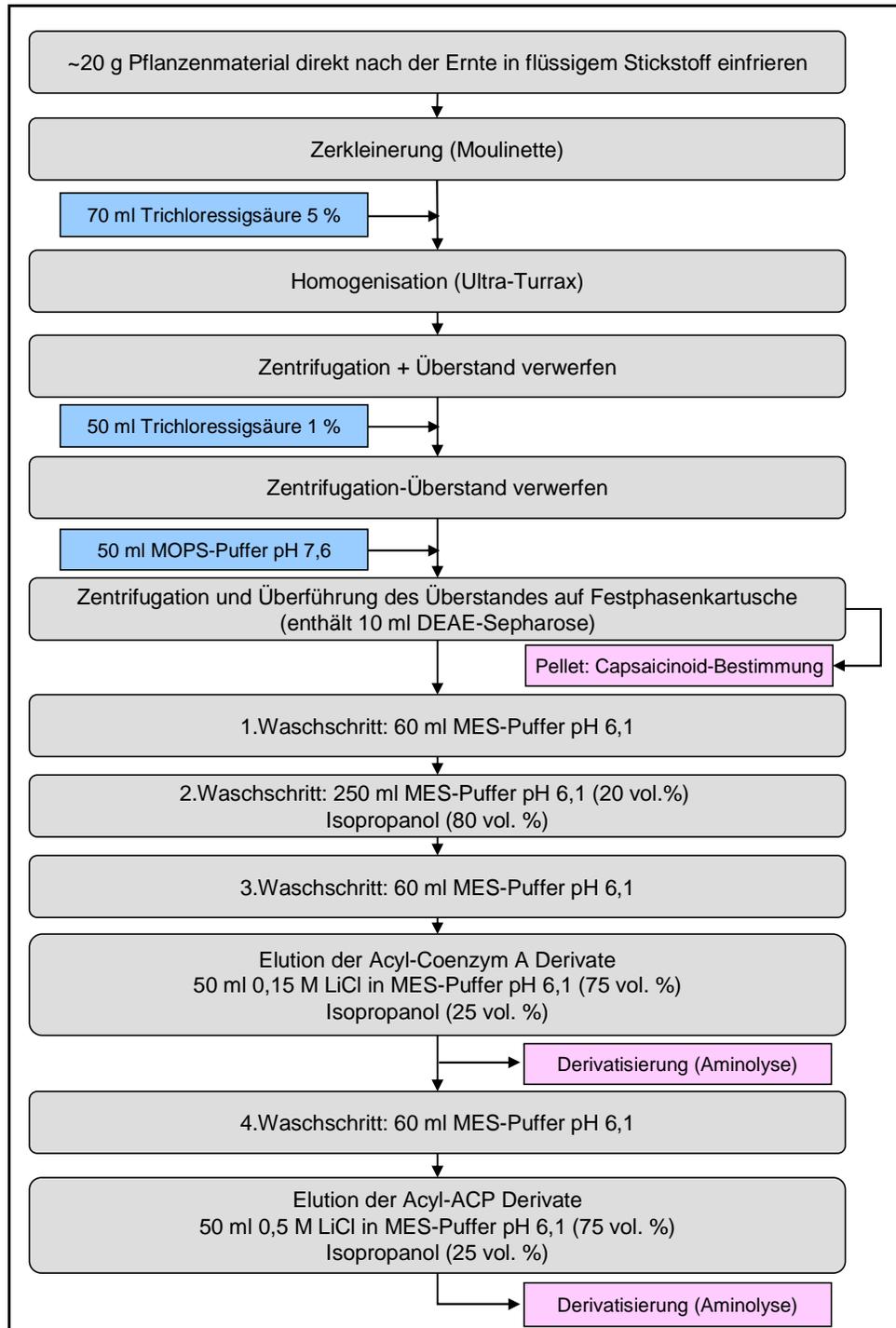


Abbildung 4-2 Fließschema Probenaufarbeitung zur Bestimmung von in vivo Gehalten an Acyl-Thioestern in Pflanzenmaterial in Anlehnung an Kopka et. al (160)

Kopka et al. beschreiben die Elution der Acyl-CoA mit 0,15 M LiCl als einen Waschschrift, der diese „störende“ Verbindungen quantitativ entfernen soll. Für die vorliegende Fragestellung wird diese Fraktion zum Vergleich des Fettsäuremusters mit herangezogen und die Methode in einigen Punkten modifiziert. Die Abbildung 4-1 zeigt den prinzipiellen Ablauf und Abbildung 4-2 die einzelnen Schritte bei der Untersuchung von *Capsicum*-Pflanzenmaterial auf Acyl-Thioester. Unmittelbar nach der Ernte der Früchte werden diese in Perikarp und Plazenta geteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der Zerkleinerung mit der Moulinette und Zellaufschluss mit dem Ultra-Turrax-Stab in Trichloressigsäure wird die entstehende Pulpe zentrifugiert und der Vorgang wiederholt. Die Trichloressigsäure wird dabei mit dem Überstand verworfen und der Zentrifugationsrückstand nach dem 2. Zentrifugationsschritt mit 3-Morpholinpropansulfonsäure-Puffer resuspendiert, um die Acyl-Thioester in Lösung zu bringen. Der bei der anschließenden 3. Zentrifugation des Pflanzenmaterials entstehende Zentrifugationsrückstand wird zur Untersuchung auf Capsaicinoide mittels HPLC weiterverwendet. Dies dient der Bestimmung der bis zu diesem Zeitpunkt der Fruchtentwicklung gebildeten Vanillylamide. Der Überstand enthält u. a. die Acyl-Thioester. Somit lassen sich Zusammenhänge bezüglich des Verteilungsmusters der Capsaicinoide und dem der Vorläufer, den Acyl-CoA's, erkennen. Da sich *Capsicum*-Fruchtmaterial nach der Homogenisation und Zentrifugation nur unvollständig absetzt und sich im Überstand immer Reste der Pflanzenmatrix befinden, ist es notwendig, das weitere Clean-up mit Säulen großen Innendurchmessers ( $\varnothing$  1/2“ mm) durchzuführen. Bedingt durch ihre große Oberfläche verstopfen die Fritten dieser Festphasenkartuschen nicht so leicht. Aus diesem Grund wird auf 75 ml Leerkartuschen, welche mit DEAE-Sepharose beladen werden, zur Festphasenanreicherung zurückgegriffen. Werden zur Untersuchung 20 g Pflanzenmaterial eingesetzt, so beträgt der Faktor der Anreicherung der Thioester bis zur Injektion der *N*-Butylamide (20  $\mu$ l Gesamtvolumen) etwa 1000.

Die für die Analytik der *N*-Butylamide verwendeten Reagenzien und Standardverbindungen sind in Tabelle 4-1 zusammengestellt.

**Tabelle 4-1 Übersicht eingesetzter Standards und Reagenzien**

Substanz	Hersteller	Qualität gemäß Hersteller	eigene Charakterisierung	Verwendungszweck
n-Butylamin	Aldrich	99,5 %	GC/MS	Derivatisierung
8-Methyl-6-nonensäure	Maybridge	$\geq 97$ %	GC/MS	analyt. Standard
<i>cis/trans</i> -Gemisch			LC/MS	Synthese-Edukt
Diisopropylether (DIPE)	Riedel de Haen	HPLC-Grade nochmals destilliert	GC/FID GC/MS	Lösungsmittel
Capsaicin (C)	Fluka	65 %	HPLC/Fluoreszenz	HPLC-Standard
Dihydrocapsaicin (DC)	Sigma	90 %	HPLC/Fluoreszenz	HPLC-Standard
Myristinsäuremethylester (ISTD)	Fluka	$\geq 99,5$ %	GC/MS	GC/MS-Standard ISTD
<i>N</i> -Butylhexanamid	eigene Synthese	$\sim 99$ %	GC/MS	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butyl-2-methylhexanamid (ASTD)	eigene Synthese	$\geq 99,5$ %	GC/MS	Aufarbeitungsstandard ASTD
<i>N</i> -Butylheptanamid	eigene Synthese	$\sim 99$ %	GC/MS	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butyloctanamid	eigene Synthese	$\geq 99,5$ %	GC/MS NMR	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butylnonanamid	eigene Synthese	$\sim 99$ %	GC/MS	GC/MS-Standard

Substanz	Hersteller	Qualität gemäß Hersteller	eigene Charakterisierung	Verwendungszweck
<i>N</i> -Butyl-7-Methyloctanamid (Fettsäurerest analog NDC)	eigene Synthese	~99 %	GC/MS NMR	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butyl-8-Methylnonanamid (Fettsäurerest analog DC)	eigene Synthese	~99 %	GC/MS NMR	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butyl-8-Methyl-6-nonenamid (Fettsäurerest analog C)	eigene Synthese	~99 %	GC/MS NMR	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butyldecanamid	eigene Synthese	~99 %	GC/MS NMR	GC/MS-Standard
<i>N</i> -Butyl-9-oleoylamid	eigene Synthese	≥ 99,5%	GC/MS	GC/MS-Standard
Acetyl-Coenzym A	Sigma	~ 94 %	LC/UV LC/MS	analyt. Standard
<i>n</i> -Octanoyl-Coenzym A	Sigma	98 %	Photometrie LC/UV LC/MS	analyt. Standard
<i>n</i> -Decanoyl-Coenzym A	Sigma	≥ 90 %	*	*

\* *n*-Decanoyl-CoA konnte als Standard aufgrund starker Matrixinterferenzen bei der Bestimmung von *N*-Butyldecanamid nicht verwendet werden und wurde deshalb nicht weiter charakterisiert.

In einigen Fällen konnten die Herstellerangaben bezüglich der Reinheit der Verbindungen nicht bestätigt werden. Dies wird in den Versuchsteilen, in denen die Verbindungen zum Einsatz kommen, ausführlich dargelegt. Weitere Chemikalien sind unter 7.9.1 aufgelistet.

#### 4.1.1 Aminolyse-Reaktion und Analytik der *N*-Butylamide

Die Verbindungsklasse der Thioester spielt im Zusammenhang der Carbonsäurechemie in lebenden Systemen eine grundlegende Rolle. Der Thioester wirkt dabei als Carbonsäurederivat, das leichter nucleophil angegriffen werden kann als der entsprechende Sauerstoffester. Der starke Größenunterschied zwischen Schwefel und Sauerstoffatom führt dazu, dass Sauerstoff einen größeren Resonanzbeitrag zum Carbonyl- $\pi$ -System leistet und dieses somit besser stabilisiert. Da Thioester weniger resonanzstabilisiert sind, erfolgt die Addition eines Nucleophils an das Carbonylkohlenstoffatom und damit der Bruch der  $\pi$ -Bindung bei ihnen rascher, als bei Carbonsäureestern. Eine solche Additions-Eliminierungs-Reaktion findet während der Aminolyse-Reaktion zwischen Acyl-Thioestern und *n*-Butylamin in basischem Milieu statt (s. Abbildung 4-3). Dabei entstehen aus einem Mol Acyl-CoA bzw. Acyl-ACP ein Mol *N*-Butylamid.

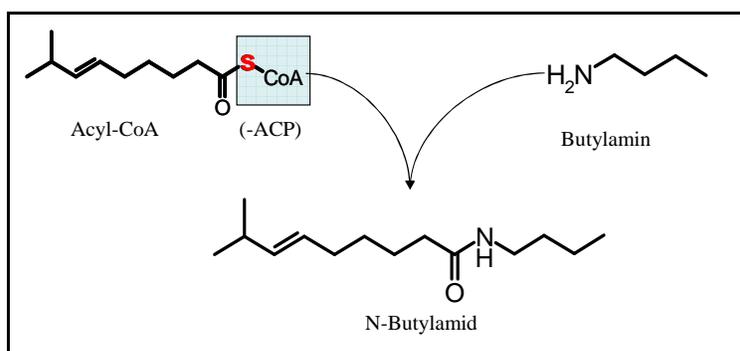


Abbildung 4-3 Aminolyse: Umsetzung von Thioestern zu *N*-Butylamiden (Acylrest: Fettsäure des Capsaicins)

Die Aminolyse-Reaktion und die anschließende Anreicherung der erhaltenen *N*-Butylamide erfolgen nach folgender Standardarbeitsanweisung:

50 ml des Eluenten aus der Festphasenanreicherung (0,15 M LiCl in MES-Puffer pH 6,1 (75 vol. %) und Isopropanol (25 vol. %)) werden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Normschliff gegeben. Anschließend werden zu jedem Ansatz 5 ml Butylamin (99,5 %, Aldrich) hinzupipettiert und der Kolben mit einem Glasstopfen verschlossen und kräftig geschüttelt. Die Reaktionszeit beträgt 15 min, wobei in 5-minütigen Intervallen kräftig geschüttelt wird. Zum Abbruch der Reaktion werden 12,5 ml Salzsäure (HCl, 4 M) hinzugegeben und ebenfalls kräftig geschüttelt. Mit Universalindikatorpapier wird der pH-Wert kontrolliert und bei basischer Reaktion noch tropfenweise HCl bis zur Neutralisation hinzugegeben. Um einen Reagenzienblindwert zu erhalten, wird mit 50 ml des Eluenten ebenfalls die Aminolyse-Reaktion durchgeführt. Die wässrige Reaktionsmischung wird 2-mal mit 20 ml Diisopropylether (DIPE) (HPLC-Grade, nochmals destilliert) in einem 250 ml Scheidetrichter ausgeschüttelt, um die *N*-Butylamide zu extrahieren. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ca. 20 g wasserfreiem Natriumsulfat (Fluka) getrocknet, durch einen Faltenfilter (Roth) filtriert und in einem 100 ml Rundkolben bis auf einen Rest von ca. 2 ml eingengt. Der Rückstand wird mit DIPE quantitativ in einen 10 ml Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Nach erneutem Lösen in wenigen  $\mu$ l DIPE wird der Rückstand in ein  $\mu$ -Insert (ca. 220  $\mu$ l) eines 2 ml Probengläschens überführt und erneut bis zur Trockene eingedampft und anschließend in 20  $\mu$ l DIPE gelöst. Bei der manuellen Injektion der Proben beträgt das Injektionsvolumen für die gaschromatographische Untersuchung 2  $\mu$ l.

#### 4.1.2 Untersuchung der *N*-Butylamide mittels GC/MS

Tabelle 4-2 Geräteparameter GC/MS

<b>Gaschromatograph</b>	HP 5980 Series II
<b>Masseselektiver Detektor</b>	HP 5989 MS Engine (Quadrupol / HED)
<b>Autosampler</b>	HP 7673
<b>Injektor</b>	Split/Splitless 250°C
<b>Vorsäule</b>	CS FS Phenyl-Sil-Desaktivierung (3 m * 0,25 $\mu$ m ID)
<b>Säule</b>	J&W DB-5 MS (30 m * 0,25 $\mu$ m Film * 0,25 mm ID)
<b>Trägergas</b>	Helium 1,2 ml / min
<b>Transferline</b>	250°C
<b>Ionenquelle</b>	200°C
<b>Ionisation</b>	Elektronenstoßionisation mit 70 eV
<b>Quadrupol</b>	100°C
<b>Vakuum</b>	ca. $3,5 \cdot 10^{-6}$ torr

Die Identifizierung der *N*-Butylamide erfolgt durch die Retentionszeiten. Als Beispiel (s. Abbildung 4-4) ist ein Totalionen-Chromatogramm der *N*-Butylamide mit den Fettsäureresten der 3 Hauptcapsaicinoide Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin abgebildet. Es handelt sich um die Verbindungen *N*-Butyl-7-methyloctanamid, *N*-Butyl-8-methylnonanamid und *N*-Butyl-8-methyl-6(tr)-nonenamid. Diese analytischen Standards wurden aus Carbonsäurechloriden und *n*-Butylamin synthetisiert (s. Kapitel 7.7.1 und 7.7.2) und einer Authentizitätskontrolle per NMR und GC/MS (s. Kapitel 7.7.3) unterzogen. Der Peak bei  $t_R = 20,00$  min zeigt zwei koeluiierende Verbindungen mit dem Ansatz einer Trennung. Es handelt sich um die *cis/trans*-Isomere des *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamides. Das *trans*-Isomer eluiert etwas später, da die Trennung auf der eingesetzten unpolaren Phase vornehmlich nach dem Siedepunkt stattfindet. Es liegt mehr vom *cis*- als vom *trans*-Isomers

vor, was darauf hindeuten könnte, dass die von Fa. Maybridge gelieferte Säure nicht aus natürlichen Capsaicinoiden stammt. Für die Auswertungen werden die Flächenwerte beider Verbindungen als Summe verwendet.

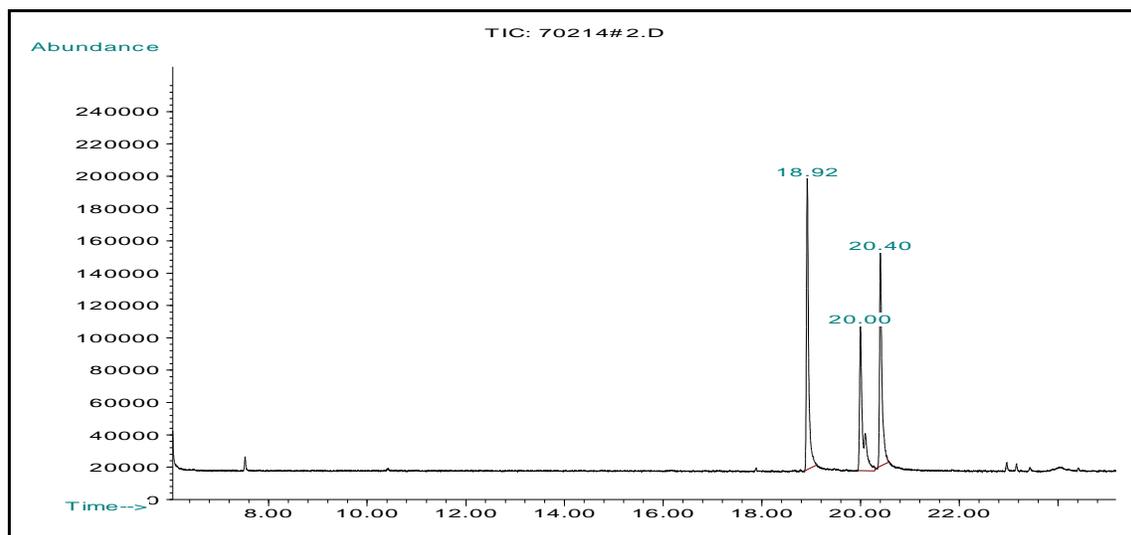


Abbildung 4-4 Totalionen-Chromatogramm der analytischen Standards (*N*-Butylamide der Fettsäurereste der 3 Hauptcapsaicinoide)

Um möglichst viele *N*-Butylamide eindeutig zuordnen zu können sind insgesamt 10 *N*-Butylamide synthetisiert worden. Als Edukte wurden die entsprechenden Carbonsäurechloride und *n*-Butylamin eingesetzt. Waren keine Säurechloride verfügbar, so wurden die Fettsäuren zunächst mittels Oxalsäuredichlorid zum Säurechlorid umgesetzt. Die detaillierte Synthesevorschrift findet sich in Kapitel 7.7.2.

Tabelle 4-3 Retentionszeiten der synthetisierten *N*-Butylamide

<i>N</i> -Butylamid	Summenformel	$t_R$ [min]	MW [g/mol]
<i>N</i> -Butylhexanamid	$C_{10}H_{21}NO$	14,7	171
<i>N</i> -Butyl-2-methylhexanamid (ASTD)	$C_{11}H_{23}NO$	<b>14,8</b>	<b>185</b>
<i>N</i> -Butylheptanamid	$C_{11}H_{23}NO$	16,4	185
<i>N</i> -Butyloctanamid	$C_{12}H_{25}NO$	17,9	199
<b><i>N</i>-Butyl-7-methyloctanamid</b>	<b><math>C_{13}H_{27}NO</math></b>	<b>18,9</b>	<b>213</b>
<i>N</i> -Butylnonanamid	$C_{13}H_{27}NO$	19,5	213
<b><i>N</i>-Butyl-8-methyl-6-nonenamid</b>	<b><math>C_{14}H_{27}NO</math></b>	<b>20,0</b>	<b>225</b>
<b><i>N</i>-Butyl-8-methylnonanamid</b>	<b><math>C_{14}H_{29}NO</math></b>	<b>20,4</b>	<b>227</b>
<i>N</i> -Butyldecanamid	$C_{14}H_{29}NO$	21,0	227
<i>N</i> -Butyl-9-oleoylamid	$C_{22}H_{43}NO$	33,1	337

Die Charakterisierung der *N*-Butylamide erfolgt durch die im Scan-Modus aufgenommenen Massenspektren. Hierbei wird der Bereich von  $m/z = 35$  bis  $m/z = 350$  registriert. Die Massenspektren der *N*-Butylamide zeigen alle ein ausgeprägtes Molekül-Ion. Charakteristisch ist zudem die Abspaltung von Butylamin und die damit einhergehende Bildung eines  $M-72$  Ions (nicht stabil beim *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid) vom Typ  $R-C\equiv O^+$  durch  $\alpha$ -Spaltung. Aus der Spaltung jeder Bindung der Kohlenstoffkette des Fettsäurerestes entsteht eine Reihe von Fragmenten, bei denen die Ladung jeweils an der Amidbindung verbleibt. Ein für die Quantifizierung und Identifizierung wertvolles Ion bildet aus dieser Reihe das Fragment  $m/z = 128$  und das Ion des McLafferty-Umlagerungsproduktes  $m/z = 115$ . Bei der McLafferty-Umlagerung wird das *N*-Butylamid in  $\beta$ -Position zur Amidbindung gespalten,

nachdem ein Wasserstoffatom in  $\gamma$ -Position auf den Carbonyl-Sauerstoff übertragen wurde (161). Dieses Produkt der McLafferty-Umlagerung wird mit steigender Kettenlänge des Acyl-Restes immer bedeutender. Kopka et al. (160) beschreiben, dass dieses Fragment bei *N*-Butylbutanamid nur eine untergeordnete Rolle spielt.

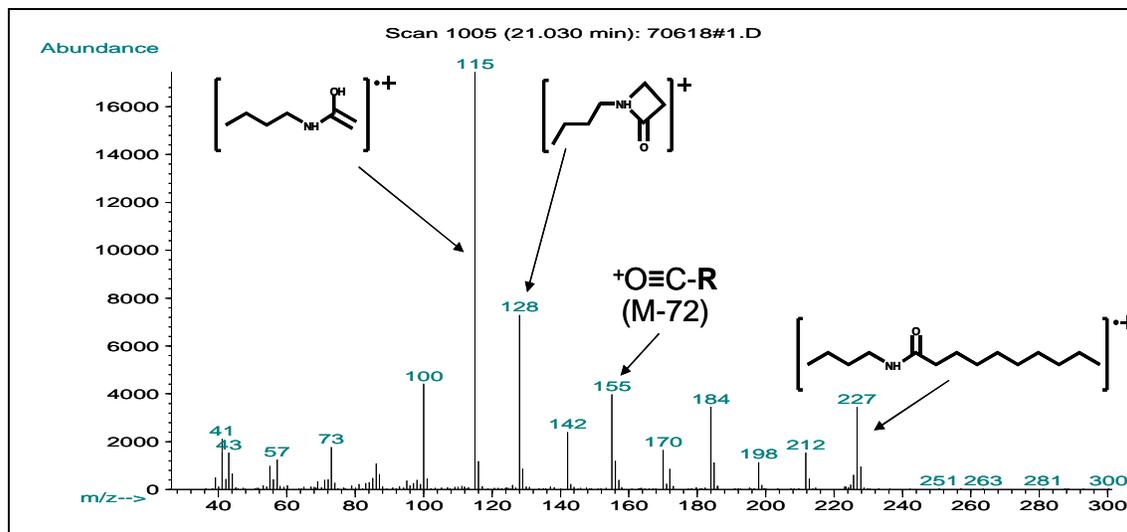


Abbildung 4-5 Massenspektrum (EI, 70 eV) *N*-Butyldecanamid

Bei *N*-Butylamiden mit unverzweigtem, gesättigtem Fettsäurerest sind die Massenspektren weitgehend analog zum *N*-Butyldecanamid aufgebaut. Das Verhältnis von  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  unterscheidet sich hingegen deutlich, wenn ein ungesättigter Fettsäurerest im *N*-Butylamid vorliegt. Als Beispiel sei hier das *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid (*trans*) genannt, welches den Fettsäurerest des Capsaicins beinhaltet.

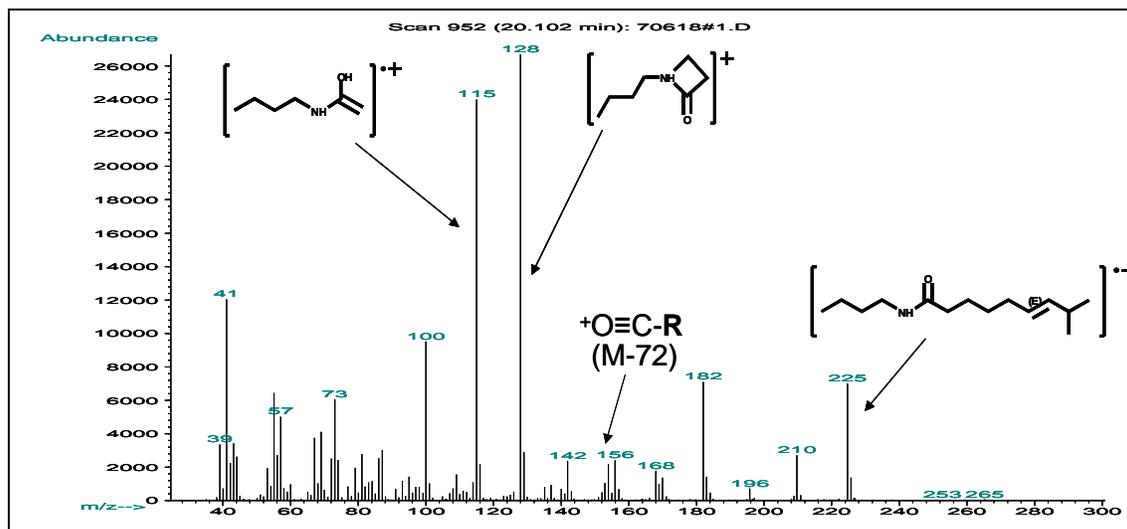


Abbildung 4-6 Massenspektrum (EI, 70 eV) *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid

### 4.1.3 Responsefaktorbestimmung

Dem Massenspektrum (Abbildung 4-6) ist zu entnehmen, dass bei ungesättigtem Acyl-Rest der *N*-Butylamide das Fragment  $m/z = 128$  den Basispeak darstellt. Die Bildung dieses cyclischen Fragmentes wird vermutlich durch die Doppelbindung des Fettsäurerestes energetisch begünstigt. In Chromatogrammen erkennt man bei der Visualisierung der

Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  sehr leicht den Peak des *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamides, denn die Intensitäten der beiden Massenspuren sind im Gegensatz zu denen der gesättigten *N*-Butylamide nahezu gleich groß. Auf Grundlage dieser Kenntnisse des Fragmentierungsverhaltens der *N*-Butylamide werden die beiden Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  zur sensitiven Messung im SIM-Modus verwendet.

Bei der Aminolyse-Reaktion und der Aufarbeitung der Produkte durch Ausschütteln und Einengen treten Verluste auf. Diese können nur durch ein dem Analyten möglichst ähnlichen Aufarbeitungsstandard (ASTD) erfasst werden. Der Königsweg wäre die Verwendung von Stabilisotopen-markierten ACP- oder Coenzym A-Derivaten. Diese müssten am C1- und/oder am C2-Atom des Acyl-Restes markiert sein, damit sich nach der Aminolyse die Markierung im Molekülteil der Hauptfragmente der *N*-Butylamide bei der Elektronenstoßionisation befindet. Solche maßgeschneiderten Verbindungen sind kommerziell nicht verfügbar. Eine eigene Synthese wurde im Hinblick auf die Aufwand-Nutzen-Relation nicht erwogen, da schon die Beschaffung der Edukte, aufgrund der besonderen Fettsäurereste, schwierig und teuer gewesen wäre. Zudem sollte bei der Synthese von analytischen Standards ein reines Produkt definierten Gehaltes erhalten werden. Das ist bei der geringen Stabilität von Thioestern kaum möglich. Eine Hilfskonstruktion, um die Aufarbeitungsschritte zu kontrollieren, ist der Einsatz eines potentiellen Endproduktes, einem *N*-Butylamid mit verzweigtem Fettsäurerest mittlerer Kettenlänge. Hierzu wurde ein Butylamid aus 2-Methylhexansäure und Butylamin über den Zwischenschritt des Säurechlorides synthetisiert. Als *N*-Butylamid verfügt diese Verbindung über dieselben funktionellen Gruppen wie die Analyten. Zudem entspricht die Kohlenwasserstoff-Kettenlänge (C7) in etwa der der gesuchten *N*-Butylamide. Eine 2-Methylverzweigung wurde bisher nicht bei Fettsäureresten der Capsaicinoide beschrieben, deshalb ist dies für die Überprüfung der *N*-Butylamid-Anreicherung ein geeigneter Standard. Ist das relative Ansprechverhalten des Detektors (Responsefaktor) vom ASTD zum Analyten bekannt, so lässt sich der Gehalt des Analyten berechnen.

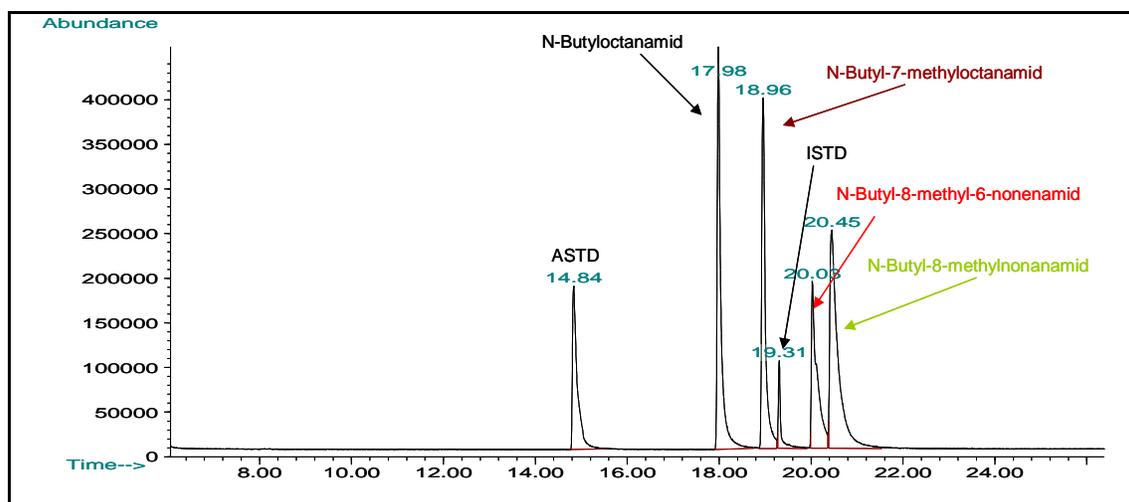


Abbildung 4-7 Chromatogramm verschiedener Standards mit jeweils ca. 80  $\mu\text{g/ml}$ ; SIM-Modus mit den Massenspuren  $m/z : 115, 128$  und  $129$

#### 4.1.3.1 Vergleich der Responsefaktoren von *N*-Butyl-7-methyloctanamid und *N*-Butyl-8-methylnonanamid in Bezug auf *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid

Die Fettsäurereste der hier untersuchten *N*-Butylamide sind identisch mit den Fettsäureresten von Nordihydrocapsaicin, Dihydrocapsaicin und Capsaicin und treten immer gemeinsam auf. Zur Bestimmung des Verteilungsmusters der Vorläufer der Hauptcapsaicinoide sind sie daher von besonderem Interesse. Für einen niedrigen Konzentrationsbereich (injizierte Menge 10-15 ng absolut) wurden deshalb die individuellen Responsefaktoren (*R<sub>f</sub>*) ermittelt. Die Bestimmung ist notwendig, obwohl die drei *N*-Butylamide zur selben Substanzklasse gehören, denn es zeigt sich, dass die Doppelbindung im Fettsäurerest zu einer verstärkten Bildung des Fragmentes *m/z* = 128 führt. Als Bezugsgröße dient hierbei das *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid, welches den Fettsäurerest des Capsaicins trägt.

Liegen nach einer Messung dieser drei *N*-Butylamide, als Derivate der Thioester, Flächenwerte vor, so müssen die Flächeneinheiten von *N*-Butyl-8-methylnonanamid und *N*-Butyl-7-methyloctanamid um den ermittelten Responsefaktor korrigiert werden.

Um die relative Verteilung der drei *N*-Butylamide zu berechnen, wird die Flächeneinheit (FE) des *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid gleich 1 gesetzt und die anderen beiden Flächeneinheiten der *N*-Butylamide um den Responsefaktor korrigiert.

Standardlösung in DIPE: *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid: 72,14 µg/ml  
*N*-Butyl-8-methylnonanamid: 69,66 µg/ml  
*N*-Butyl-7-methyloctanamid: 68,26 µg/ml

Die Lösung wird danach noch 1:100 verdünnt, um für den zu erwartenden Messbereich einen realistischen Wert für die Korrekturfaktoren zu erhalten. Zur gaschromatographischen Messung werden 2 µl injiziert.

##### Formel 4.1 Responsefaktor *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid (NB8MN6NA)

$$R_f = \frac{FE(\text{NB8M6NA}) * c(N - \text{Butylamid})}{FE(N - \text{Butylamid}) * c(\text{NB8M6NA})}$$

An zwei Tagen wurden jeweils 2 Messungen mit derselben Lösung durchgeführt. Hierbei zeigten sich erhebliche Unterschiede im Ansprechverhalten des Massenspektrometers, wie man an den differierenden FE ein und derselben Komponente erkennen kann. Relativ zueinander bleiben die FE konstant, was die Voraussetzung zum Einsatz der *R<sub>f</sub>* zur Bestimmung des Verteilungsmusters ist.

**Tabelle 4-4 Messung des Standard-Mischung aus *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid, *N*-Butyl-8-methylnonanamid und *N*-Butyl-7-methyloctanamid**

Verbindung	Tag 1/ Inj. 1	Tag 1/ Inj. 2	Tag 2/ Inj. 1	Tag 2/ Inj. 2
	FE*10 <sup>6</sup>	FE*10 <sup>6</sup>	FE*10 <sup>6</sup>	FE*10 <sup>6</sup>
<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	1,04	1,01	0,20	0,20
<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	1,55	1,45	0,31	0,29
<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	1,52	1,48	0,26	0,24
	<i>R<sub>f</sub></i> 1	<i>R<sub>f</sub></i> 2	<i>R<sub>f</sub></i> 3	<i>R<sub>f</sub></i> 4
<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	0,812	0,661	0,659	0,748
<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	0,665	0,658	0,633	0,630
				Mittelwert <i>R<sub>f</sub></i>
				1,000
				0,720
				0,647

#### 4.1.3.2 Bestimmung des Responsefaktors ( $R_f$ ) für *N*-Butyloctanamid relativ zu *N*-Butyl-2-methylhexanamid (ASTD)

Als Standardverbindung zur Überprüfung der Wiederfindung während des Clean-up an DEAE-Sephrose wurde mit Octanoyl-CoA eine der wenigen kommerziell verfügbaren Verbindungen mittlerer Alkylkettenlänge aus der Gruppe der Acyl-Thioester ausgewählt. Zur späteren Quantifizierung und damit zur Berechnung der Wiederfindung dieser Verbindung wurde der Responsefaktor des korrespondierenden *N*-Butylamid-Derivates relativ zum ASTD ermittelt.

Standardlösung in DIPE: *N*-Butyloctanamid: 110,44 µg/ml  
*N*-Butyl-2-methylhexanamid: 87,69 µg/ml

Das Injektionsvolumen liegt jeweils bei 1,5 µl. Die resultierenden Flächenwerte liegen im Bereich von  $10 \cdot 10^6$  FE. Das entspricht größenordnungsmäßig den FE aus den Versuchen zur Wiederfindung und Wiederholbarkeit (4.2.3 ff.).

$$R_f = \frac{FE(ASTD) \cdot c(\text{Analyt})}{FE(\text{Analyt}) \cdot c(ASTD)}$$

**Formel 4.2 Responsefaktor**

**Tabelle 4-5 Responsefaktoren *N*-Butyloctanamid**

Verbindung	Inj. 1 FE*10 <sup>6</sup>	Inj. 2 FE*10 <sup>6</sup>	Inj. 3 FE*10 <sup>6</sup>	Inj. 4 FE*10 <sup>6</sup>	
ASTD	8,92	7,18	9,30	8,07	
<i>N</i> -Butyloctanamid	15,59	10,90	15,83	12,30	
	$R_f 1$	$R_f 2$	$R_f 3$	$R_f 4$	$\bar{\varnothing} R_f$
ASTD	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>N</i> -Butyloctanamid	0,719	0,827	0,737	0,823	0,746

Stellt man die Formel zur Responsefaktorbestimmung nach  $c(\text{Analyt})$  um, so kann man die Konzentration des Analyten berechnen. Dies setzt allerdings voraus, dass die Bestimmung des Korrekturfaktors möglichst gleichartig wie die Messung der Proben verläuft. In den Fällen in denen dieser ASTD zur Anwendung kam wurden dem Aminolyse-Ansatz 5,44 µg bzw. 10,88 µg des Aufarbeitungs-Standards (100 µl/200 µl *N*-Butyl-2-methylhexanamid, 54,44 µg/ml in DIPE) zugegeben. Unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges kann man mit diesem Responsefaktor auch in anderen Konzentrationsbereichen eine Gehaltsabschätzung vornehmen. Die Abhängigkeit des  $R_f$  vom Konzentrationsbereich wurde nicht explizit untersucht.

#### 4.1.3.3 Lineare Kalibration mit internem Chromatographie-Standard (ISTD) zur Bestimmung analytischer Grenzwerte

Die Untersuchung von *in vivo*-Gehalten an Thioestern im Bereich von 0,01 µM bis 1 µM erfordert eine Sensitivität im pmol-Bereich bei der Untersuchung von 1 g Pflanzenmatrix (160). Um die Leistungsfähigkeit der Methode abschätzen zu können, wird eine Kalibrationsreihe mit *N*-Butyloctanamid erstellt. Dazu wurden etwa 10 mg des synthetisierten *N*-Butyloctanamid genau eingewogen und in 100 ml DIPE gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden danach wiederum verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt, welche einen ISTD zur Eliminierung von Injektionsschwankungen und Detektorresponseschwankungen in jeweils gleicher Konzentration enthielten. Als Interner Standard (ISTD) wurde Myristinsäuremethylester verwendet. Das Peakflächenverhältnis des *N*-Butyloctanamids zum

ISTD wurde gegen die Konzentration aufgetragen. Aus der Kalibriergerade wurden Nachweis-, Bestimmungsgrenze und Erfassungsgrenze abgeschätzt.

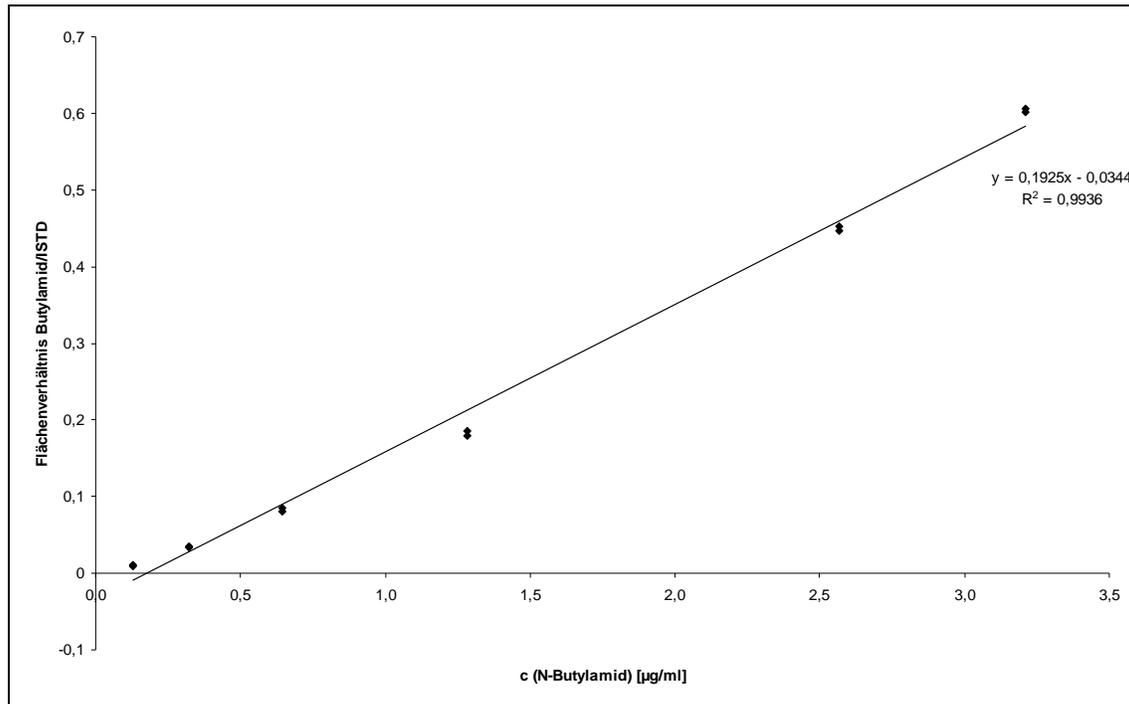


Abbildung 4-8 Kalibriergeraden von *N*-Butyloctanamid; Flächenwerte relativ zu ISTD Myristinsäuremethylester

Die Kalibrierlösungen wurden mit dem Autosampler injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 2 µl. Die Messung erfolgte im SIM-Modus, wobei die Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  (*N*-Butylamide) und die Massenspur  $m/z = 74$  (McLafferty-Umlagerungsprodukt von Methylestern ISTD) zur Quantifizierung verwendet werden. Die Flächeneinheiten jeder Verbindung berechnen sich aus den Summen der Intensitäten der drei aufgenommenen Massenspuren.

Tabelle 4-6 DIN 32645: Analytische Kenndaten

analytische Kenndaten & Grenzwerte	<i>N</i> -Butyloctanamid
Steigung a	0,1925
Achsenabschnitt b	-0,0344
Korrelationskoeffizient $R^2$	0,9936
$\alpha$ -Fehler [%]	5
Anzahl der Messungen pro Kalibrierpunkt n	2
Nachweisgrenze [µg/ml]	0,228
Erfassungsgrenze [µg/ml]	0,457
Bestimmungsgrenze [µg/ml]	0,792

Nach DIN 32645 ergibt sich für eine Zweifachmessung pro Wertepaar und einen  $\alpha$ -Fehler von 5 % eine Nachweisgrenze von 228 µg *N*-Butyloctanamid/l bzw. 1,146 µmol/l. Bei 2 µl Injektionsvolumen entspricht das 456 pg bzw. 2,29 pmol *N*-Butylamid.

Die vorliegende Methode ist geeignet um für *N*-Butylamide im pmol-Bereich einen Peak zu erhalten, welcher ein Signal-Rauschverhältnis von  $\geq 3$  aufweist.

## 4.2 Charakterisierung des Testsystems für Acyl-Thioester

Zur Überprüfung der Probenaufarbeitung und der Derivatisierung stehen 2 käuflich erworbene Acyl-Coenzym A Standards zur Verfügung.

**Tabelle 4-7 Kommerziell verfügbare Coenzym A-Derivate**

Acyl- CoA Standard	Bezugsquelle	Menge	Qualität gemäß Hersteller
<b>n-Octanoyl-Coenzym A</b> C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S*3Li*3,5H <sub>2</sub> O 893,73 g/mol (der freien Säure)	Sigma	10 mg	98 %
<b>n-Decanoyl-Coenzym A</b> C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S*3Li*3,5H <sub>2</sub> O 921,73 g/mol (der freien Säure)	Sigma	5 mg	≥ 90 %

Die Retentionszeiten der *N*-Butylamide, welche aus diesen zwei CoA-Derivaten per Aminolyse entstehen, wurden bereits ermittelt (Tabelle 4-3).

Um ein möglichst realistisches Bild vom chemischen Verhalten der Acyl-Thioester aus Chili-Pflanzen während der Aufarbeitung und der Derivatisierung zu erhalten, ist es notwendig, einen Standard mit ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften als Modellsubstanz einzusetzen. Allen Acyl-CoA-Verbindungen gemein ist der CoA-Rest und die Unterscheidung ist nur über den Kohlenwasserstoffrest möglich. Die verwendeten Standards sollten demnach einen ähnlichen Kohlenwasserstoff-Rest wie die zu untersuchenden Thioester haben. Die Fettsäurereste der 3 Hauptcapsaicinoide haben 9 oder 10 C-Atome und sind methylverzweigt. Coenzym A-Derivate mit verzweigten oder ungeradzahligem Fettsäureresten sind als Standards nicht verfügbar. Deshalb kommen nur Octanoyl-Coenzym A und Decanoyl-Coenzym A zur Charakterisierung der Methode im Hinblick auf die Isolierung von Capsaicin-Vorstufen in Betracht. Der Reagenzienblindwert (für die gesamte Aufarbeitung ohne Pflanzenmatrix) liefert bereits geringe Mengen an *N*-Butyloctanamid und deutlich mehr *N*-Butyldecanamid deren Quelle nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Daher eignet sich Octanoyl-Coenzym A, um das vorliegende Verfahren auf seine Wiederfindung und Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Das von Kopka et. al. beschriebene Verfahren stellt die Möglichkeit in Aussicht zwischen den verschiedenen Thioester (CoA vs. ACP) zu unterscheiden. Aus diesem Grund müsste auch mit einem ACP-Standard geeigneter Acyl-Kettenlänge die Wiederfindung überprüft werden. Diese sind nicht kommerziell verfügbar. Die folgenden Arbeiten beschränken sich auf die experimentelle Charakterisierung des Verhaltens von Octanoyl-CoA während Anreicherung an DEAE-Sephrose, Aminolyse, gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Messung.

### 4.2.1 Bestimmung des Octanoyl-Coenzym A-Gehaltes

Das Octanoyl-CoA (Sigma) wurde in einer Ampulle geliefert, weshalb der gesamte Inhalt zunächst gemäß Kopka (160) in 1 ml Essigsäure (1 mM) gelöst und bis zur Verwendung bei minus 18 °C gelagert wurde. Die Ampulle wurde zurückgewogen, so dass eine Masse von 10,3 mg an Octanoyl-Coenzym A-Salz ermittelt werden konnte. Nach Angaben des Herstellers liegt das Acyl-CoA als Lithiumsalz / Monohydrat vor. Somit entsprechen 10,3 mg dieses Salzes 10 mg des freien Octanoyl-CoA's. Ein Teil der erstellten Stammlösung wurde 1:200 mit MES-Puffer (10 mM, pH 6,1) verdünnt und in Aliquoten zu je 1,5 ml in Eppendorf-Cups im Gefrierschrank gelagert. Hierzu wurden 100 µl der Stammlösung mit einer Kolbenhubpipette in einen 20 ml Messkolben pipettiert und bis zur Markierung mit MES-

Puffer (10 mM, pH 6,1) aufgefüllt. Um den Gehalt diese Lösung zu bestimmen wurde der molare Extinktionskoeffizient für Coenzym A Derivate von  $16,8 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$  nach Kopka et. al (160) verwendet. Die photometrische Bestimmung fand bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten gegen Luft und zum Nullabgleich wurde MES-Puffer (10 mM, pH 6,1) eingesetzt.

Molekulargewicht Octanoyl-CoA ( $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$ ):	893,7 g/mol
Verdünnungsfaktor F:	200
Schichtdicke d:	1 cm
molarer Extinktionskoeffizient:	$16,8 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$
Konzentration c	mg/ml
Extinktion E	

**Tabelle 4-8 photometrische Bestimmung des Octanoyl-CoA-Gehaltes**

Messung	Extinktion
1	0,712
2	0,714
3	0,714
Mittelwert	0,713

$$c = \frac{M * E * F}{d * \epsilon} \quad c = \frac{893,7 \text{ g} * 0,713 * 10^{-3} * \text{mol} * \text{cm}}{\text{mol} * 1 \text{ cm} * 16,8 \text{ l}} = 7,585 \text{ g/l}$$

#### Formel 4.3 Photometrische Bestimmung des Gehaltes an Octanoyl-CoA in der Stammlösung

Aufgrund der Einwaage sollte der erwartete Wert für die Konzentration der Octanoyl-CoA-Stammlösung 10,3 g/l betragen. Der photometrisch gemessene Gehalt an Octanoyl-CoA in der erstellten CoA –Stammlösung beträgt 7,59 mg/ml und 37,9 µg/ml in der 1:200 Verdünnung. Da der photometrisch ermittelte Gehalt der Lösung stark von dem zu erwartendem Gehalt abweicht, soll ein Teil auf seine Zusammensetzung hin untersucht werden. Die photometrische Untersuchung erfasst alle Bestandteile der Lösung, welche bei einer Wellenlänge von 260 nm elektromagnetische Strahlung absorbieren. Deshalb wurde die Stammlösung mittels LC-TOF-MS charakterisiert.

#### 4.2.2 Charakterisierung des n-Octanoyl-CoA Standards mittels LC-TOF-MS

Für die Untersuchung mittels LC-MS wurde ein bei -18 °C gelagertes Aliquot der Stammlösung erst unmittelbar vor der Injektion aufgetaut, damit sich möglichst wenig vom Octanoyl-CoA zersetzt. 100 µl wurden 1:4 mit Reinstwasser verdünnt und injiziert. Während der chromatographischen Trennung (siehe Kapitel 7.2) wird die Absorption bei 260 nm, das Totalionen-Chromatogramm von m/z 50 bis 1000 und gleichzeitig jede Massenspur einzeln aufgezeichnet.

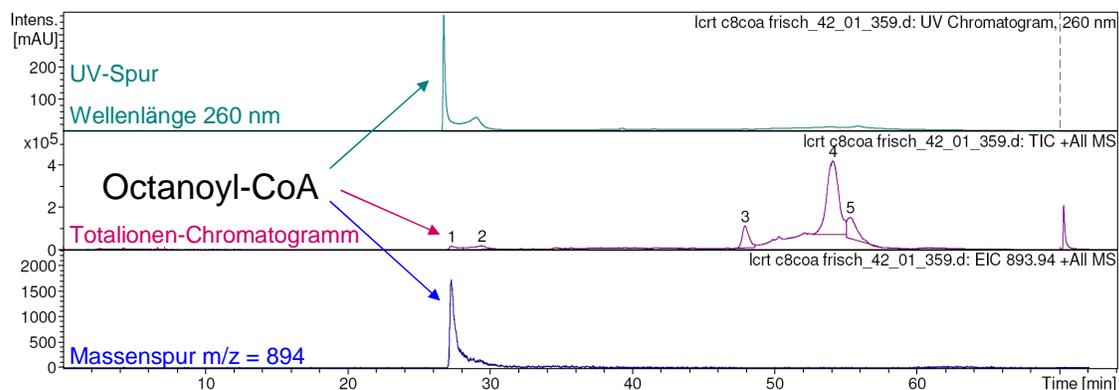


Abbildung 4-9 UV-Spur, Totalionen-Chromatogramm und Massenspur  $m/z = 894$

Dabei zeigte sich, dass bei einer Wellenlänge von 260 nm mehrere Komponenten, welche chromatographisch nicht sauber getrennt werden konnten, absorbieren. Das Octanoyl-CoA eluierte mit einer Retentionszeit von 27,2 min und wurde über das Massenspektrum (Abbildung 7-8) eindeutig identifiziert. Das gleichzeitig aufgenommene Totalionen-Chromatogramm und die Massenspur  $m/z = 894$  könnte man so interpretieren, dass die vermeintliche Hauptkomponente, nämlich das Octanoyl-CoA, lediglich ein Minorbestandteil der Standardlösung ist. Ein Blindlauf konnte die Kontamination durch analytische Artefakte ausschließen. Unberücksichtigt bleibt dabei, ob nicht eventuell Bestandteile der Standardlösung durch eine Diskriminierung aufgrund unterschiedlicher Ionisierbarkeit unterrepräsentiert dargestellt werden. Andererseits spiegelt der hohe Extinktionswert bei der photometrischen Bestimmung des Octanoyl-CoA Gehaltes nicht zwangsläufig den realen Gehalt wieder, sondern ist die Summe der Absorptionen bei 260 nm aller vorhanden Bestandteile in der Stammlösung.

Es bleibt zu konstatieren, dass der Gehalt über die 100 %-Flächenwert-Methode des Totalionenchromatogramms ohne weiteres nicht zulässig ist. Ohne Bedenken kann der Wert aus der photometrischen Gehaltsbestimmung unter 4.2.1 jedoch nicht zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Für weitere Untersuchungen wurde angenommen, dass der Gehalt der 1:200 verdünnten Octanoyl-CoA Lösung  $\leq 50 \mu\text{g/ml}$  ist.

#### 4.2.3 Aminolyse-Reaktion mit Octanoyl-Coenzym A

Mit der vorliegenden Standardlösung wurde die Umsetzung des Coenzym A-Thioesters zum Butylamid zu überprüft. Hierzu wurde eine bestimmte Menge an Octanoyl-CoA-Standardlösung der Derivatisierung unterzogen und mit einem Reagenzienblindwert verglichen. Zur Erkennung von Verlusten bei der Aufarbeitung nach der Aminolyse-Reaktion wurde dem Reaktionsansatz der Aufarbeitungs-Standard (ASTD) zugegeben. Um Schwankungen bei der Injektion und des Ansprechverhaltens des Detektors zu überprüfen wurde zur Erstellung der linearen Kalibration der interne Standard (ISTD) Myristinsäuremethylester verwendet. Diese Funktionen übernahm hier ebenfalls der ASTD. Hierbei handelte es sich um das *N*-Butylamid der 2-Methylhexansäure. Der Fettsäurerest ist methylverzweigt und unterscheidet sich nur geringfügig in der Kettenlänge zum *N*-Butyloctanamid. Er war nicht durch Reagenzien-Verunreinigungen bereits im Aminolyse-Ansatz vorhanden und sollte sich aufgrund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften ähnlich wie der Analyt verhalten.

## 4.2.3.1.1 Versuchsdesign

Zu 50 ml des Eluenten der Festphasenanreicherung ((0,15 M LiCl in MES-Puffer pH 6,1 (75 vol. %) und Isopropanol (25 vol. %)) werden 100  $\mu$ l der Octanoyl-CoA-Lösung ( $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ , Herstellerangabe) und 100  $\mu$ l des internen Standards (*N*-Butyl-2-methylhexanamid, 54,4  $\mu\text{g/ml}$  in DIPE) direkt in einen 100 ml Erlenmeyerkolben pipettiert. Das entspricht 5  $\mu\text{g}$  Octanoyl-CoA und 5,4  $\mu\text{g}$  ASTD absolut im Reaktionsansatz. Das weitere Vorgehen bei der Aminolyse-Reaktion ist analog zu 4.1.1.

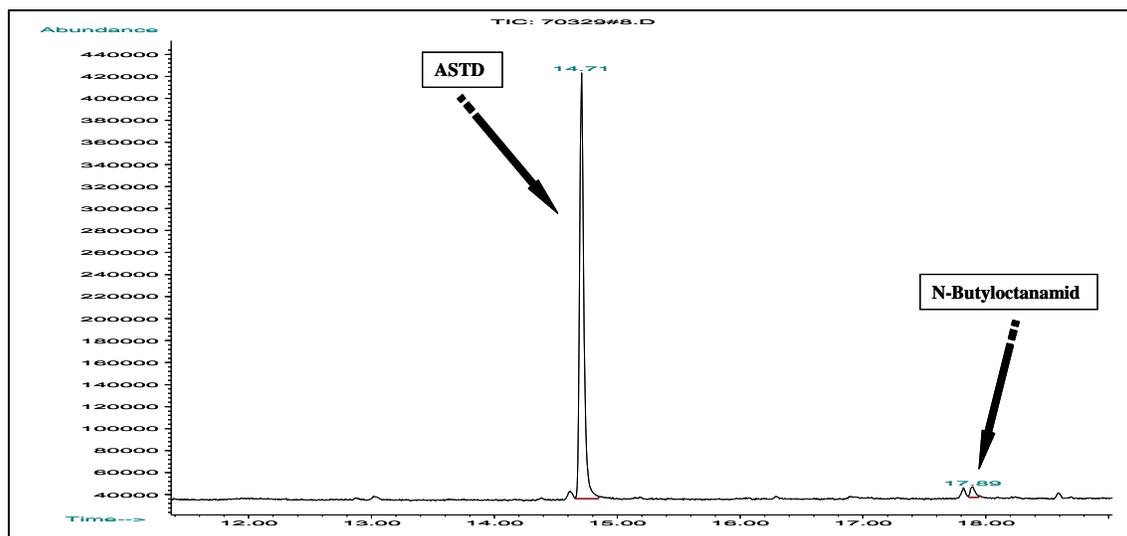


Abbildung 4-10 Totalionen-Chromatogramm des Reagenzienblindwertes inklusive ASTD

Da sich immer eine geringe Menge an *N*-Butyloctanamid durch die Reagenzien bildet, ist im Chromatogramm (Abbildung 4-1) neben dem zugesetzten ASTD ( $t_R = 14,71 \text{ min}$ ) auch ein Peak bei  $t_R = 17,9 \text{ min}$  zu sehen. Das Peakflächenverhältnis von FE (*N*-Butyloctanamid) zu FE (ASTD) liegt für den Reagenzienblindwert bei 0,053:1.

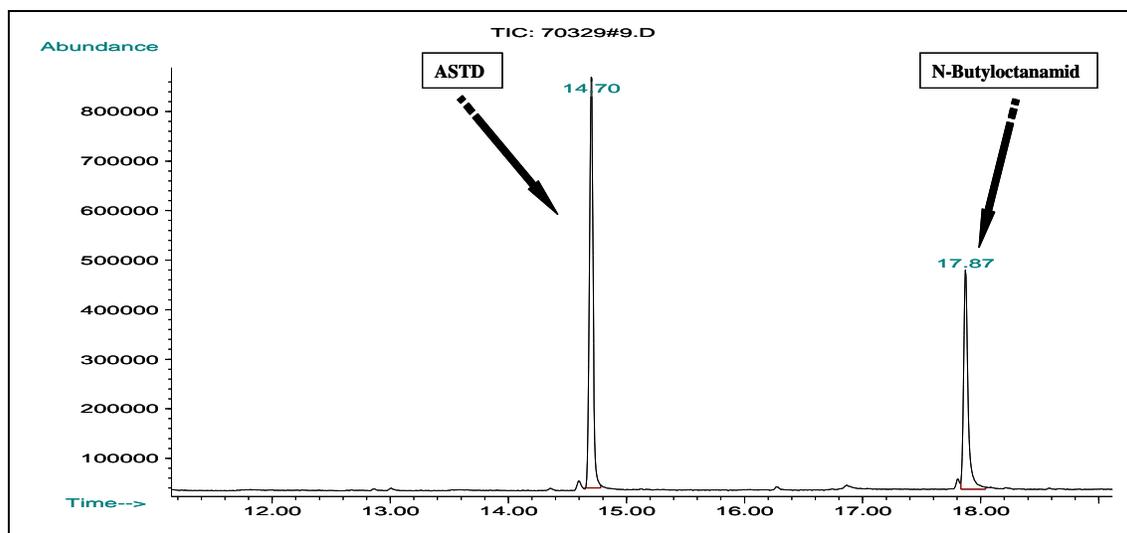


Abbildung 4-11 Totalionen-Chromatogramm *N*-Butyloctanamid aus Octanoyl-CoA und ASTD

Das Chromatogramm nach Aminolyse-Reaktion von Octanoyl-CoA und Aufarbeitung zeigt den ASTD bei  $t_R = 14,70 \text{ min}$  (FE 18591124) und einen Peak bei  $t_R = 17,87 \text{ min}$  (FE 11032026), der dem *N*-Butyloctanamid zugeordnet werden kann. Das Flächenverhältnis von

FE(*N*-Butyloctanamid) zu FE(ASTD) beträgt 0,593:1. Es ist hier ein Unterschied um den Faktor 10 im Peakflächenverhältnis zu beobachten. Daraus folgt, dass die Umsetzung von Octanoyl-CoA zum *N*-Butyloctanamid funktioniert.

#### 4.2.4 Verluste von Acyl-Coenzym A während der Anreicherung an DEAE-Sephrose

Um die verschiedenen Schritte der Aufarbeitung zu überprüfen, wird Octanoyl-CoA zu verschiedenen Stadien der Aufarbeitung zugesetzt, per Aminolyse-Reaktion derivatisiert und als Butylamid bestimmt. Zunächst durchläuft das Acyl-CoA die gesamte Aufarbeitung und es wurde versucht nachzuvollziehen, in welcher Fraktion das Acyl-CoA sich nach der Elution von dem Anionenaustauscher vorrangig befindet. Dann wurde ermittelt, bei welchem Schritt der Festphasenanreicherung der Acyl-Thioester (Schritt Nr. 2, Abbildung 4-1) Verluste auftraten. Zum Schluss wurde Schritt Nr. 3 des Fließschemas (Abbildung 4-1) überprüft und die Umsetzung des Acyl-CoA's bei der Aminolyse untersucht.

##### 4.2.4.1 Verteilung der Thioester auf verschiedene Fraktionen bei der Elution mit unterschiedlichen Ionenstärken an LiCl

Kopka (160) optimierte seine Trennung ausschließlich auf die Analytik von Acyl-ACP's und entfernte für seine Betrachtungen störende Acyl-CoA's mit einem Eluenten vom Anionenaustauschermaterial, der 0,15 M LiCl enthielt. Er beschreibt, dass die Acyl-ACP's in der Fraktion zu finden seien, die mit 0,5 M LiCl im Eluenten erhalten wird. Im Hinblick auf die Acyl-ACP's liegen von Kopka Experimente mit radioaktiv markierten Derivaten vor. Es blieb zu untersuchen, ob sich Acyl-CoA's ebenfalls selektiv in einer Fraktion von der Festphasenkartusche eluieren ließen. Dieser Versuch diente der Sicherstellung, dass die Acyl-CoA's ausschließlich in der 0,15 M LiCl Fraktion eluierten und nicht mit der Acyl-ACP interferierten. Eine „vereinfachte“ Probenaufarbeitung wurde aus diesem Grund betrachtet und sollte überprüfen, mit welcher Ionenstärke an LiCl (0,15 und 0,5 M) die größte Menge an Coenzym-A-Derivaten, ohne die verschiedenen Waschschrte (Abbildung 4-2), erhalten werden konnte. Der Versuch wurde als Doppelbestimmung (Probe A und B) durchgeführt.

Tabelle 4-9 Konsekutive Elution von Octanoyl-CoA

Probe	FE ( <i>N</i> -Butyloctanamid) *10 <sup>6</sup>	FE (ASTD) *10 <sup>6</sup>	erwartete c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung	ermittelte c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung
Fraktion 0,15 M LiCl A	152	219	maximal 56	141
Fraktion 0,15 M LiCl B	153	231	maximal 56	135
Fraktion 0,5 M LiCl A	11	299	-	8
Fraktion 0,5 M LiCl B	12	365	-	7

Berechnung der Butylamid-Konzentration:

Die maximal zu erwartende Konzentration an *N*-Butyloctanamid berechnet sich aus der zugesetzten Menge an Octanoyl-CoA (5 µg absolut bzw. 100 µl der verdünnten Octanoyl-CoA-Lösung, ≤ 50 µg/ml). Trotz der Diskrepanzen bei der Gehaltsbestimmung (4.2.1), wird

rechnerisch vom nominellen Gehalt gemäß der Gebindebeschriftung und der Einwaage ausgegangen. Demnach wurden  $50 \mu\text{g/ml} * 0,1 \text{ ml} = 5 \mu\text{g}$  zugesetzt. Mit einer molaren Masse von  $893,7 \text{ g/mol}$  wurden somit  $5,6 \text{ nmol}$  Octanoyl-CoA absolut eingesetzt. Gemäß der Stöchiometrie bei der Umsetzung von Thioestern zu Butylamiden, entsteht aus einem Mol Acyl-CoA auch ein Mol Butylamid (bei 100 %-iger Umsetzung). Als absolute Stoffmenge *N*-Butyloctanamid in der zu injizierenden Probelösung wird  $5,6 \text{ nmol}$  erwartet. Da das Molekulargewicht des Amides  $199 \text{ g/mol}$  beträgt, liegt die maximal mögliche Konzentration an *N*-Butyloctanamid in den  $20 \mu\text{l}$  Probenvolumina bei  $56 \mu\text{g/ml}$ . Für ein Konzentrationspaar *N*-Butyloctanamid/ASTD liegt als Responsefaktor  $0,746$  (4.1.3.2) vor, welcher als „Einpunktkalibrierung“ verwendet wird.

$$Rf = \frac{FE(ASTD) * c(Analyt)}{FE(Analyt) * c(ASTD)}$$

Um die Wiederfindungsdaten interpretieren zu können, muss allerdings der Beitrag des Blindwertes zu den Flächeneinheiten des Analyten berücksichtigt werden. Hierzu wird die Aminolyse-Reaktion ohne Acyl-CoA-Zugabe, jedoch unter Verwendung des Aufarbeitungsstandards ( $100 \mu\text{l}$ ), durchgeführt. Da im Verlauf der Aufreinigung am Festphasenmaterial Eluenten unterschiedlicher LiCl-Konzentration aufgefangen und zur Aminolyse-Reaktion eingesetzt wurden, wurden diese unterschiedlichen Bedingungen auch für die Bestimmung des Blindwertes berücksichtigt. Aus diesem Grund fand die Aminolyse-Reaktion 1. in dem Eluenten mit  $0,15 \text{ M LiCl}$  und 2. in dem Eluenten mit  $0,5 \text{ M LiCl}$  statt. Dies führte zu vergleichbaren Ergebnissen für den Blindwert.

**Tabelle 4-10 Reagenzien-Blindwerte für *N*-Butyloctanamid bei der Aminolyse-Reaktion**

Probe	FE ( <i>N</i> -Butyloctanamid) $*10^6$	FE (ASTD) $*10^6$	ermittelte <i>c</i> ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [ $\mu\text{g/ml}$ ] in der injizierten Probelösung
Blind $0,15 \text{ M LiCl}$	11	247	17
Blind $0,50 \text{ M LiCl}$	11	199	23

Mit Kenntnis der Blindwerte ließen sich die ermittelten Wiederfindungen von Octanoyl-CoA deuten. Berücksichtigte man die Konzentration an *N*-Butyloctanamid in den Blindproben, so ergab sich eine Wiederfindung von ca.  $200 \%$ . Die bei den Messungen erhaltenen Flächenwerte unterschieden sich ca. um den Faktor  $10$  im Vergleich zur Bestimmung der Responsefaktoren. Bei einem nicht mehr linearen Detektoransprechverhalten in diesem Bereich wäre die Abweichung auch eventuell darüber zu erklären. Hinzu kommt der Unsicherheitsfaktor der Konzentrationsangabe der Octanoyl-Standardlösung.

Der ermittelte Gehalt an *N*-Butyloctanamid in den Fraktionen, welche mit  $0,15 \text{ M LiCl}$  eluiert wurden, zeigt jedenfalls, dass Acyl-CoA's in dieser Fraktion zu finden sind. Die Konzentration an *N*-Butyloctanamid in der nachfolgenden Fraktion mit jeweils  $0,5 \text{ M LiCl}$  ist so gering, dass sie sich von den Blindwerten nicht signifikant unterscheidet. Um zu gewährleisten, dass keine Thioester mehr an dem Anionenaustauscher-Material gebunden sind, nachdem mit  $0,5 \text{ M LiCl}$  eluiert wurde, wurde in einem weiteren Versuch eine dritte Elutionsstufe mit  $1 \text{ M LiCl}$  durchgeführt.

Tabelle 4-11 3-stufige Elution von Octanoyl-CoA

Probe	FE ( <i>N</i> -Butyloctanamid) *10 <sup>6</sup>	FE (ASTD) *10 <sup>6</sup>	erwartete <i>c</i> ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung	ermittelte <i>c</i> ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung
Fraktion 0,15 M LiCl	23	45	maximal 56	104
Fraktion 0,50 M LiCl	1	33	-	8
Fraktion 1 M LiCl	1	32	-	7

Die Ergebnisse der 3-stufigen Elution (Tabelle 4-11) zeigen, dass der Octanoyl-CoA-Gehalt nur in der Fraktion sich signifikant vom Blindwert unterscheidet, welche mit 0,15 M LiCl eluiert wurde. In der Fraktion mit 0,50 M bzw. 1 M LiCl befinden sich keine Acyl-CoA-Artefakte; die hier erhaltenen Werte für die *N*-Butyloctanamid-Konzentration unterschieden sich nicht signifikant vom Reagenzien-Blindwert. Eine weitere Erhöhung der Ionenstärke war nicht angezeigt.

#### 4.2.4.2 Wiederfindung von Octanoyl-CoA während der Festphasenanreicherung und Verluste durch Waschschrte

Die Acyl-CoA's finden sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in der nach Kopka zu erwartenden Fraktion. Zur Kontrolle wurden auch noch die Gehalte an Octanoyl-CoA in den Waschlösungen bestimmt. Um die Wiederfindung, und damit auch die Verluste durch die Waschschrte während der Festphasenanreicherung der Acyl-Thioester an DEAE-Sephrose, zu dokumentieren, wurden vereinfacht 4 Fraktionen untersucht. Dazu wurden 200 µl der Octanoyl-CoA Lösung ( $\leq 50$  µg/ml) in 50 ml MOPS-Puffer (50 mM, pH 7,2) auf die konditionierten Festphasenkartuschen gegeben. das Experiment war so aufgebaut, dass von jeder zu untersuchenden Waschlösung/Eluenten-Fraktion 50 ml erhalten wurden.

**Fraktion 1:** Diese Fraktion bestand aus dem Eluat, welches die Festphasenkartusche bei der Probenaufgabe passierte. Anhand der CoA-Gehalte dieser Fraktion ließ sich zeigen, ob ein Teil der Thioester das Anionenaustauscher-Material ohne Bindung direkt wieder verlassen würde.

**Fraktion 2:** Diese Fraktion bestand aus dem Eluat eines Waschschrtes mit 80 % Isopropanol in MES-Puffer (10 mM, pH 6,1). Dieser Waschschrte dient während des Clean-up zur Entfernung lipophiler Matrixkomponenten.

**Fraktion 3:** Elution mit 50 ml 25 % Isopropanol/75 % MES-Puffer (V/V) mit 0,15 M LiCl. Das war die Fraktion, in der die Acyl-CoA-Derivate aufgrund der Ionenstärke des Eluenten zu erwarten waren.

**Fraktion 4:** Elution mit 50 ml 25 % Isopropanol/75 % MES-Puffer (V/V) mit 0,5 M LiCl. Das ist die Fraktion, in der die Acyl-CoA-Derivate nicht mehr vorhanden sein sollten, sofern die Elution in Fraktion 3 quantitativ verläuft, denn laut Kopka et al. befinden sich in dieser Fraktion die Acyl-ACP's.

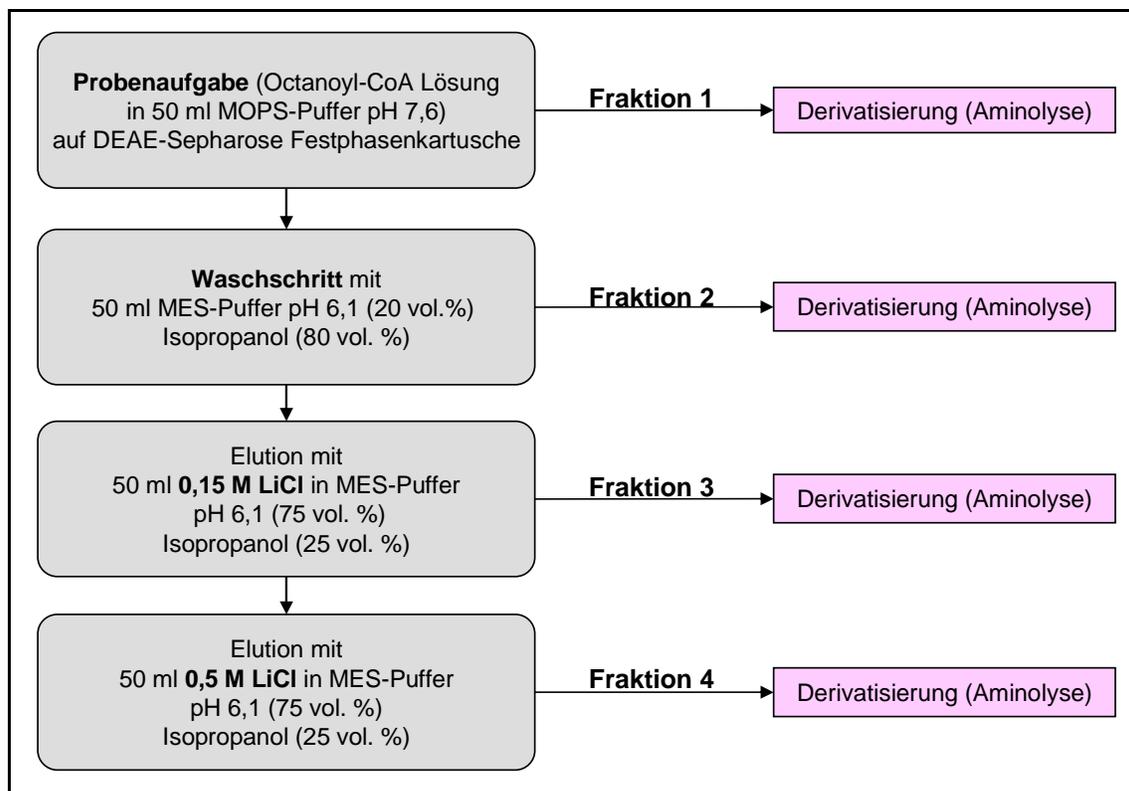


Abbildung 4-12 Schematische Darstellung der 4 untersuchten Fraktionen

Die vier aufgefangenen Fraktionen wurden der Aminolyse-Reaktion unterzogen. Sofern sich Octanoyl-CoA in einer der Fraktionen befand, bildete sich daraus *N*-Butyloctanamid, welches über den, den einzelnen Fraktionen zugesetzten, Aufarbeitungsstandard (5,4 µg absolut; 100 µl *N*-Butyl-2-methylhexanamid mit 54,4 µg/ml) quantifiziert werden kann.

Tabelle 4-12 Wiederfindung von Octanoyl-CoA während der Festphasenanreicherung

Probe	FE ( <i>N</i> -Butyl-octanamid) *10 <sup>6</sup>	FE (ASTD) *10 <sup>6</sup>	erwartete c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung	ermittelte c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung
Fraktion 1	3	189	-	3
Fraktion 2	1	49	-	1
Fraktion 3	32	66	maximal 56	98
Fraktion 4	7	157	-	9

Die Konzentration an *N*-Butyloctanamid ist in **Fraktion 3** am größten; hier fand sich die größte Konzentration an Acyl-CoA's wieder. Sie unterschied sich im Gegensatz zu den **Fraktionen 1,2** und **4** signifikant von den zuvor ermittelten Blindwerten. Bei der Aufarbeitung von Pflanzenmaterial, also einer realen Probe, wird zwischen der Fraktion 3 und 4 mit 50 ml MES-Puffer gespült. Der etwas höhere Wert in Fraktion 4 könnte dem fehlenden Zwischenwaschschrift geschuldet sein. Eine Kreuzkontamination der Fraktionen ist somit nicht zu erwarten.

#### 4.2.4.3 Wiederfindung nach der Aminolyse

Betrachtet man das komplexe Procedere für das Clean-up, so ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich die Acyl-Thioester verlustfrei anreichern lassen. Kopka et al. (160) kann hierzu mangels *N*-Butylamid-Standards keine Aussage treffen. In seinen Arbeiten verglich er

lediglich per Szintillationsmessung den Anteil von Acyl-Thioestern vor und nach der Aminolyse-Reaktion. Zu der Wiederfindung nach der Festphasenanreicherung wurde bei Kopka nur eine kurze Bemerkung gemacht: Separat wurden mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure markierte Lipide (220 pmol Oleoyl-ACP, 1350 pmol Oleoyl-CoA, 52700 pmol Ölsäure, 4,5 nCi Trioleoylglycerid, 4,5 nCi Oleoyl-Phosphatidylcholin; wobei letzteres von unbekannter spezifischer Radioaktivität war) auf eine mit Anionenaustauscher gefüllte Säule gegeben. Dabei fand Kopka nach Waschen der Kartusche mit 80 % Isopropanol und danach mit 0,15 M LiCl in der Acyl-ACP-Fraktion 165 pmol (75,1 mol %) des Oleoyl-ACP's wieder. Vom Acyl-CoA fand Kopka in dieser Fraktion nur 2,7 pmol (0,2 mol %) wieder. Die anderen Lipidbestandteile waren ebenfalls mit weniger als 1 mol % vertreten. Insbesondere die freie Fettsäure war dort nur mit einem Anteil von 0,003 mol % in Bezug auf die zuvor zugesetzte Menge zu finden. Da Kopka die Wiederfindung von Acyl-CoA's in der Fraktion mit 0,15 M LiCl nicht ermittelte und die Wiederfindung in den eigenen Experimenten bei nahezu 200 % liegt, wurde die Umsetzung bei der Aminolyse-Reaktion untersucht.

#### 4.2.4.3.1 Aminolyse von Octanoyl-CoA

In drei Experimenten wurde mit jeweils 5  $\mu\text{g}$  Octanoyl-CoA (100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Octanoyl-CoA-Lösung,  $\leq 50 \mu\text{g/ml}$ ) die Reaktion in 50 ml des Eluenten der Festphasenanreicherung (0,15 M LiCl in MES-Puffer pH 6,1 (75 vol. %) und Isopropanol (25 vol. %)) nach der Standardarbeitsanweisung unter 4.1.1 durchgeführt, allerdings noch ohne den Zwischenschritt der Evaporation in 10 ml Spitzkolben.

**Tabelle 4-13 Wiederfindung von Octanoyl-CoA als *N*-Butyloctanamid nach der Aminolyse-Reaktion**

Probe	FE ( <i>N</i> -Butyloctanamid) * $10^6$	FE (ASTD) * $10^6$	ermittelte c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [ $\mu\text{g/ml}$ ] in der injizierten Probelösung	max. mögliche c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [ $\mu\text{g/ml}$ ] nach Einsatz von 100 $\mu\text{l}$ Octanoyl-CoA	prozentuale Wiederfindung nach Abzug des Blindwertes
1	11	19	119	56	200 %
2	5	9	115	56	193 %
3	10	26	80	56	130 %
Blind	0,3	10	7	keine Zugabe	-

In allen drei Proben zeigt sich eine Wiederfindung von  $\gg 100\%$ . Der Blindwert liefert ein Signal, welches einer Konzentration von 7  $\mu\text{g/ml}$  *N*-Butyloctanamid entspräche. Anhand der stark unterschiedlichen Flächenwerte (z.B. Probe 2, Tabelle 4-13) für den ASTD und das *N*-Butyloctanamid lässt sich ablesen, dass durch das Ausschütteln und die Anreicherung der Butylamide nach der Aminolyse schwankende Ergebnisse entstehen. Es ist gut zu erkennen, dass diese schlechte Reproduzierbarkeit der Flächenwerte durch den ASTD zum Teil ausgeglichen wurde. Die Werte zur Erstellung der Kalibration in Tabelle 7-9, S.138 belegen, dass die Schwankungen durch die Injektion und die unterschiedliche Ionisation und Detektion nicht die alleinige Ursache für die um den Faktor 2 differierenden Flächenwerte sein können. Um diese Schwankungen zu minimieren, wurde in der Arbeitsvorschrift zur Probenanreicherung beim Einengen der Zwischenschritt im 10 ml Spitzkolben eingeführt. Dadurch wurde vermieden, dass sich der Rückstand beim Entfernen des Lösungsmittels an die große Oberfläche der Innenseite des 50 ml Rundkolbens anlagern kann.

In einem weiteren Versuch wurde von einer höheren absoluten Menge an Acyl-CoA ausgegangen. Die zur Reaktion eingesetzte Menge an Coenzym-A-Lösung wurde, genau wie das Volumen des ASTD, auf 200 µl verdoppelt.

**Tabelle 4-14 Wiederfindung von Octanoyl-CoA als *N*-Butyloctanamid nach der Aminolyse-Reaktion**

Probe	FE ( <i>N</i> -Butyloctanamid) *10 <sup>6</sup>	FE (ASTD) *10 <sup>6</sup>	ermittelte c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] in der injizierten Probelösung	max. mögliche c ( <i>N</i> -Butyloctanamid) [µg/ml] nach Einsatz von 200 µl Octanoyl-CoA	prozentuale Wiederfindung
1	241	743	131	112	117 %
2	286	983	118	112	105 %
3	243	721	137	112	122 %

Auffällig ist, dass die Flächenwerte für beide Verbindungen (ASTD und *N*-Butyloctanamid) sich nach der Verdopplung der absoluten Menge um mehr als den Faktor 20 vergrößert haben. Daran erkennt man, dass es notwendig war Quotienten von Flächenwerten zur Auswertung zu bilden um die täglich wechselnde Geräte-Performance zu nevellieren. Man sieht aber auch, dass der eingesetzte Standard (ASTD) nicht die erhoffte Reproduzierbarkeit bei der Ermittlung der Gehalte an *N*-Butylamiden liefert. Die Wiederfindung beträgt weiterhin mehr als 100 %.

Nach einer Verdopplung der Stoffmenge von Octanoyl-CoA und ASTD veränderte sich die Wiederfindung (Tabelle 4-13 und Tabelle 4-14) von nahezu 200 % auf ca. 110 %, woraus folgt, dass der Einsatz des ASTD in Bezug auf eine Quantifizierung nicht möglich ist.

Das Verhalten des *N*-Butyl-2-methylhexanamides unterscheidet sich im Hinblick auf die massenspektrometrische Messung wider Erwarten deutlich von den zu analysierenden Butylamiden. Die Berechnung mittels ASTD ist offensichtlich nicht dazu geeignet ein Abbild der realen Gehalte an *N*-Butylamide zu liefern.

Wie schon erwähnt, wäre ein Isotopen-markierter Standard (siehe 4.1.3) notwendig um alle Effekte (Diskriminierungen, unterschiedliche Ionisation, Matrixinterferenzen etc.) zu kompensieren. Als brauchbarste Alternative stehen hier nur die Analyten selbst zur Verfügung. Durch die ermittelten Responsefaktoren der 3 Zielanalyten relativ zueinander kann deren prozentuale Verteilung bestimmt werden. Als Ergebnis erhält man das Verteilungsmuster der Analyten; sowie eine Aussage zur Identität. Für die Untersuchung von Pflanzenmaterial wurde dieses System deshalb angewendet.

## 4.3 Kontrollexperimente

### 4.3.1 Verhalten der Capsaicinoide während der Acyl-CoA-Anreicherung und der Aminolyse-Reaktion

Damit das von Kopka et. al (160) vorgestellte Verfahren zur Bestimmung der *in vivo* Gehalte von Thioestern in Spinat auch auf Chilifrüchte übertragbar ist, muss sichergestellt sein, dass durch die in hoher Konzentration vorkommenden Capsaicinoide (bis zu 5,5 mg pro g/Fruchtmaterial (Frischgewicht), *Capsicum chinense* „Habanero orange“) keine falsch positiven Ergebnisse erhalten werden. Durch die Aufarbeitung (Abbildung 4-1) gelangen nur sehr geringe Mengen an Capsaicinoiden in die Acyl-Thioester-Fractionen. Dies ist in deren schlechter Wasserlöslichkeit begründet. Der Hauptteil der Capsaicinoide verbleibt im Zentrifugationsrückstand. Aufgrund der fehlenden negativen Ladung der Capsaicinoide sollte keine Bindung an das Anionenaustauscher-Material stattfinden. Darüber hinaus wird die SPE-Kartusche mit 250 ml 80 vol. % Isopropanol gewaschen, worin die Capsaicinoide gut löslich sind und somit vor den Thioestern eluieren. Weiterhin ist die Amidbindung der Capsaicinoide wesentlich stabiler als die reaktionsfähige Thioesterbindung der CoA- und ACP-Derivate. Es wurde überprüft, ob bei der Aminolyse-Reaktion selbst bei einem Überschuss an Butylamin das Vanillylamin nicht verdrängt bzw. ausgetauscht wird.

Versuchsdesign zur Aminolyse:

10,0 mg Capsaicinoide („natürlich“, Fluka (65 % Capsaicin, ~35 % Dihydrocapsaicin und weitere Minorcapsaicinoide)) werden direkt in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen und mit 50 ml des Eluenten der Festphasenanreicherung (0,15 M LiCl in MES Puffer pH 6,1 (75 vol. %) und Isopropanol (25 vol. %)) versetzt. Anschließend wird nach der Standardarbeitsanweisung unter 4.1.1 S. 48 verfahren.

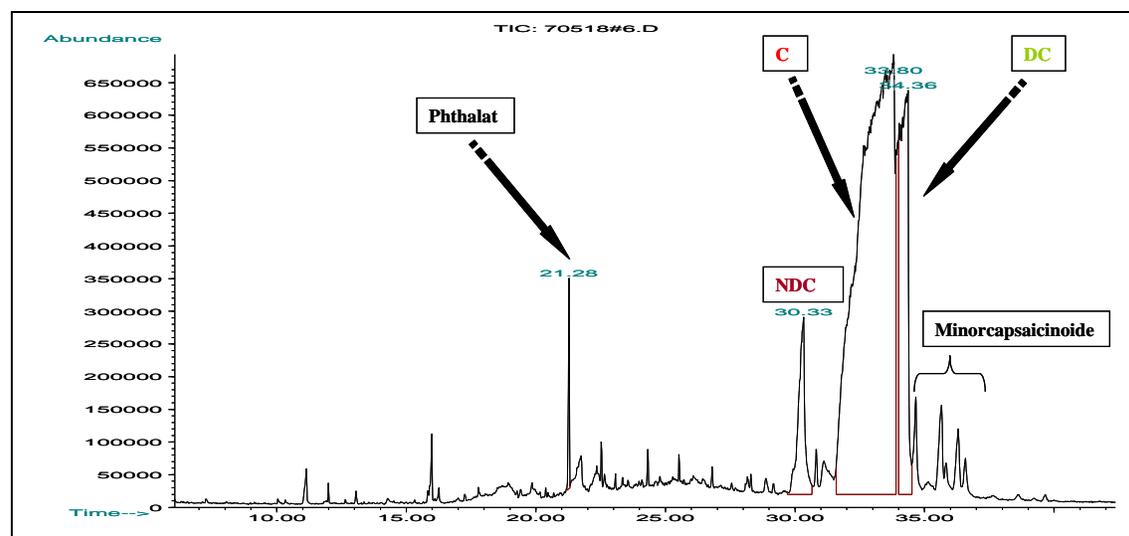


Abbildung 4-13 Totalionen-Chromatogramm der Verbindungen, welche nach der Aminolyse-Reaktion der Capsaicinoide vorhanden sind

Ergebnis:

Aufgrund der Löslichkeit werden die eingesetzten Capsaicinoide (Amide) beim Ausschütteln in der Diisopropylether-Phase angereichert und in der Chromatographie wieder gefunden. Im Chromatogramm (Abbildung 4-13) ist zu erkennen, dass die chromatographische Säule mit der großen Menge an verschiedenen Capsaicinoiden an der Kapazitätsgrenze ist. Typische Fragmente der Capsaicinoide nach Elektronenstoßionisation (70 eV), welche alle den Vanillyl-Rest beinhalten, haben die Masse-Ladungsverhältnisse  $m/z = 137$ ,  $m/z = 152$  und  $m/z = 195$  (162). Deshalb wird aus dem Totalionen-Chromatogramm die Massenspur des Basispeaks von Capsaicinoiden  $m/z = 137$  extrahiert, um die Capsaicinoide, welche nach der Aminolyse-Reaktion im Gemisch vorliegen, im Chromatogramm zu visualisieren, denn dieses Fragment ist das dominierende bei Capsaicinoiden.

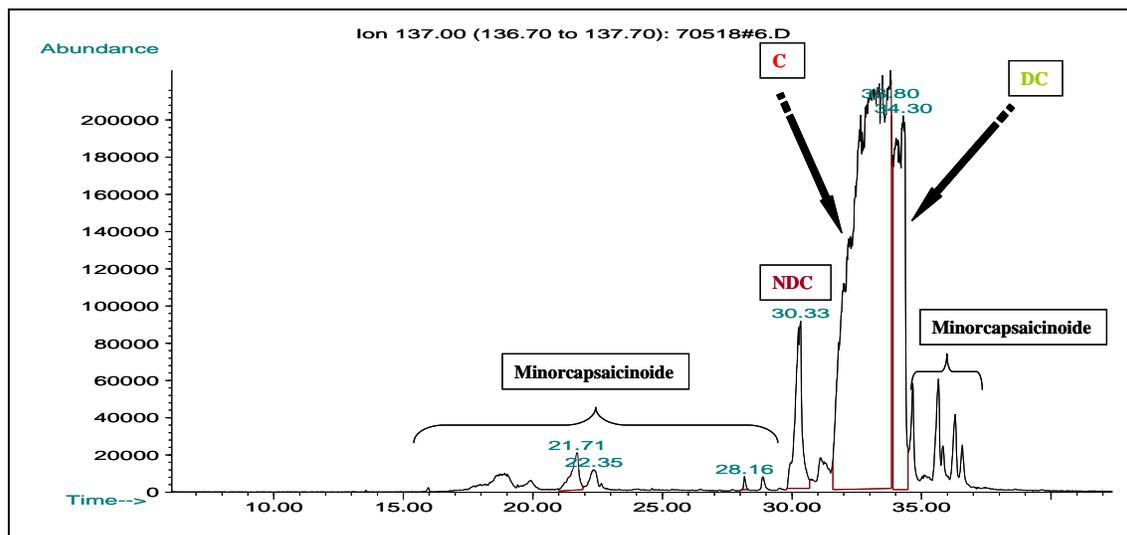


Abbildung 4-14 SIM der Massenspur  $m/z = 137$ , Aminolyse-Reaktion der Capsaicinoide

In Abbildung 4-14, dem Chromatogramm mit der extrahierten Massenspur  $m/z = 137$ , ist bei einer Retentionszeit von 33,8 min der nicht getrennte, gemeinsame Peak von Capsaicin und Dihydrocapsaicin zu sehen. Der Peak bei  $t_R = 30,33$  min entspricht dem Nordihydrocapsaicin. Bedingt durch die Anreicherung sind auch Minorcapsaicinoide als kleinere Peaks zu erkennen. Das Massenspektrum der *N*-Butylamide weist hingegen die Fragmente  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  als intensive und charakteristische Signale auf. Schaut man sich das Chromatogramm der Produkte der Aminolyse unter Zusatz natürlichen Capsaicins im Hinblick auf die Massenspuren der *N*-Butylamide an (Abbildung 4-15), so fällt auf, dass die Capsaicinoide sich **nicht** zu den *N*-Butylamiden umgesetzt haben. Im Bereich der Retentionszeiten der *N*-Butylamide der Hauptfettsäurereste der Capsaicinoide (18,9 min, 20,0 min und 20,4 min; Tabelle 4-3) ist lediglich ein Rauschen um die Basislinie (siehe Skalierung Abundance) zu verzeichnen.

Aus 100 mg an Capsaicinoiden, welche dem gesamten Clean-up (sofortige Elution mit 0,5 M LiCl) in einem weiteren Versuch unterzogen wurden, entstehen ebenfalls **keine** *N*-Butylamide.

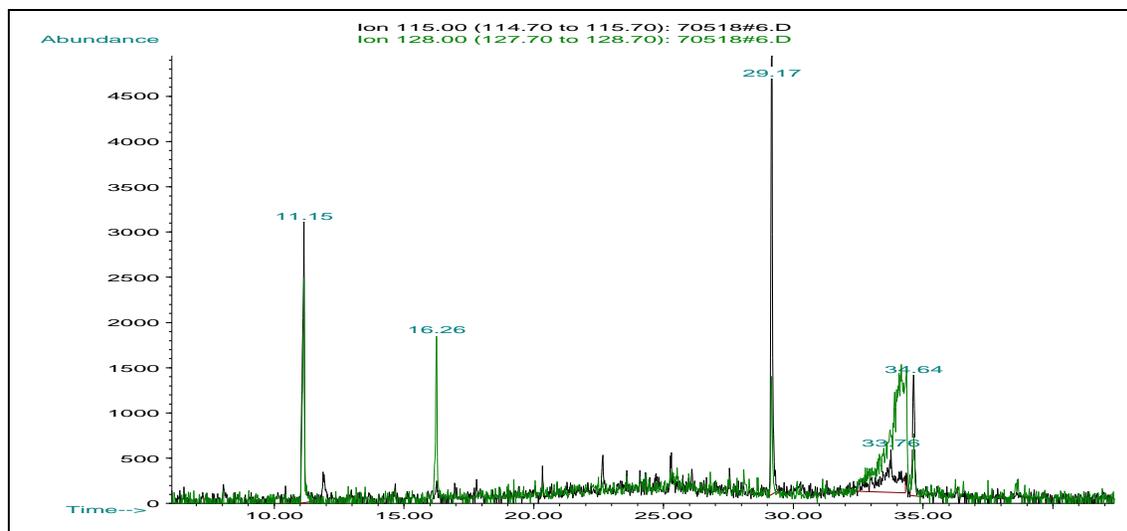


Abbildung 4-15 Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  zur Detektion von *N*-Butylamiden im Reaktionsansatz, Aminolyse-Reaktion der Capsaicinoide

Fazit: Capsaicinoide werden aufgrund ihrer stabilen Amidbindung in wässriger Lösung nicht zu den entsprechenden *N*-Butylamiden umgesetzt. Durch die Probenaufarbeitung gelangen lediglich Spuren an Capsaicinoiden in den Reaktionsansatz der Aminolyse, was sich in der schwarz eingefärbten Massenspur ( $m/z = 137$ ) in Abbildung 4-16 zeigt.

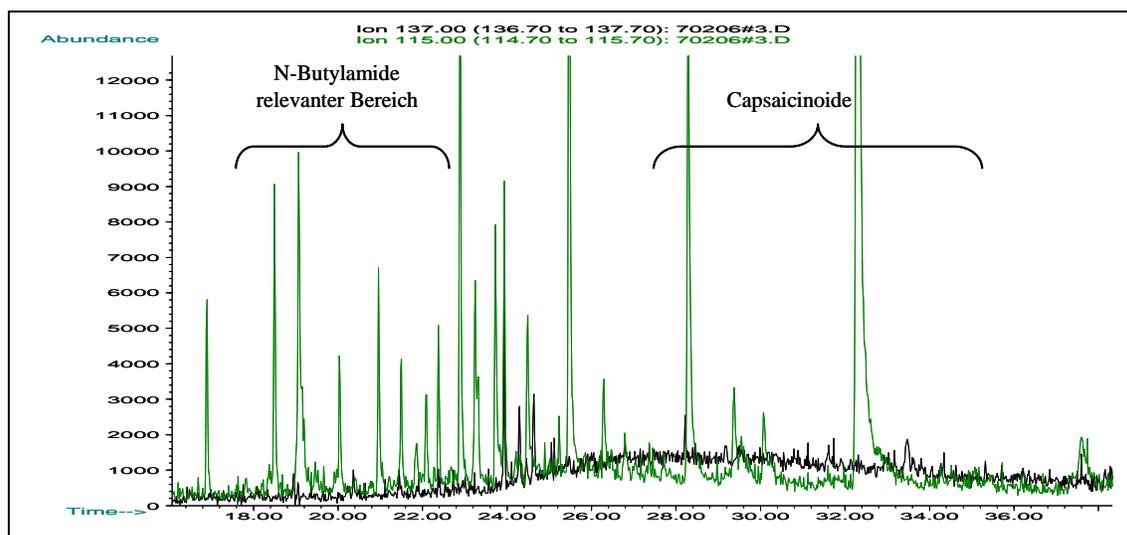


Abbildung 4-16 Chromatogramm Aufarbeitung von Jalapeno-Früchten (hier wurden keine *N*-Butylamide aus den 3 Capsaicinoid-Vorstufen gefunden): schwarze Massenspur = Capsaicinoide; grüne Massenspur  $m/z = 115$  als erster Hinweis auf *N*-Butylamide

Das Chromatogramm in Abbildung 4-17 zeigt den Bereich, indem *N*-Butylamide mit Fettsäureresten der Hauptcapsaicinoide eluieren würden. Die grüne Massenspur mit  $m/z = 115$  täuscht in diesem Fall das Vorhandensein von *N*-Butylamiden nur vor. Denn an dem Verhältnis der Intensitäten der beiden Massenspuren  $m/z = 115$  zu  $m/z = 128$  zueinander erkennt man, dass diese hier nicht vorliegen.

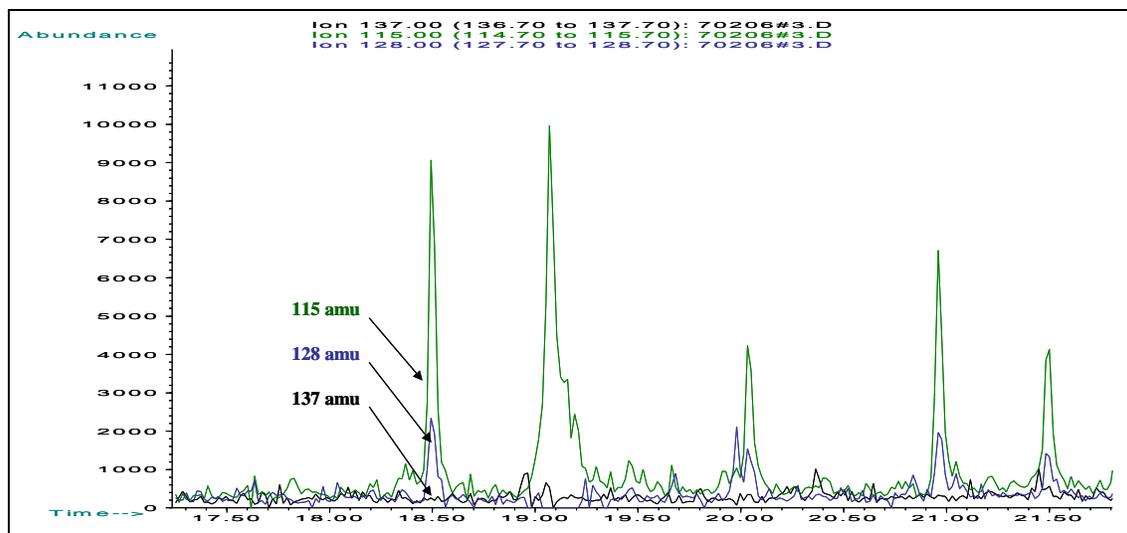


Abbildung 4-17 Chromatogrammausschnitt (Zoom) aus Abbildung 4-16 mit den Massenspuren  $m/z = 115$  (grün),  $m/z = 128$  (gelb) und  $m/z = 137$  (Capsaicinoide, schwarz)

Damit ist ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen.

### 4.3.2 Enthalten Speicherlipide capsaicinoidtypische Fettsäuren?

Es wurde untersucht, ob die *Capsicum*-Pflanze die Fettsäuren 7-Methyloctansäure, 8-Methylnonansäure und 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure auch in ihren Samen (Speicherlipide) enthält. Diese 3 ungewöhnlichen Fettsäuren wurden nur als Reste der Capsaicinoide bzw. der Capsiconiate beschrieben.

#### Versuchsdesign

Aus 30 reifen *Capsicum annuum* „Jalapeno“-Früchten wurden die Samen erhalten, homogenisiert (Moulinette) und 3-mal etwa 2 g zur Bestimmung des Fettgehaltes nach der Mikromethode (Schulte et al., (163)) eingewogen. Nach Säureaufschluss und gleichzeitiger Extraktion der Lipide mit Toluol bei 120 °C im verschlossenen Zentrifugenglas wurde der Fettgehalt gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurde ein Aliquot der Toluolphase in ein tariertes Gläschen überführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 110 °C entfernt. Der Fettgehalt der Samen aus *Capsicum annuum* „Jalapeno“ bezogen auf das Frischgewicht der Samen betrug  $11,8 \pm 1,1$  g Fett/100 g ( $n=3$ ).

35 mg dieses Fettes wurden in 1,25 ml DIPE gelöst und mit 0,875 ml Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung (TMSH; 0,25 M in Methanol) zu Fettsäuremethylestern umgeestert. Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch untersucht und mit einem kommerziellen Fettsäuremethylester-Standard (Fa. CS-Chromatographie) verglichen. Die Auswertung erfolgte nach der 100 %-Flächenmethode.

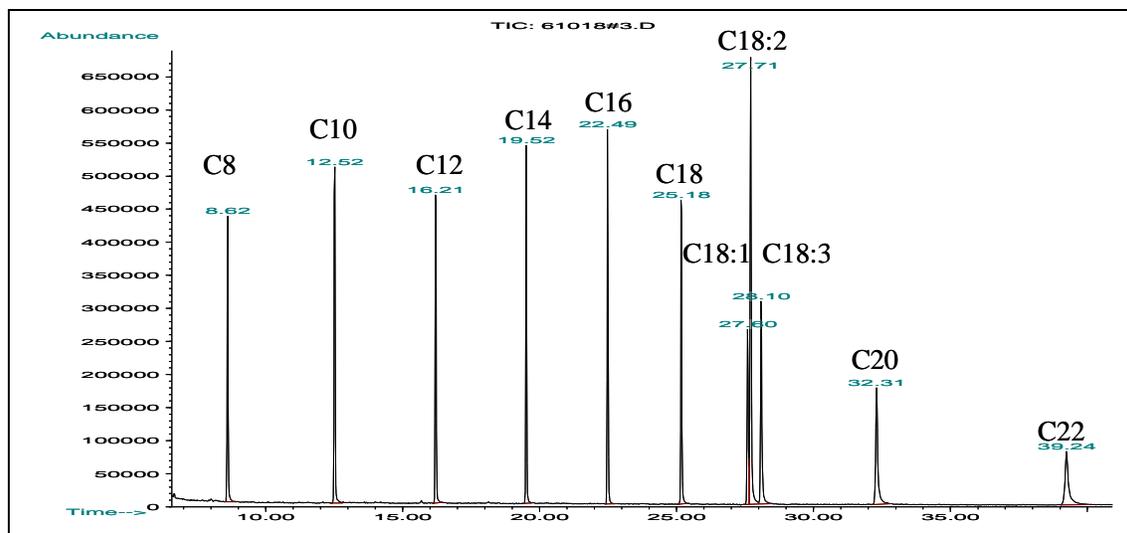


Abbildung 4-18 Chromatogramm Fettsäuremethylester-Standard; je ca. 100 µg/ml

Tabelle 4-15 Retentionszeiten Fettsäuremethylester (Standardmischung Fa. CS-Chromatographie, Gehalt je FAME ca. 100µg/ml)

Verbindung	Struktur	Retentionszeit [min]
Octansäuremethylester	C 8:0	8,6
Decansäuremethylester	C 10:0	12,5
Laurinsäuremethylester	C 12:0	16,2
Myristinsäuremethylester	C 14:0	19,5
Palmitinsäuremethylester	C 16:0	22,5
Stearinsäuremethylester	C 18:0	25,2
Ölsäuremethylester	C 18:1	27,6
Linolsäuremethylester	C 18:2	27,7
Linolensäuremethylester	C 18:3	28,1
Arachinsäuremethylester	C 20:0	32,3
Behensäuremethylester	C 22:0	39,2

Mit den Retentionszeiten der Fettsäuremethylester ließ sich das Fettsäurespektrum der *Capsicum*-Speicherlipide bestimmen. In der Standardmischung lagen keine methylverzweigten und ungeradzahligen Fettsäuren vor. Da die Trennung der Fettsäuremethylester hauptsächlich anhand ihres unterschiedlichen Siedepunktes vollzogen wurde, hätte man die capsaicinoidtypischen Fettsäuren, in Bezug auf die Retentionszeit, zwischen den geradzahligen Methylestern der Octansäure und der Decansäure erwarten können.

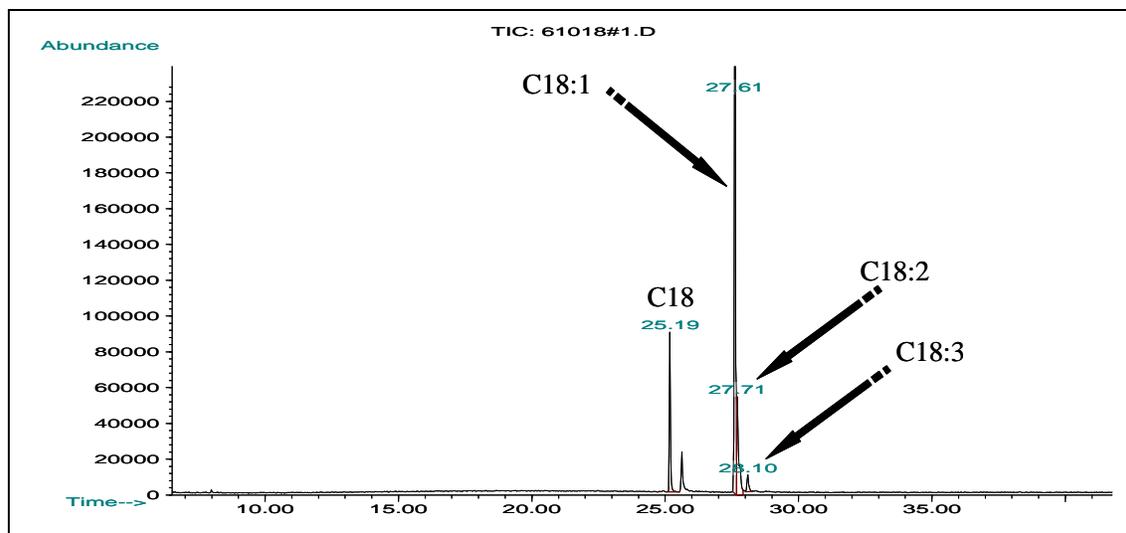


Abbildung 4-19 Fettsäurespektrum der Speicherlipide aus den Samen von *Capsicum annuum* „Jalapeno“

Ergebnis

Tabelle 4-16 Fettsäuren im Speicherlipid von *Capsicum annuum* „Jalapeno“

Retentionszeit [min]	Fettsäuremethylester	Flächeneinheiten	Anteil [%]
25,18	C18:0	2594387	15,9
27,61	C18:1	10848540	66,3
27,70	C18:2	2618013	16,0
28,10	C18:3	295439	1,8
	<b>Summe</b>	<b>16356379</b>	

Es zeigt sich, dass in den Speicherlipiden der Samen keine (Gehalt  $\leq 0,1$  %) kurz- und mittelkettigen Fettsäuren nachweisbar sind.

#### 4.3.3 Sind im Pflanzenmaterial (Plazenten) freie Fettsäuren nachweisbar?

Es wurde überprüft, ob sich in dem Gewebe, welches als Ort der Capsaicinoid-Biosynthese bekannt ist, freie Fettsäuren nachweisen lassen. Die Bildung der Capsaicinoide findet in den Epidermiszellen der Plazenten statt. Deshalb wurden für diese Untersuchung ausschließlich Plazenten und Scheidewände ohne Samen eingesetzt.

Versuchsdesign:

20 g Plazenten (*Capsicum annuum* „Jalapeno“) wurden in einen Kunststoffzentrifugenbecher eingewogen und mit 25 ml HCl (1 M) versetzt und homogenisiert. Danach wurde die Mischung mit 50 ml Diethylether versetzt und das Gefäß verschlossen und kräftig geschüttelt. Nach der Zentrifugation ( $6000 \text{ min}^{-1}$ , 20 min) wurde die organische Phase abgenommen und quantitativ in einen Scheidetrichter überführt. Mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung schüttelte man die organische Phase aus und verwarf die Etherphase. Anschließend wurde mit HCl (1 M) wieder angesäuert und mit Ether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde getrocknet (Natriumsulfat, wasserfrei) und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100  $\mu\text{l}$  Diethylether wieder gelöst und 2  $\mu\text{l}$  injiziert.

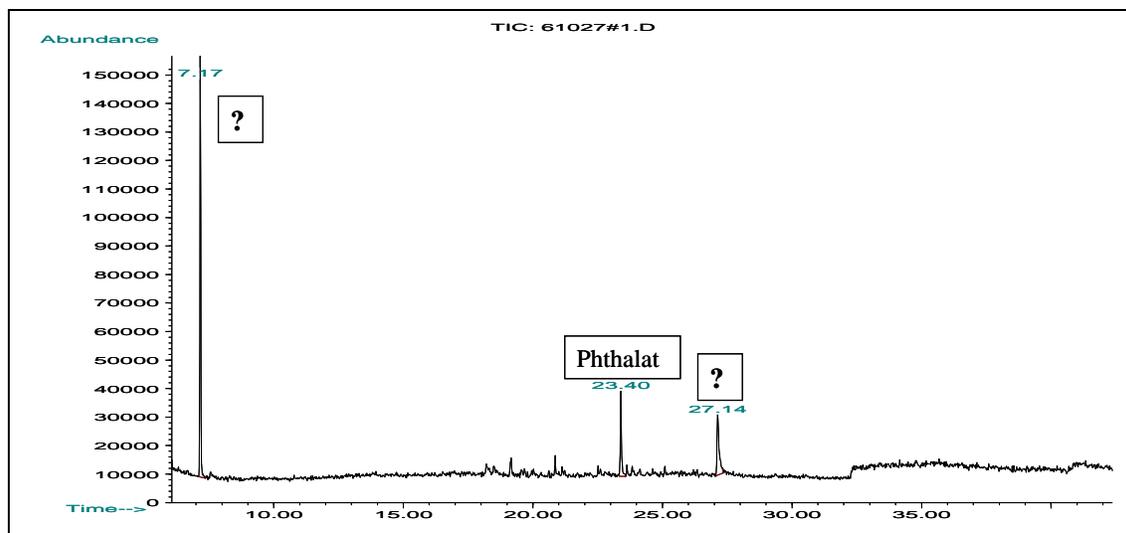


Abbildung 4-20 Totalionen-Chromatogramm Untersuchung auf freie Fettsäuren

Ergebnis:

Das Chromatogramm zeigt keinen Peak der auf freie Fettsäuren zurückzuführen ist. Die Verbindungen bei  $t_R = 7,17$  min und  $t_R = 27,14$  min können aufgrund ihrer Massenspektren nicht zugeordnet werden. Der Peak bei  $t_R = 23,40$  min ist Phthalaten zuzuordnen und stammt vermutlich aus Weichmachern der im Labor eingesetzten Kunststoffe.

Fazit: Es wurden keine freien Fettsäuren nachgewiesen.

#### 4.3.4 Umsetzung freier Fettsäuren bei der Aminolyse-Reaktion

Obwohl keine freien Fettsäuren in der relevanten Matrix nachgewiesen wurden, ist es wichtig zu prüfen, in welchem Umfang freie Fettsäuren bei der Aminolyse zu *N*-Butylamiden umgesetzt würden. Hierzu wird die Aminolyse mit direktem Zusatz einer bestimmten Menge an 8-Methyl-6-nonensäure durchgeführt.

Versuchsdesign:

11,7 mg 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure (Maybridge, 97 %) wurden direkt in einen 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 50 ml des Eluenten der Festphasenanreicherung (0,15 M LiCl in MES Puffer pH 6,1 (75 vol. %) und Isopropanol (25 vol. %)) versetzt. Anschließend wurde nach der Standardarbeitsanweisung unter 4.1.1 verfahren.

Ergebnis:

Die Konzentration an freier Fettsäure im Reaktionsansatz betrug 0,234 mg/ml und 585 mg/ml im Endvolumen von 20  $\mu$ l. Aus diesem Grund war die analytische Säule durch die enorme Menge an freier Fettsäure stark überladen und das Chromatogramm nicht auswertbar. Deshalb wurde die Probe zuvor um den Faktor 20 verdünnt und das Injektionsvolumen auf 1  $\mu$ l halbiert. Die Konzentration der Fettsäure war noch sehr hoch; es waren jedoch Spuren an *N*-Butylamiden im Chromatogramm (Abbildung 4-21) sichtbar.

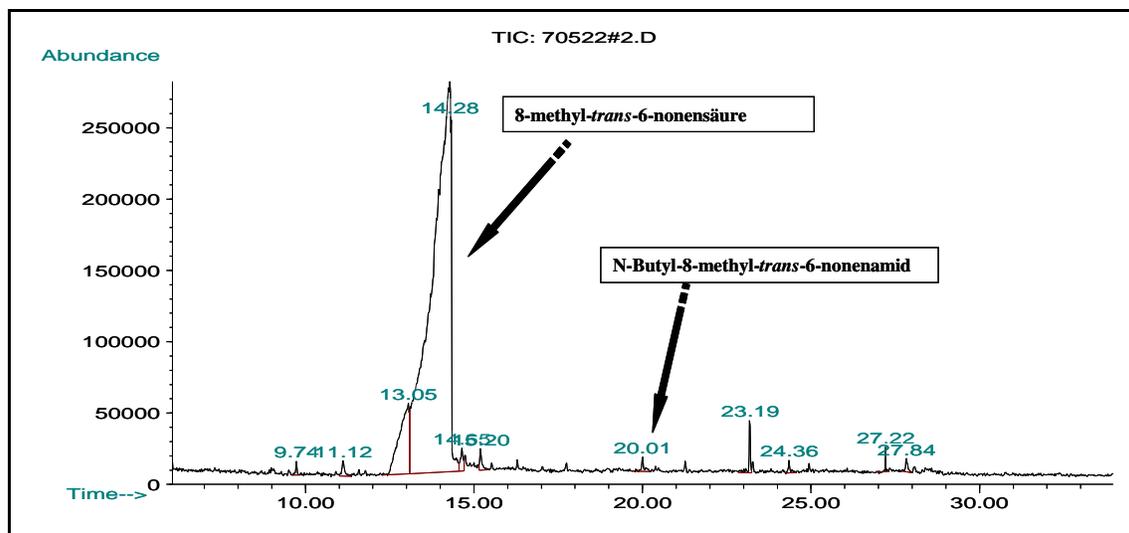


Abbildung 4-21 Totalionen-Chromatogramm Aminolyse-Reaktion mit 8-Methyl-6-nonensäure

Über die Massenspektren können die Peaks bei  $t_R = 14,28$  min als 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure (Abbildung 4-22) und bei  $t_R = 20,00$  min als *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid identifiziert werden.

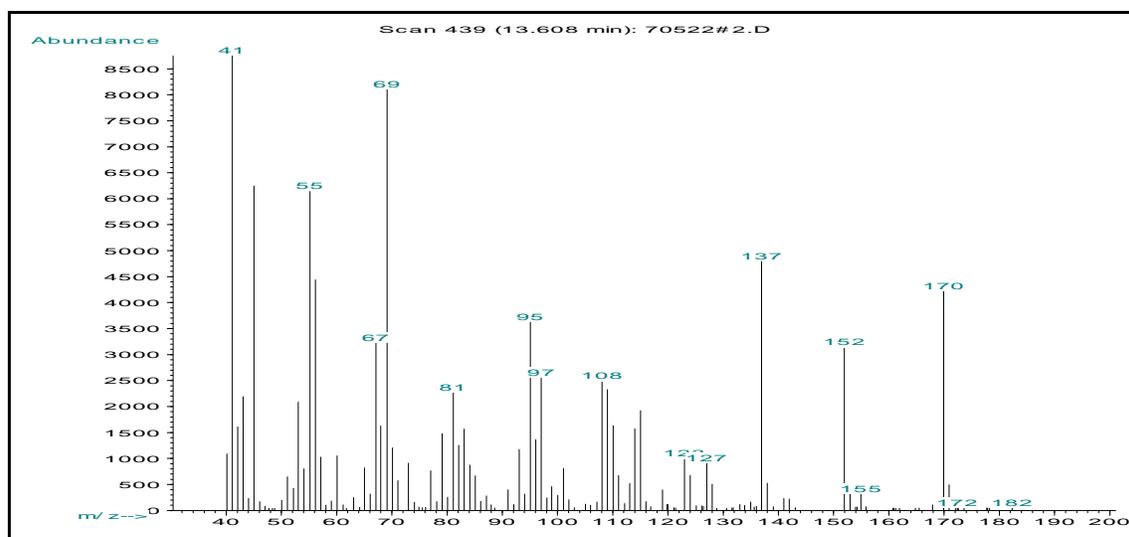


Abbildung 4-22 Massenspektrum des Peaks bei  $t_R = 14,28$  min (8-Methyl-*trans*-6-nonensäure)

Tabelle 4-17 Aminolyse 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure

Verbindung	Retentionszeit [min]	Peakfläche	Prozentualer Anteil*
8-Methyl- <i>trans</i> -6-nonensäure	14,28	119715112	99,64 %
<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid (tr)	20,00	424942	0,35 %
<b>Summe</b>		<b>120140054</b>	

\*Flächenprozent

Fazit:

Setzt man eine hohe Konzentration an freier Fettsäure zur Aminolyse ein, dann reagieren unter diesen Bedingungen weniger als 0,5 % der Fettsäure mit Butylamin zum *N*-Butylamid.

Begleitstoffe der Fettsäure, deren Reinheit der Hersteller mit 97 % angibt, wurden in Abbildung 4-21 nicht berücksichtigt.

Durch die Probenaufarbeitung nach Kopka werden im 2. Waschschrift mit 80 % Isopropanol freie Fettsäuren und Triglyceride weitgehend entfernt und gelangen nicht in die Thioesterfraktionen. Sie würden in der darauf folgenden selektiven Aminolyse-Reaktion nicht zu den *N*-Butylamiden reagieren, führen also nicht zu einem falsch-positiven Ergebnis. Dies zeigte Kopka et al. (160) durch die Aminolyse von Glycerintrioleate, bei der selbst nach 30 min lediglich geringe Mengen (minor amounts) zu *N*-Butylamiden umgesetzt wurden.

## 4.4 Untersuchung von Chili-Früchten

### 4.4.1 *Capsicum chinense* var. *Habanero*

#### 4.4.1.1 Nachweis von Acyl-CoA's in Pflanzenmaterial (*Capsicum chinense* var. *Habanero* orange, 1. Ernte)

Für die Untersuchung wurden insgesamt 18 Früchte (16 grüne und 2 orange Früchte, Alter der Früchte  $\leq 45$  Tage nach Blüte) von verschiedenen Pflanzen\* gleichen Alters (10 Monate) geerntet. Die Plazenten dieser Früchte (insgesamt 43,9 g) wurden aufgearbeitet, die Thioester isoliert (mit 0,15 M LiCl im Eluenten), zu *N*-Butylamiden derivatisiert und angereichert. Das Chromatogramm eines parallel mitgeführten Reagenzien-Blindwertes zeigt Abbildung 4-23. Der Zentrifugationsrückstand aus der Aufarbeitung wurde per HPLC, zur Bestimmung der Capsaicinoidmusters, analysiert.

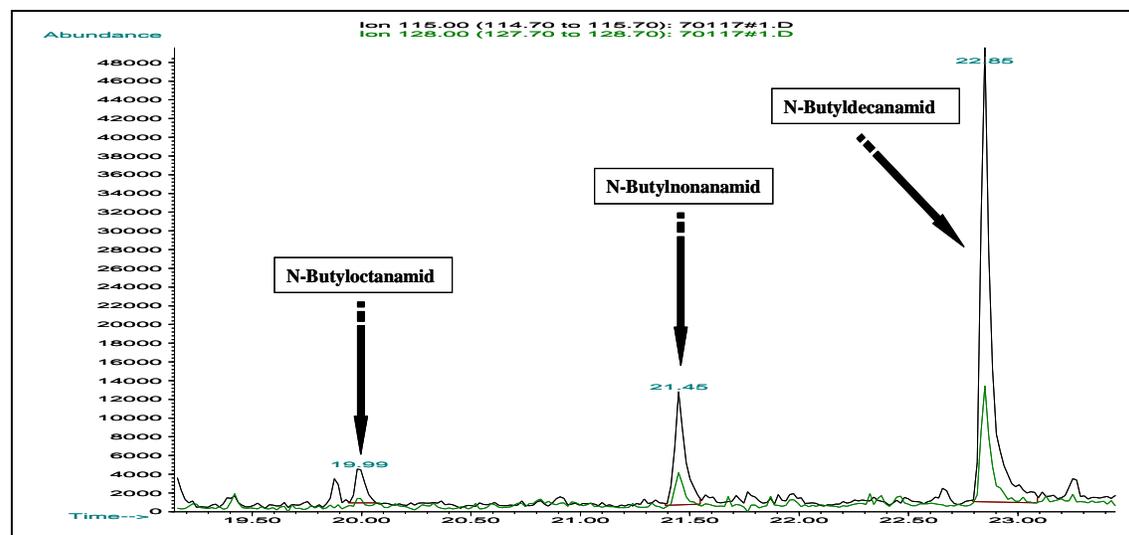


Abbildung 4-23 Reagenzien-Blindwert: Chromatogramm-Ausschnitt, Messung im Scan-Modus ( $m/z=35$  bis 350), Darstellung von 2 Massenspuren ( $m/z=115$  und  $m/z=128$ )

Den erfolgreichen Nachweis der Acyl-CoA's als *N*-Butylamide zeigt das folgende Chromatogramm (Abbildung 4-24). Man erkennt die *N*-Butylamide *N*-Butyl-7-methyloctanamid (20,94 min), *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid (22,06 min) und *N*-Butyl-8-methylnonanamid (22,35 min). Wie auch schon bei den Messungen der Blindwerte unter 4.4.2, sind dieselben Reaktionsnebenprodukte bzw. Verunreinigungen (Peaks bei Retentionszeiten von 21,5 min und 22,9 min) der eingesetzten Reagenzien zu erkennen.

\*Die genaue Anzahl der Pflanzen variiert von Ernte zu Ernte, da nicht immer alle Pflanzen einer Kohorte zum Erntezeitpunkt Früchte trugen.

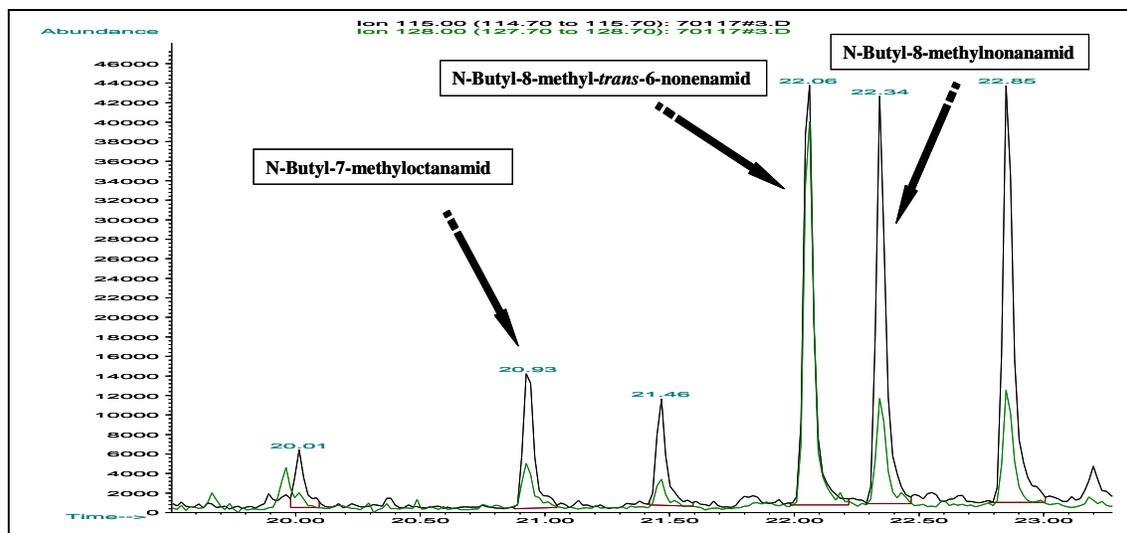


Abbildung 4-24 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung von Thioestern in grünen Chili-Früchten. Messung im Scan-Modus ( $m/z = 35$  bis  $350$ ), Darstellung von 2 Massenspuren ( $m/z = 115$  und  $m/z = 128$ ). Die Intensitäten der beiden Massenspuren sind bei dem Peak von *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid ( $t_R = 22,06$  min) gleich (s. S. 51).

Zur quantitativen Auswertung wurden die Peakflächen der Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  wurden mit den Responsefaktoren (4.1.3.1) korrigiert. Das relative Peakflächenverhältnis der *N*-Butylamide untereinander, bezogen auf *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid, spiegelt das Verteilungsmuster der Acyl-CoA's (Abbildung 4-25) wider.

Tabelle 4-18 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Bestimmung der Acyl-CoA's als *N*-Butylamide

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche Summe aus $m/z = 115$ und $m/z = 128$	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
20,9	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	655207	0,647	10
22,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	2638270	1,000	63
22,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	1570220	0,720	27

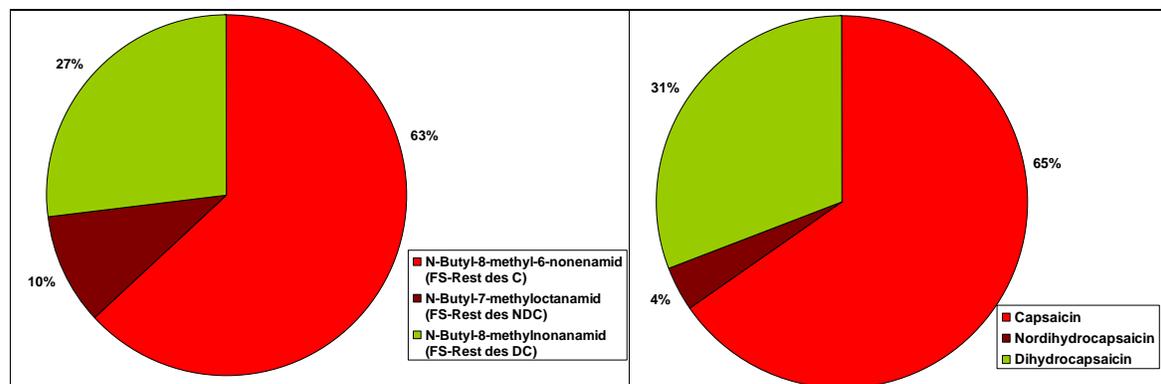


Abbildung 4-25 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: links: prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's als *N*-Butylamide in 18 Chili-Früchten. rechts: prozentuale Verteilung der 3 bereits gebildeten Hauptcapsaicinoide Capsaicin (C), Nordihydrocapsaicin (NDC) und Dihydrocapsaicin (DC) aus dem Zentrifugationsrückstand (Plazenten-Matrix der selben Früchte)

Beim Vergleich der beiden Verteilungsmuster fällt auf, dass der Anteil an der Vorstufe des NDC größer ist, als der prozentuale Anteil des NDC im Capsaicinoidmuster. Der DC-Anteil ist größer als der entsprechende Anteil an *N*-Butyl-8-methylnonanamid. Diese Beobachtung ist deckungsgleich mit der Untersuchung der Früchte von *Capsicum annuum* var. *Jalapeno* (Abbildung 4-47).

#### 4.4.1.2 Nachweis von Acyl-Thioestern in Fruchtmaterial (*Capsicum chinense* var. *Habanero orange*) definierten Alters.

##### 4.4.1.2.1 Untersuchung von unreifen, maximal 2 Wochen alten Habanero-Früchten (Versuch A, 2. Ernte, Acyl-CoA's)

Für die Messung unter 4.4.1.1 waren alle Chili-Früchte von den Habanero-Pflanzen geerntet worden. 14 Tage später wurden alle neu gebildeten Früchte geerntet. Insgesamt wurden 36 grüne Früchte mit einem Fruchtgewicht von 1,72 g (Median) aufgearbeitet. Das Fruchtmaterial (68,3 g) wurde in Perikarp (48,5 g) und Plazenta (19,8 g) getrennt und untersucht. Die Elution der Thioester von der Festphasen-Kartusche erfolgte mit einer LiCl-Konzentration von 0,15 M im Eluenten.

Im Chromatogramm (Abbildung 4-26), resultierend aus der Aufarbeitung des Perikarps, erkennt man die schon zuvor besprochenen Verunreinigungen, welche auch im Reagenzien-Blindwert (Abbildung 4-23) enthalten sind. Zusätzlich deutet ein kleiner Peak bei einer Retentionszeit von 22,1 min auf *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid hin. Man erkennt gut, dass bei diesem ungesättigten *N*-Butylamid die Intensitäten der beiden Massenspuren  $m/z = 128$  und  $m/z = 115$  nahezu identisch sind, was ein wichtiges Indiz für die Identifizierung darstellt. Die Intensität des Signals reicht aus, um die Verbindung per Massenspektrum anschließend eindeutig zu identifizieren.

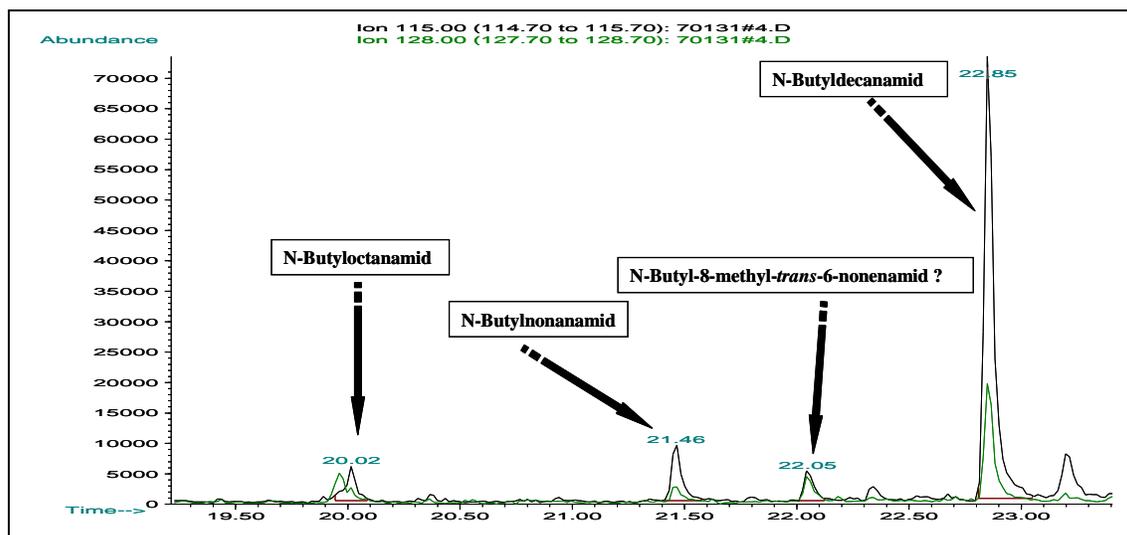


Abbildung 4-26 *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung von Thioestern in Perikarp-Gewebe von grünen, bis zu 14 d alten Chili-Früchten. Messung im Scan-Modus ( $m/z = 35$  bis  $350$ ), Darstellung von 2 Massenspuren ( $m/z = 115$  und  $m/z = 128$ )

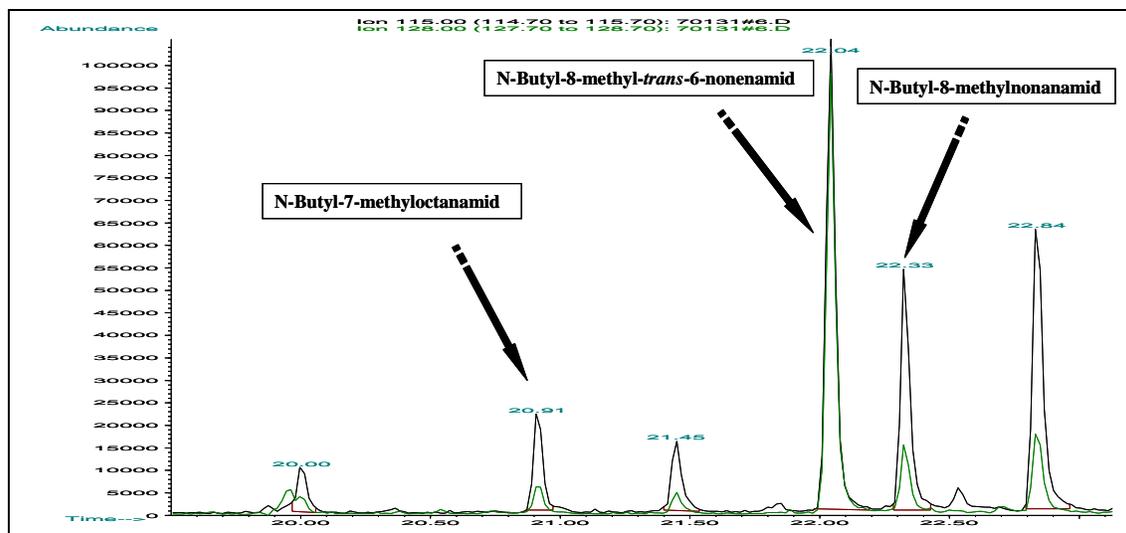


Abbildung 4-27 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung von Thioestern in Plazenta-Gewebe von grünen, bis zu 14 d alten Chili-Früchten. Messung im Scan-Modus ( $m/z = 35$  bis  $350$ ), Darstellung von 2 Massenspuren ( $m/z = 115$  und  $m/z = 128$ )

Das Chromatogramm der Plazenta-Probe (Abbildung 4-27) zeigt ebenfalls das *N*-Butylamid der 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure – allerdings in ca. 20-fach größerer Konzentration.

Tabelle 4-19 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Bestimmung der Acyl-CoA's als *N*-Butylamide in bis zu 14 d alten Chili-Früchten

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche Summe aus $m/z = 115$ und $m/z = 128$	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
20,9	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	11032106	0,647	11
22,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	42999497	1,000	64
22,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	23420831	0,720	25

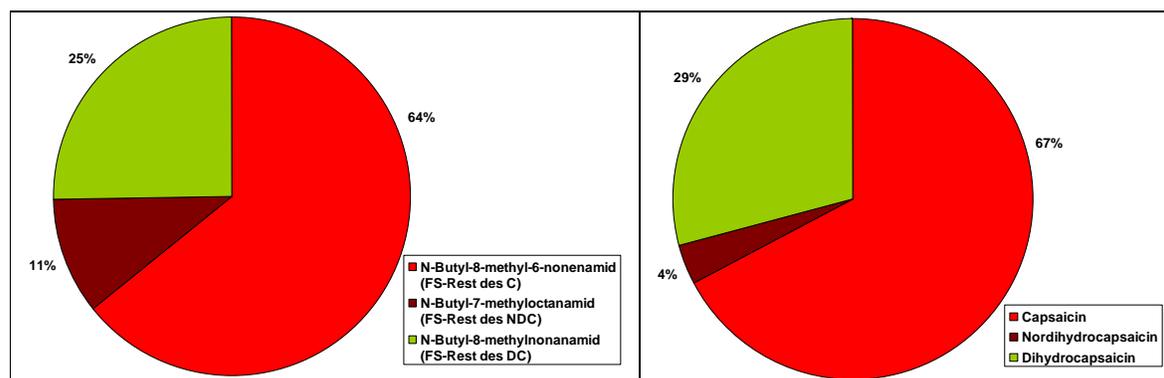


Abbildung 4-28 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: links: prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's als *N*-Butylamide in 36 unreifen, bis zu 14 d alten Chili-Früchten. rechts: prozentuale Verteilung der 3 bereits gebildeten Hauptcapsaicinoide Capsaicin (C), Nordihydrocapsaicin (NDC) und Dihydrocapsaicin (DC) aus dem Zentrifugationsrückstand (Plazenten-Matrix).

Acyl-CoA's mit den Fettsäureresten der 3 Hauptcapsaicinoide können in Chili-Früchten von *Capsicum chinense* var. *Habanero* im Plazenta-Gewebe nachgewiesen werden. Die Verteilungsmuster der Vorstufen und der Capsaicinoide entsprechen den Ergebnissen des

Versuches unter 4.4.1.1.; es zeigt sich keine Veränderung gegenüber früher geernteten Früchten.

#### 4.4.1.2.2 Untersuchung von unreifen, maximal 2 Wochen alten Habanero-Früchten (Versuch B, 3. Ernte, Acyl-CoA's und Acyl-ACP's)

Es wurden erneut alle Früchte geerntet, die sich nach der letzten Ernte an den Pflanzen gebildet hatten. Der Zeitraum betrug 15 Tage; allerdings lässt der Median der Fruchtgewichte von 2,8 g/Frucht (n = 33) darauf schließen, dass die Früchte (und vor allem das Perikarp) sich in der vergleichbaren Zeitspanne schneller entwickelten, als beim Versuch unter 4.4.1.2.1. Das Gesamtfruchtgewicht betrug 99,7 g, was sich in 71,9 g Perikarp und 27,8 g Plazenta gliedert. Während der Probenaufarbeitung wurde der Überstand, welcher die Acyl-Thioester enthält, nach dem dritten Zentrifugationsschritt halbiert und auf je eine Festphasenkartusche mit konditioniertem Anionenaustauscher-Material (DEAE-Sepharose) gegeben:

Bei der ersten Kartusche wurden die Thioester (Acyl-CoA's und Acyl-ACP's) in einer Stufe mit dem Eluenten, welcher 0,5 M LiCl enthält, eluiert.

Um zwischen Acyl-CoA's auch Acyl-ACP's differenzieren zu können, wurde nach dem Clean-up mit der zweiten Kartusche eine konsekutive Elution gemäß Abbildung 4-2 durchgeführt.

Für die Messungen mittels GC/MS waren bei der hier verwendeten kürzeren Säule die Retentionszeiten aus Tabelle 4-3 zum Vergleich heranzuziehen. Aus der gleichzeitigen Elution beider Thioester mit 0,5 M LiCl ergibt sich das in Tabelle 4-20 dargestellte Verteilungsmuster der Capsaicinoid-Vorstufen.

**Tabelle 4-20 Bestimmung der Acyl-Thioester als N-Butylamide in bis zu 14 d alten Chili-Früchten von *Capsicum annuum* var. *Habanero orange*. Simultane Elution beider Fraktionen an Thioestern mittel 0,5 M LiCl-Pufferlösung**

1. Kartusche: Acyl-CoA + Acyl-ACP					
Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche SIM-Modus m/z = 115 und m/z = 128	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
18,9	N-Butyl-7-methyloctanamid	NDC	709835	0,647	8
20,1	N-Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	4312993	1,000	75
20,4	N-Butyl-8-methylnonanamid	DC	1330317	0,720	17

Die Untersuchung der beiden Fraktionen der konsekutiven Elution liefert folgende Werte:

**Tabelle 4-21 *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*: Elution der 1. Fraktion an Thioestern (Acyl-CoA's) mittels 0,15 M LiCl-Pufferlösung**

2. Kartusche: 1. Fraktion Acyl-CoA					
Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche SIM-Modus m/z = 115 und m/z = 128	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
18,9	N-Butyl-7-methyloctanamid	NDC	1187221	0,647	11
20,1	N-Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	4403678	1,000	65
20,4	N-Butyl-8-methylnonanamid	DC	2306120	0,720	24

Die Elution der 2. Fraktion mit 0,5 M LiCl im Puffer führte bei der Messung der *N*-Butylamide zu einem etwas anderen Verteilungsmuster:

Tabelle 4-22 *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*: Elution der 2. Fraktion an Thioestern (Acyl-ACP's) mittel 0,5 M LiCl-Pufferlösung

2. Kartusche: 2. Fraktion Acyl-ACP					
Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche SIM-Modus m/z = 115 und m/z = 128	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
18,9	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	375984	0,647	5
20,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	3585604	1,000	80
20,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	940692	0,720	15

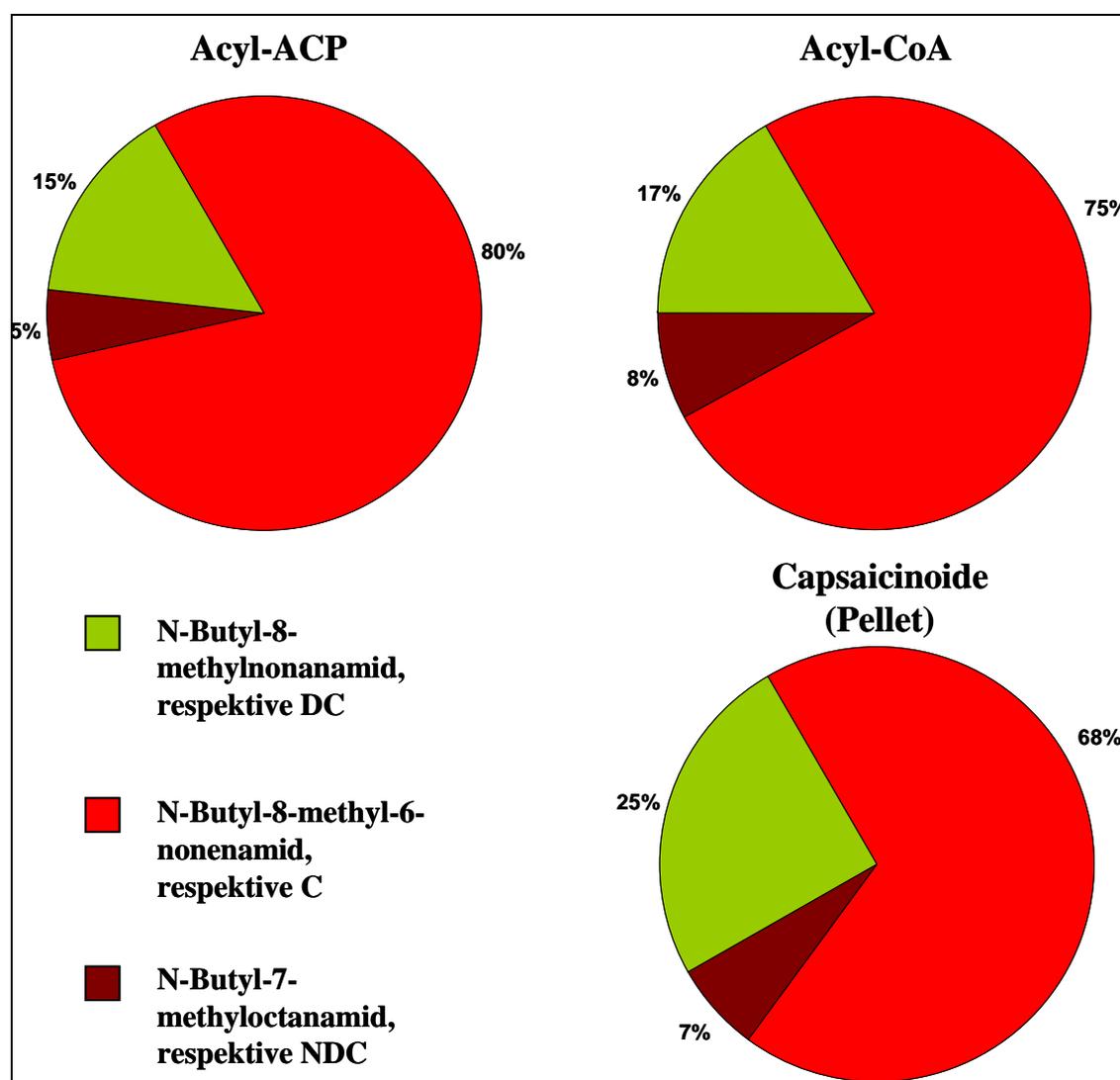


Abbildung 4-29 *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*: Prozentuale Verteilung der Fettsäure-Reste in beiden Acyl-Thioester-Fractionen (Acyl-ACP's und Acyl-CoA's; Auswertung der 2. Kartusche) und in den bereits gebildeten Capsaicinoiden im Zentrifugationsrückstand (Plazenten-Matrix).

Beide Thioesterfraktionen enthalten das Acyl-Thioester-Derivat mit dem *trans*-ungesättigtem Fettsäurerest (Precursor des Capsaicins). Die Acyl-CoA-Fraktion enthält einen höheren Anteil an Vorstufen von DC und NDC, in der Acyl-ACP-Fraktion findet sich ein größerer Anteil der Vorstufe des C. Im Vergleich der Untersuchung der Acyl-CoA's in Früchten gleichen Alters (s. Abbildung 4-28) findet sich hier ein geringerer Anteil an 7-Methyloctansäure-CoA im Plazentagewebe. Bedingt durch die Aufarbeitung (der Trichloressigsäure-Überstand wird verworfen (s. Abbildung 4-2)), enthält die untersuchte Matrix nur einen Teil der CoA's.

Aus den Proben der Perikarp-Matrix, welche analog untersucht wurden, konnten keine Acyl-Thioester als *N*-Butylamide nachgewiesen werden.

Das Capsaicinoidmuster des Zentrifugationsrückstands zeigt einen niedrigeren Anteil an Capsaicin im Vergleich zu den entsprechenden Thioestern (8-Methyl-6-nonensäure-CoA und -ACP) in der Plazenta-Matrix. Der Anteil des DC liegt hingegen mit 25 % höher als der Anteil der entsprechenden gesättigten Thioester (15 % ACP respektive 17 % CoA).

#### 4.4.1.2.3 Untersuchung von reifen Habanero-Früchten

Es wurden 15 gelb-orange, vollreife Chili-Früchte (Alter  $\geq 50$  Tage nach Blüte) mit einem Gesamtgewicht (frisch) von 89,4 g geerntet. Auf das Perikarp entfielen dabei 82,9 g und das Gewicht der zu einem Pool zusammengefügt Plazenten beträgt 6,5 g. Das Einzelfruchtgewicht lag im Median bei 5,9 g. Mit zunehmendem Alter der Früchte nimmt der Anteil der Plazenta am Gesamtgewicht ab, was auch an Früchten der Varietät Jalapeno (*Capsicum annuum*) beobachtet werden konnte (Abbildung 4-58). Das Alter der Pflanzen betrug 10 Monate. Die Elution erfolgte mit 0,15 M LiCl in der Pufferlösung.

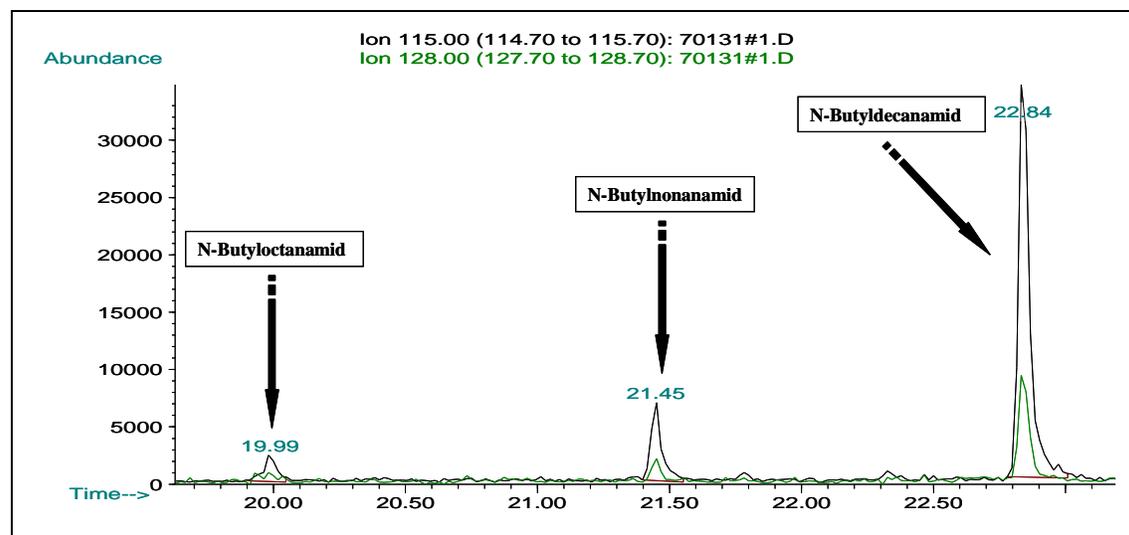


Abbildung 4-30 Reagenzien-Blindwert: Ausschnitt des Totalionen-Chromatogramms: Darstellung von 2 Massenspuren ( $m/z=115$  und  $m/z=128$ ).

Der Reagenzien-Blindwert (Abbildung 4-30) zeigt die bei der Aminolyse-Reaktion gebildeten Nebenprodukte.

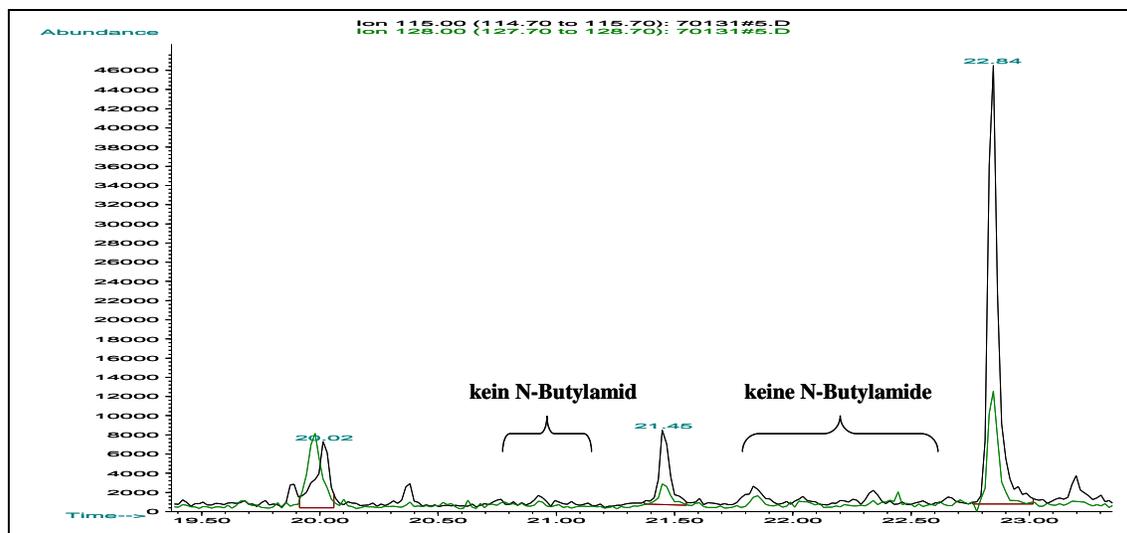


Abbildung 4-31 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Ausschnitt des Totalionen-Chromatogramms: vollreife, orange Chili-Früchte (Plazenten-Matrix), Darstellung der Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$ .

Die Chromatogramme des Reagenzien-Blindwertes und der Aufarbeitung reifer Früchte sind deckungsgleich. Es sind keine Acyl-CoA's in reifen Früchten nachweisbar.

#### 4.4.1.2.4 Untersuchung von Einzelfrüchten auf die 3 Hauptcapsaicinoide mittels HPLC/Fluoreszenz in *Capsicum chinense* var. Habanero orange

Von denselben Pflanzen, welche das definierte Pflanzenmaterial zur Thioesterbestimmung lieferten, wurden im selben Monat (Alter der Pflanzen 10 Monate) 34 reife, gelb-orange Einzelfrüchte (Alter  $\geq 50$  Tage nach Blüte) geerntet und bezüglich ihres Capsaicinoidgehaltes untersucht. Die Früchte stammen von 8 Pflanzen der Varietät *C. chinense* var. „Habanero orange“.

Die Gesamt-Capsaicinoidgehalte der Einzelfrüchte liegen im Bereich von 2400  $\mu\text{g}/\text{Frucht}$  bis zu 17500  $\mu\text{g}/\text{Frucht}$ . Ein ebenfalls breites Intervall findet man bei der Betrachtung der Capsaicinoidgehalte einzelner Früchte einer Pflanze. Die Scharfstoff-Gehalte pro Frucht bewegen sich z. B. bei Pflanze Nr. 3 in Abbildung 4-33 im Bereich von 3000  $\mu\text{g}/\text{Frucht}$  bis 17300  $\mu\text{g}/\text{Frucht}$ .

Der Verfahrensvariationskoeffizient zur Bestimmung von Capsaicinoiden von Einzelfrüchten ist nur bedingt möglich, da jede Frucht nur einmal vorhanden ist. Für das hier beschriebene Verfahren konnte Hiepler (159) nach der wiederholten Aufarbeitung und Messung eines homogenisierten Früchtepools einen Verfahrensvariationskoeffizienten von 7,5 % angeben.

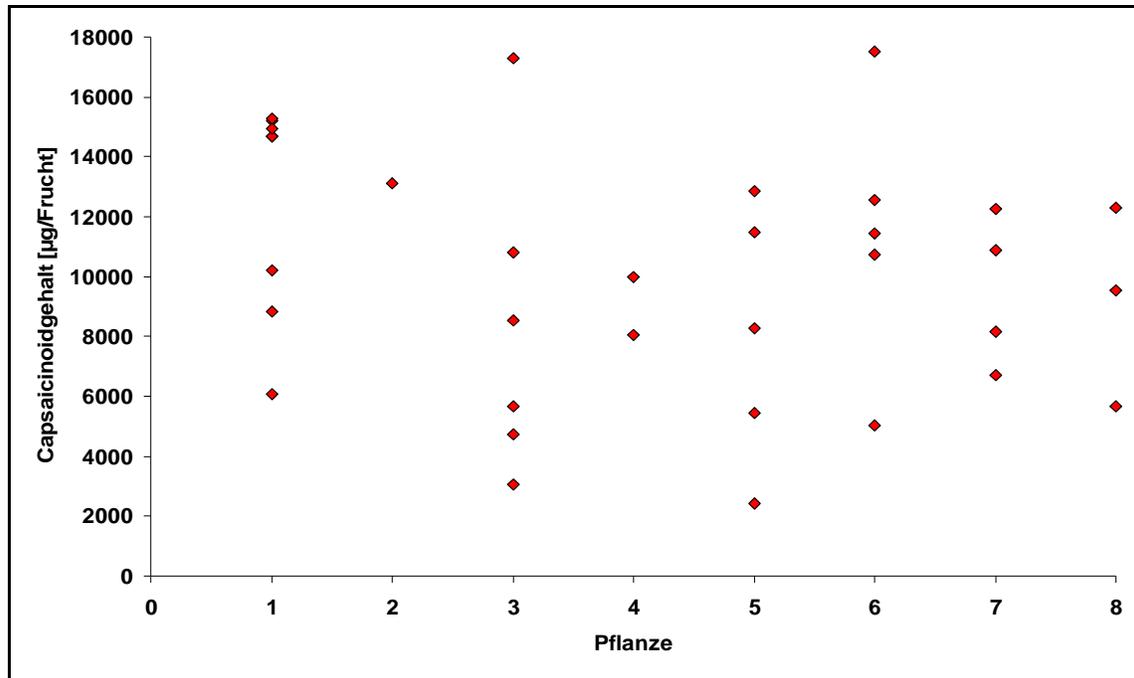


Abbildung 4-32 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Darstellung der Heterogenität im Gesamtcapsaicinoidgehalt aus 34 Einzel Früchten von 8 Pflanzen.

Auch hier ist das Muster der Capsaicinoide nicht einheitlich, sondern Schwankungen unterworfen ist. Mit einer großen Anzahl von Einzelproben (n=34) lässt sich jedoch eine Aussage über die mittlere Verteilung der drei Hauptcapsaicinoide treffen.

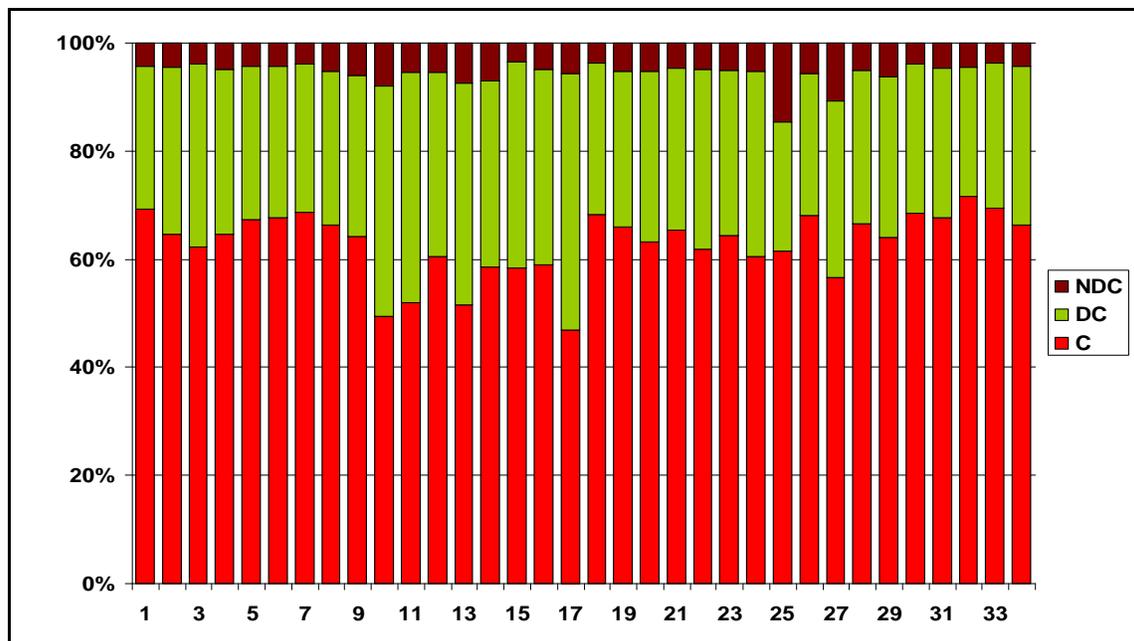


Abbildung 4-33 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Capsaicinoidmuster der 3 Hauptcapsaicinoide von 34 reifen Einzel Früchten.

Zur Visualisierung wird der Median der prozentualen Anteile der Capsaicinoide am Gesamt-Capsaicinoidgehalt aufgetragen (Abbildung 4-34).

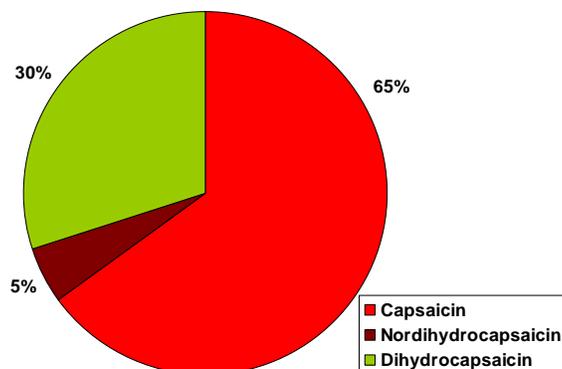


Abbildung 4-34 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Prozentuale Verteilung der 3 Hauptcapsaicinoide (Median, n=34 Einzelfrüchte) in reifen Früchten.

Zur Orientierung sind in Tabelle 4-23 die Quantile bei 10 % und 90 % angegeben.

Tabelle 4-23 *Capsicum chinense* var. Habanero orange: Capsaicinoidmuster der 3 Hauptcapsaicinoide in reifen Früchten (n = 34).

	Nordihydrocapsaicin [%]	Capsaicin [%]	Dihydrocapsaicin [%]
<b>Median</b>	<b>4,9</b>	<b>64,5</b>	<b>29,9</b>
<b>Quantil 10 %</b>	<b>3,9</b>	<b>53,4</b>	<b>26,6</b>
<b>Quantil 90 %</b>	<b>7,3</b>	<b>68,7</b>	<b>40,2</b>

Die vorangegangenen Capsaicinoidbestimmungen aus den Zentrifugationsrückständen von

1. bis zu 45 Tage alten Früchten,
2. und 3. bis zu 14 Tage alten Früchten und
4. von 34 reifen,  $\geq 50$  Tage alten Früchten

zeigen im direkten Vergleich ein sehr konstantes Verteilungsmuster der Capsaicinoide. Die Abbildung 4-35 zeigt die vier ermittelten Verteilungsmuster der 3 Hauptcapsaicinoide.

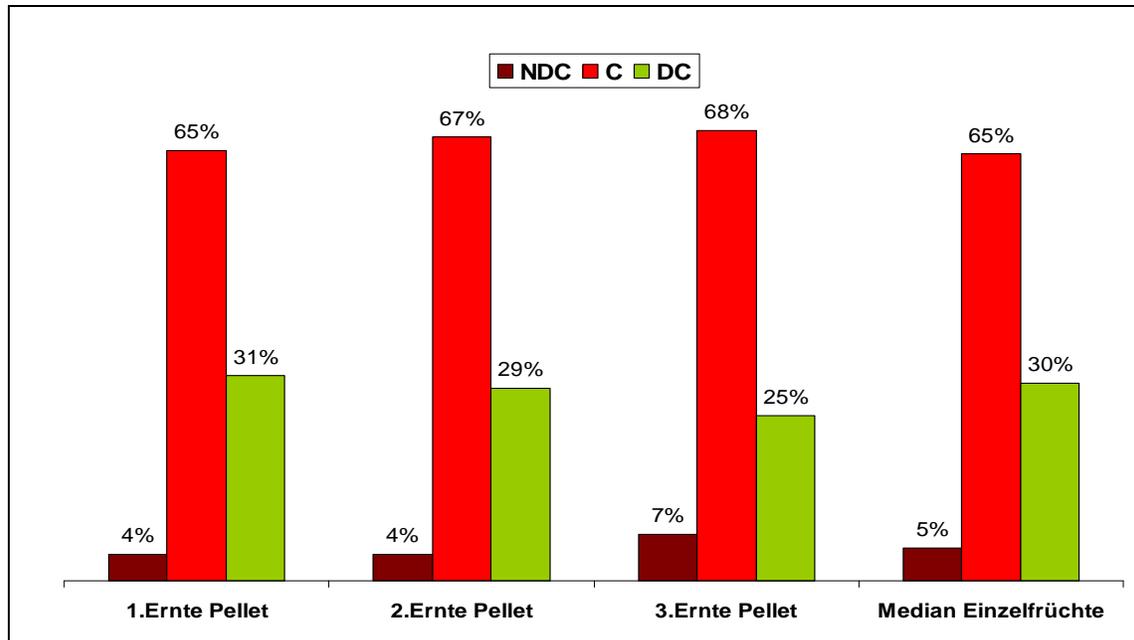


Abbildung 4-35 *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*: Prozentuale Verteilung der 3 Hauptcapsaicinoide in den 3 Zentrifugationsrückständen des Clean-up und der Einzelfrüchte (Median, n=34) im Vergleich.

Unter Berücksichtigung der Analysenungenauigkeit bleibt das Verteilungsmuster der Capsaicinoide in *Capsicum chinense* var. *Habanero orange* während des Entwicklungsstadium der Früchte stabil.

#### 4.4.2 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

##### 4.4.2.1 Nachweis von Thioestern in Pflanzenmaterial (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*)

Zur Untersuchung werden 15 Früchte, welche sich gerade im Farbwechsel von grün nach rot befinden (nach 45-50 Tagen werden die Früchte rot, s. Abbildung 4-58), geerntet und sofort untersucht. Die Früchte stammen von verschiedenen Pflanzen gleichen Alters (4,5 Monate). Die Plazenta-Matrix (Plazenten, Scheidewände und Samen) wurde von den Fruchtwänden (Perikarp) getrennt aufgearbeitet. Nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Zerkleinern wurden von den beiden Matrices je 19,5 g eingewogen. Nach dem Clean-up und der Elution beider Thioesterfraktionen zusammen mit 0,5 M LiCl (Acyl-CoA's und Acyl-ACP's) wurden von den insgesamt 20 µl Probevolumen 2 µl zur GC/MS-Analyse injiziert.

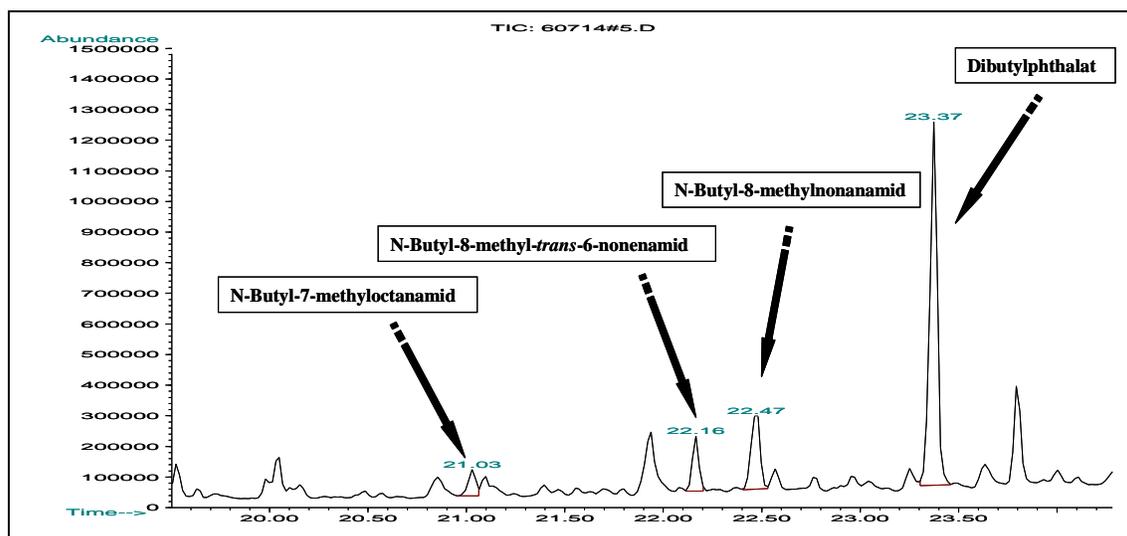


Abbildung 4-36 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Ausschnitt des Totalionen-Chromatogramms der aufgearbeiteten Probe aus den Plazenten der Früchte.

Betrachtet man in Abbildung 4-36 das Totalionen-Chromatogramm zu den aufgearbeiteten Plazenten der Chili-Früchte, erkennt man die Notwendigkeit der selektiven Detektion einzelner Massenspuren zur Bestimmung der *N*-Butylamide als Derivate der Thioester. Der größte, hier abgebildete Peak (23,37 min) stammt von Phthalaten, welche als Weichmacher in vielen Kunststoffen enthalten sind. Aus diesem Grund werden zur besseren Erkennung der *N*-Butylamide die Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z=128$  extrahiert und angezeigt (Abbildung 4-37).

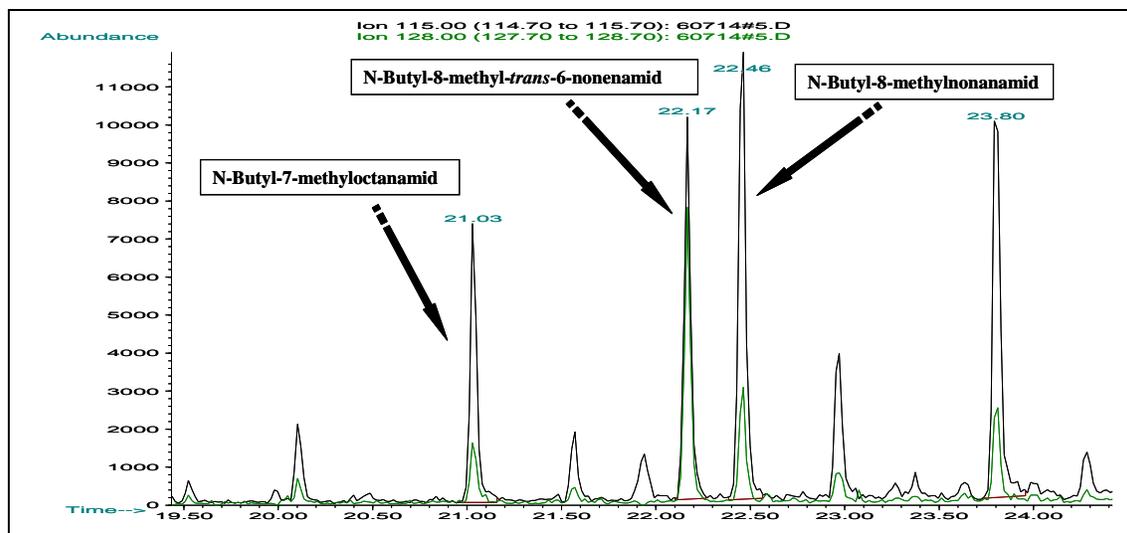


Abbildung 4-37 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$  des Totalionenchromatogramms aus den Plazenten der Früchte.

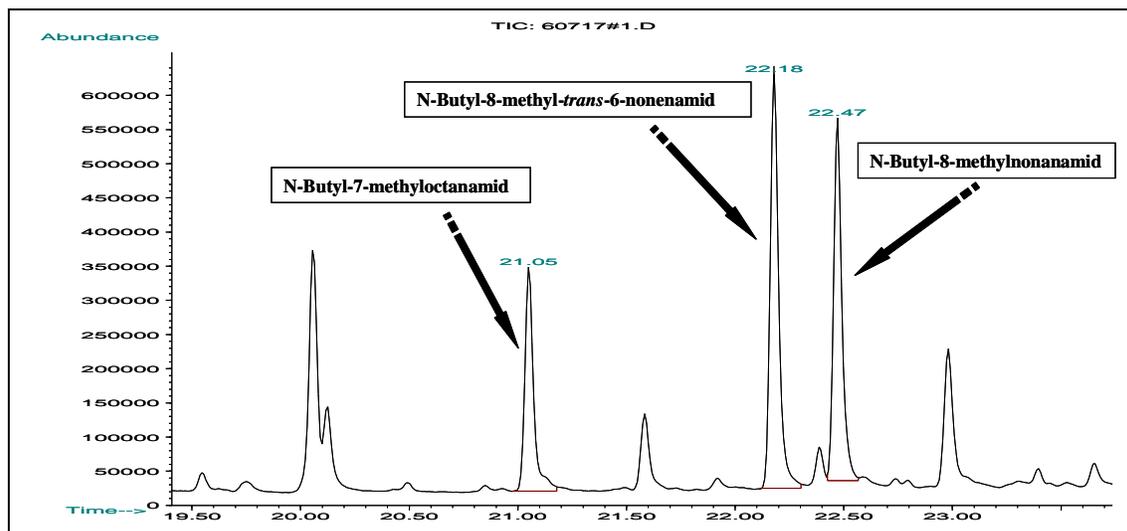


Abbildung 4-38 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: SIM-Chromatogramm, Aufzeichnung der Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$  (als Summe) zur empfindlichen Messung der *N*-Butylamide.

Drei Peaks (Retentionszeiten 21.05 min, 22,17 min und 22,47 min), entsprechen den gesuchten Verbindungen *N*-Butyl-7-methyloctanamid, *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid und *N*-Butyl-8-methylnonanamid, entstanden aus den Acyl-Thioestern. Um die Sensitivität der Detektion zu steigern wurden in einem SIM-Lauf (Abbildung 4-38) nur die Summe der Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$  detektiert. An der Intensitätsskala (Abundance) lässt sich ablesen, dass das detektierte Signal zu jeder Verbindung im Vergleich zum TIC um den Faktor 60 intensiver ist. Die Differenzen in den Retentionszeiten im Vergleich zu Tabelle 4-3 lassen sich durch ein zu diesem Zeitpunkt noch verwendetes, unterschiedliches Temperaturprogramm bei der Gaschromatographie erklären.

Das Chromatogramm (Abbildung 4-39) zeigt den Reagenzienblindwert, der am Tag der Messung mitgeführt wurde. Dort sind wie auch im Perikarp (Abbildung 4-40) keine Thioester zu finden.

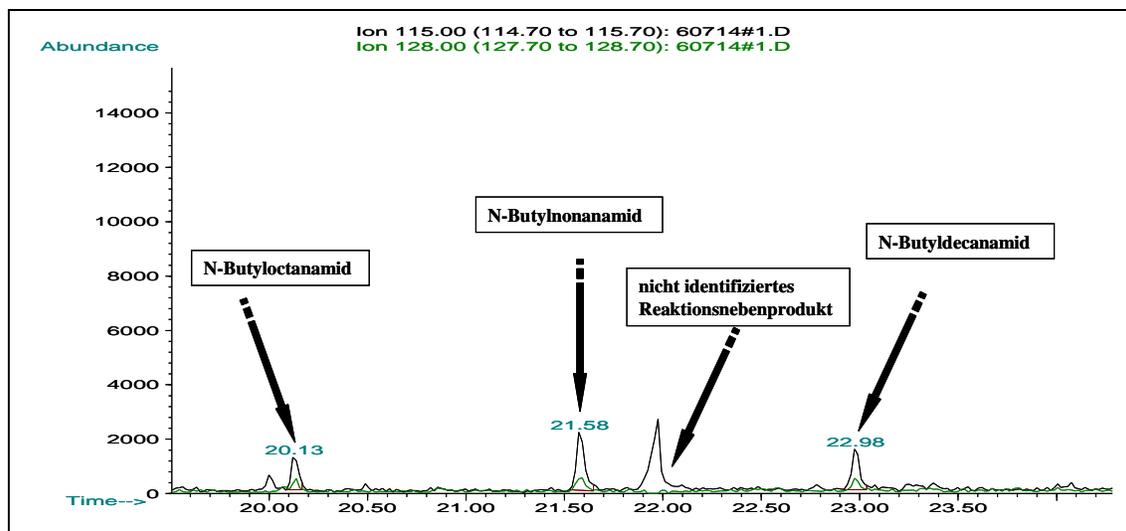


Abbildung 4-39 Reagenzien-Blindwert: Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$  des Totalionen-chromatogramms

Im Chromatogramm (Abbildung 4-40) der aufgearbeiteten Fruchtwände (Perikarp) der Chili-Früchte erkennt man, im Vergleich zum Blindwert, dass die Peakfläche der Verbindung bei einer Retentionszeit von 22,98 min zunimmt. Dieser Peak ist dem *N*-Butyldecanamid zuzuordnen. Demnach könnte der Ursprung dieses Signals eine Fettsäurevorstufe mit einem aliphatischen Rest mit 10 C-Atomen sein, wobei aber beachtet werden muss, dass diese Verbindung auch im Reagenzienblindwert vorhanden ist.

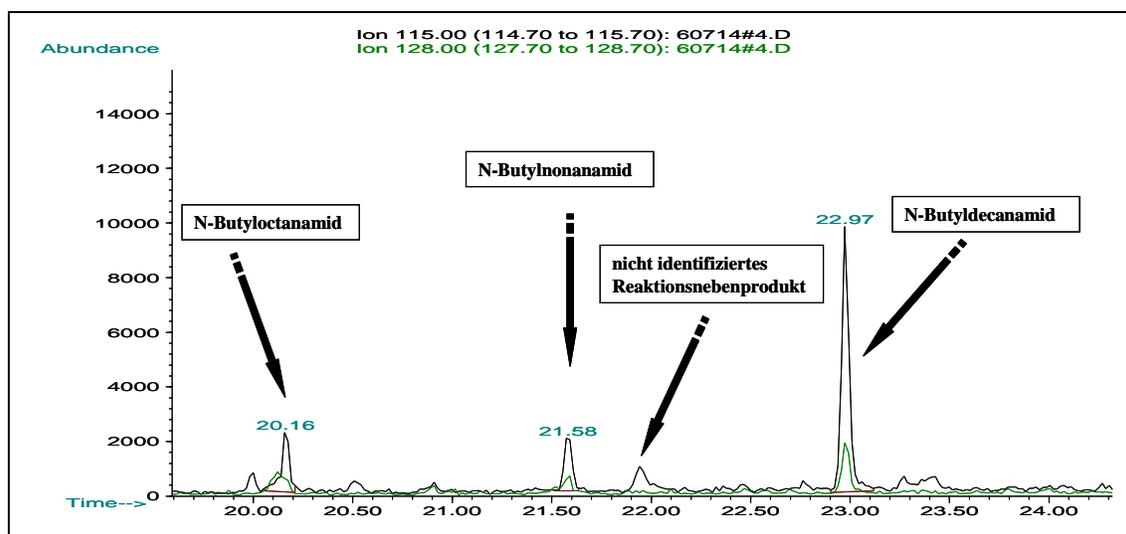
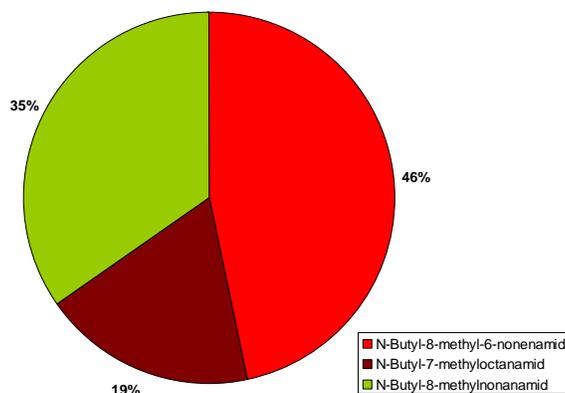


Abbildung 4-40 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$  des Totalionen-chromatogramms des Perikarps der Früchte.

Unter Berücksichtigung der Responsefaktoren (4.1.3.1) lässt sich aus den Flächenwerten der *N*-Butylamide die prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als Summe ermitteln.

**Tabelle 4-24** Prozentuale Verteilung der *N*-Butylamide in Plazenten aus Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*) als Indikatoren für Precursoren (Acyl-Thioester) der Capsaicinoide.

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
21,1	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	10071955	0,647	19
22,2	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	16339062	1,000	47
22,5	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	16827641	0,720	35



**Abbildung 4-41** *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der Acyl-Thioester

Fazit: Resultierend aus der Elution beider Thioesterfraktionen gemeinsam zeigt sich als Ergebnis ein relativ hoher Anteil der Vorstufen von NDC und DC im Vergleich zu *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*. Die Ergebnisse beziehen sich auf das momentane Entwicklungsstadium der Früchte, auf das Alter der Pflanzen und die zu dieser Jahreszeit (Monat Juli) gegebenen Lichtverhältnisse. Der Gehalt an Capsaicinoiden und deren Muster im Zentrifugationsrückstands wurde nicht untersucht.

Bei Früchten vergleichbaren Reifestadiums (51,5 g Frischgewicht; 10,5 g Plazenten; Reifestadium: Farbwechsel von grün nach rot), die nach der Ernte 2 Tage im Kühlschrank (5 °C) gelagert wurden, konnten keine Acyl-Thioester mehr nachgewiesen werden.

#### 4.4.2.2 Getrennte Messung von Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als *N*-Butylamide in unreifen Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*) mit gestufter Elution

Für diese Messung wurden unreife, grüne Früchte (Fruchtalter bis ca. 40 d) von verschiedenen, aber gleich alten Pflanzen (6 Monate) geerntet. Insgesamt wurde aus ca. 35 Früchten 38 g Plazenta-Gewebe (inkl. Samen und Scheidewänden) präpariert. Zur Elution der Thioester wurde zunächst der Eluent mit 0,15 M LiCl für die Acyl-CoA-Fraktion verwendet. Nach einem Zwischenwaschschritt mit MES-Puffer wurde eine weitere Thioesterfraktion (Acyl-ACP's) mit 0,5 M LiCl Eluenten erhalten.

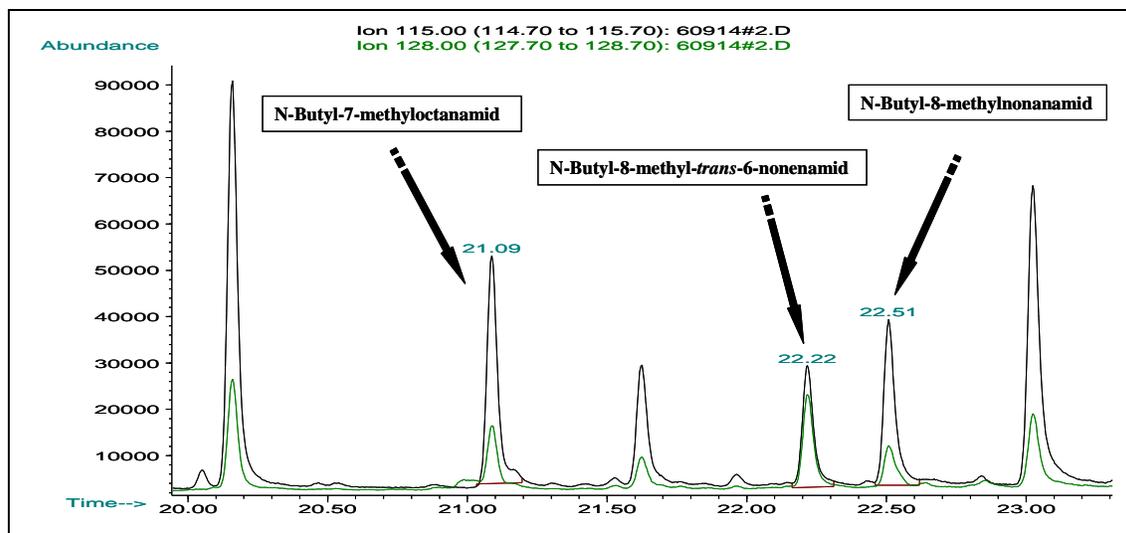


Abbildung 4-42 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Aufarbeitung der Plazenten-Matrix aus grünen, unreifen Früchten, Elution der Acyl-CoA-Fraktion mit 0,15 M LiCl

Im Chromatogramm zur Messung der Plazenta-Probe (0,15 M LiCl. Abbildung 4-48) erkennt man die drei *N*-Butylamide, welche aus den Acyl-Thioestern-Vorstufen der 3 Hauptcapsaicinoide während der Derivatisierung gebildet werden. Unter Berücksichtigung der Responsefaktoren (4.1.3.1) wurde aus den Flächewerten die prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's ermittelt.

Tabelle 4-25 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's in Plazenten aus grünen Chili-Früchten (eluiert mit 0,15 M LiCl).

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
21,1	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	1915054	0,647	36
22,2	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	1300948	1,000	38
22,5	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	1224650	0,720	26

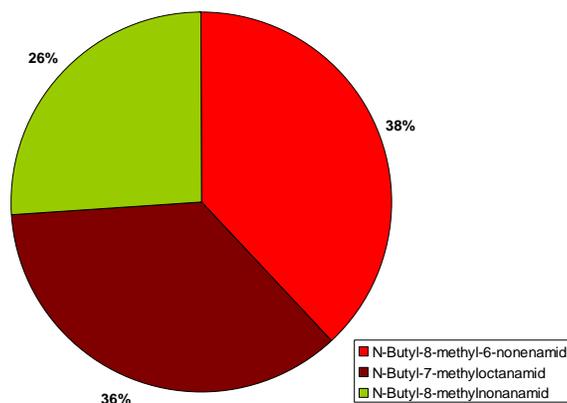


Abbildung 4-43 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's in unreifen Chili-Früchten.

Die Acyl-CoA-Verteilung weicht im Vergleich zu der Messung des Verteilungsmusters der gemeinsam eluierten Thioester, die mit Früchten derselben Pflanzen-Kohorte (2 Monate

früher geerntet) stattfand, deutlich ab. Die drei Acyl-CoA's, welche die Precursor der 3 Hauptcapsaicinoide darstellen, sind hier jeweils zu einem Drittel vertreten. Zuvor war der Anteil von *N*-Butyl-7-methyloctansäure-CoA/-ACP zugunsten von *N*-Butyl-8-methyl-6-nonensäure-CoA/-ACP erniedrigt.

Dementsprechend müsste die Acyl-ACP-Fraktion im Vergleich zur Acyl-CoA-Fraktion unterschiedlich zusammengesetzt sein. Die Abbildung 4-44 zeigt einen Chromatogramm-Ausschnitt zur Untersuchung der Acyl-ACP-Fraktion.

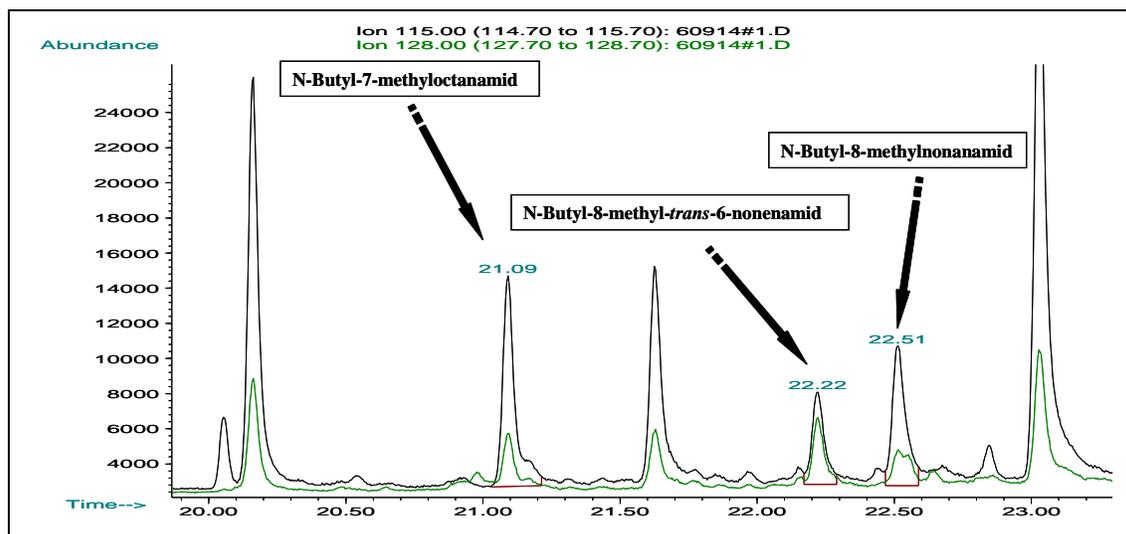
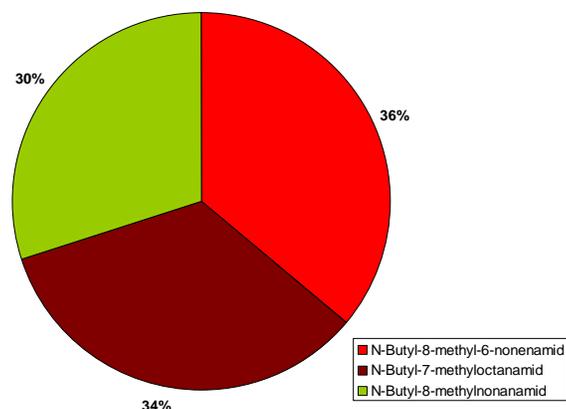


Abbildung 4-44 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Chromatogramm zur Aufarbeitung der Plazenten aus grünen, unreifen Früchten, Elution der Acyl-ACP-Fraktion mit 0,5 M LiCl

Das Chromatogramm (Abbildung 4-49) der 2. Fraktion zeigt ebenfalls das zuvor gefundene Verteilungsmuster: Die drei Vorstufen (hier Acyl-ACP's) liegen jeweils zu einem Drittel in dieser Fraktion vor.

Tabelle 4-26 Prozentuale Verteilung der *N*-Butylamide in Plazenten aus grünen Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*) als Indikatoren für Precursoren (hier Acyl-ACP's) der Capsaicinoide in der ersten Fraktion (eluiert mit 0,5 M LiCl).

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
18,9	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	417942	0,647	34
20,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	282090	1,000	36
20,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	334603	0,720	30



**Abbildung 4-45** *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der Acyl-ACP's als *N*-Butylamide in unreifen Chili-Früchten.

Fazit: Zu diesem Zeitpunkt (Alter der Pflanzen 6 Monate, Erntemonat September) ist in den Früchten dieser Varietät, das Verhältnis der drei Thioester in ihrer jeweiligen Fraktion ausgeglichen. Es ist jedoch nicht zu überprüfen, welcher Teil der Acyl-CoA's bei der Aufarbeitung jeweils verworfen wird, was einen Vergleich der Werte mit der Thioester-Pools schwierig macht. Es ist denkbar, dass unreproduzierbar ein Teil des Acyl-CoA-Pools im ersten Schritt der Aufarbeitung verworfen wird.

Der Zentrifugationsrückstand wurde nicht auf die Capsaicinoid-Verteilung hin untersucht.

#### 4.4.2.3 Messung von Acyl-CoA's als *N*-Butylamide in unreifen Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*)

Für diese Messung wurden 44 unreife, grüne Früchte (Fruchtalter bis ca. 40 d) von verschiedenen, aber gleich alten Pflanzen (etwa 10 Monate) geerntet. Das Gesamtgewicht der 44 Früchte lag bei 197,2 g, wovon 48,5 g auf Plazenta-Gewebe (inkl. Samen und Scheidewänden) und 148,7 g auf das Perikarp entfielen. Zur Untersuchung wurden gleiche Einwaagen (je 48,5 g) von Plazenta und Perikarp eingesetzt. Zur Elution der Thioester wurde der Eluent mit 0,15 M LiCl verwendet. Des Weiteren wurde zur Kontrolle der Aufarbeitung ein Reagenzienblindwert mitgeführt. Der Zentrifugationsrückstand (Pflanzenmatrix) wurde zur Untersuchung auf Capsaicinoide verwendet.

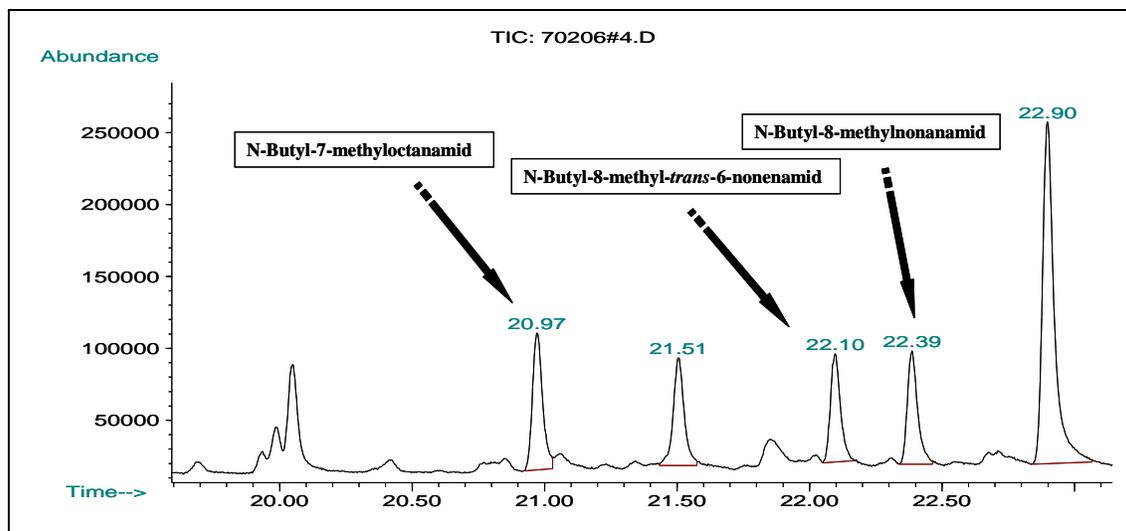


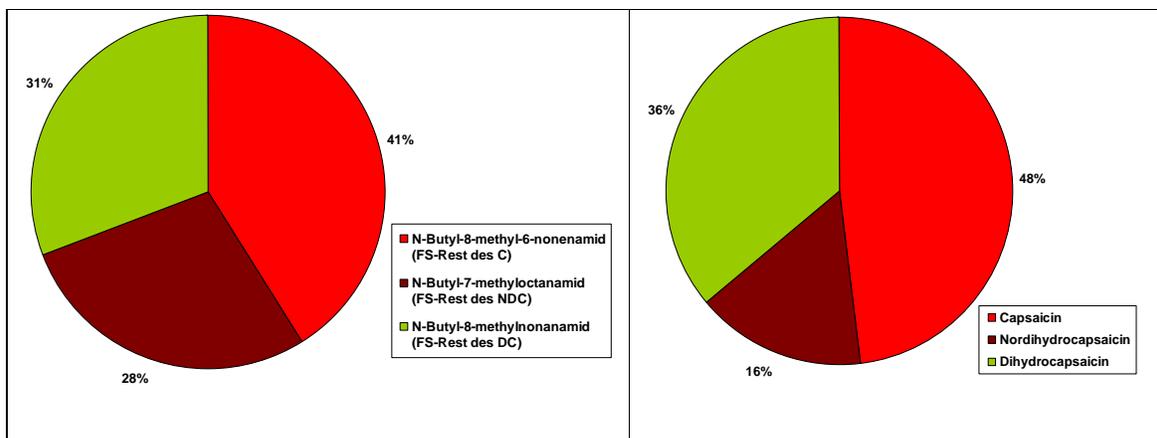
Abbildung 4-46 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Chromatogramm-Ausschnitt der Messung der Plazenta-Probe: SIM-Modus (Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$ )

Im Chromatogramm zur Messung der Plazenta-Probe (Abbildung 4-46) erkennt man wieder die drei *N*-Butylamide, welche aus den Acyl-Thioestern-Vorstufen der 3 Hauptcapsaicinoide während der Derivatisierung gebildet werden und einige gleich große Peaks, welche als Reaktionsnebenprodukte entstehen. So ist z.B. ein großer Peak von *N*-Butyldecanamid ( $t_R = 22,9$  min) im Chromatogramm zu sehen. Unter Berücksichtigung der Responsefaktoren lässt sich aus den Flächewerten die prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's ermitteln.

Tabelle 4-27 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Prozentuale Verteilung der *N*-Butylamide in Plazenten aus grünen Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*) als Indikatoren für Precursoren (Thioester) der Capsaicinoide.

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
21,0	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	2275318	0,647	28
22,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	2132828	1,000	41
22,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	2219313	0,720	31

Die Daten zur prozentualen Verteilung der Acyl-CoA's werden den Ergebnissen aus der Untersuchung des Pflanzenmatrix-Zentrifugationsrückstandes gegenübergestellt. Es enthält den Hauptteil der zu diesem Zeitpunkt bereits gebildeten Capsaicinoide, da durch das dreimalige Homogenisieren und Zentrifugieren mit eiskalter, wässriger Lösung (Trichloressigsäure bzw. MOPS-Puffer) nur geringe Mengen an Capsaicinoiden gelöst werden.



**Abbildung 4-47** *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: links: Prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's als N-Butylamide in 44 unreifen Chili-Früchten. rechts: Prozentuale Verteilung der 3 Hauptcapsaicinoide Capsaicin (C), Nordihydrocapsaicin (NDC) und Dihydrocapsaicin (DC) aus dem Zentrifugationsrückstand (Plazenten-Matrix).

Beim Vergleich der beiden Kreisdiagramme (Abbildung 4-47) fällt auf, dass bei den Capsaicinoiden der Anteil an NDC geringer und der Anteil an C höher im Vergleich zu den entsprechenden Vorstufen ist, Capsaicin ist eindeutig das Hauptcapsaicinoid. Die Früchte wurden im Februar geerntet und untersucht.

#### 4.4.2.4 Messung von Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als N-Butylamide in unreifen Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*) nach gestufter Elution

Für diese Messung wurden 25 unreife, grüne Früchte (Fruchtalter bis ca. 40 d) von verschiedenen, aber gleich alten Pflanzen (13 Monate) geerntet. Der Median des Fruchtgewichts lag bei 3,78 g/Frucht. Das Gesamtgewicht der 25 Früchte lag bei 97,9 g, wovon 18,0 g auf Plazenta-Gewebe (inkl. Samen und Scheidewänden) und 79,9 g auf das Perikarp entfielen. Zur Untersuchung wurden vergleichbare Einwaagen von Plazenta (18,0 g) und Perikarp (20,0 g) eingesetzt. Zur Elution der Thioester wurde zunächst der Eluent mit 0,15 M LiCl für die erste Fraktion verwendet. Nach einem Zwischenwaschschritt mit MES-Puffer wurde eine weitere Thioester-Fraktion mit 0,5 M LiCl Eluenten erhalten. Der Zentrifugationsrückstand (Pflanzenmatrix) wurde zur Untersuchung auf Capsaicinoide verwendet.

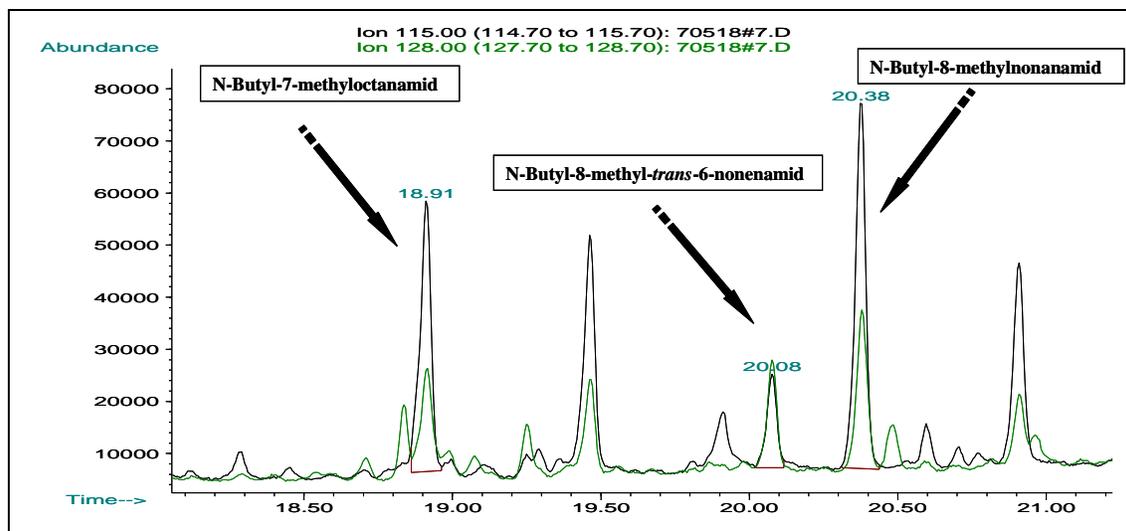


Abbildung 4-48 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Chromatogramm zur Aufarbeitung der Plazenten aus grünen, unreifen Früchten, Elution der Acyl-CoA-Fraktion mit 0,15 M LiCl.

Im Chromatogramm zur Messung der Plazenta-Probe (0,15 M LiCl, Abbildung 4-48) erkennt man die drei *N*-Butylamide, welche aus den Acyl-Thioestern-Vorstufen der 3 Hauptcapsaicinoide während der Derivatisierung gebildet werden. Unter Berücksichtigung der Responsefaktoren (4.1.3.1) wurde aus den Flächenwerten die prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's ermittelt.

Tabelle 4-28 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der Acyl-CoA's in Plazenten aus grünen Chili-Früchten (eluiert mit 0,15 M LiCl).

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
18,9	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	1744128	0,647	29
20,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	964280	1,000	25
20,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	2547590	0,720	46

Die Acyl-CoA-Verteilung hat sich im Vergleich zu den Messungen, die 4-6 Monate früher mit Früchten derselben Pflanzen-Kohorte stattfanden, stark verändert. Den größten Anteil bei den Precursoren und bei den Capsaicinoiden nimmt das 8-Methyloctanoyl-CoA bzw. das Dihydrocapsaicin ein. Dies entspricht nicht den Erwartungen, da die Messung des Capsaicinoidmusters reifer Einzelfrüchte (n = 92, Alter der Pflanzen ca. 10 Monate, Abbildung 4-57) ein anderes Bild zeigte.

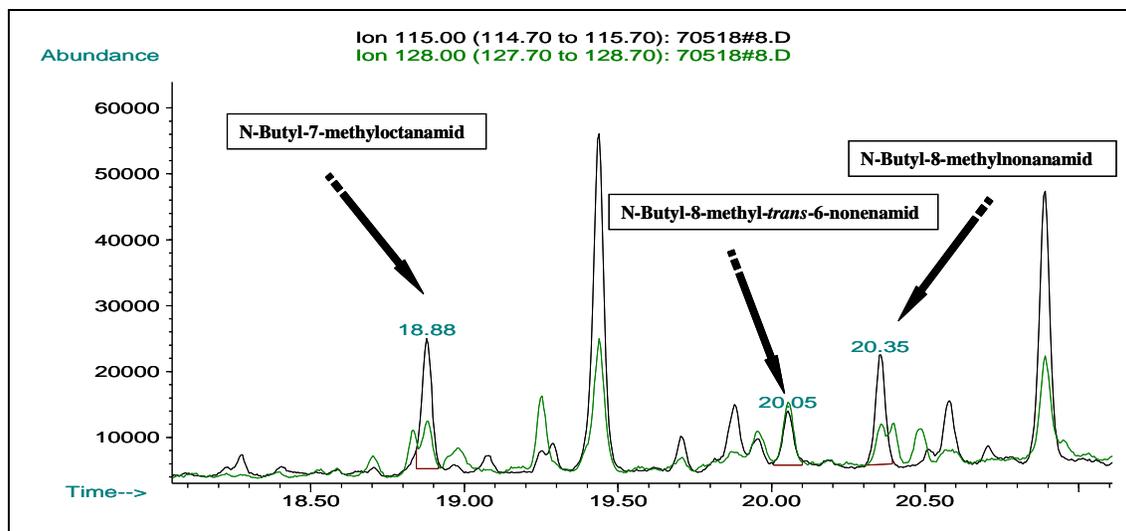


Abbildung 4-49 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Chromatogramm zur Aufarbeitung der Plazenten aus grünen, unreifen Früchten, Elution der Acyl-ACP-Fraktion mit 0,5 M LiCl.

Das Chromatogramm (Abbildung 4-49) der 2. Fraktion zeigt ebenfalls ein unerwartetes Ergebnis: Die drei Vorstufen (hier Acyl-ACP's) liegen jeweils zu einem Drittel in dieser Fraktion vor.

Tabelle 4-29 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der Acyl-ACP's in Plazenten aus grünen Chili-Früchten (Elution mit 0,5 M LiCl).

Retentionszeit [min]	Verbindung	Indikator für Vorstufen des	Peakfläche	Responsefaktor	Prozentuale Verteilung
18,9	<i>N</i> -Butyl-7-methyloctanamid	NDC	626226	0,647	34
20,1	<i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid	C	415196	1,000	35
20,4	<i>N</i> -Butyl-8-methylnonanamid	DC	507290	0,720	31

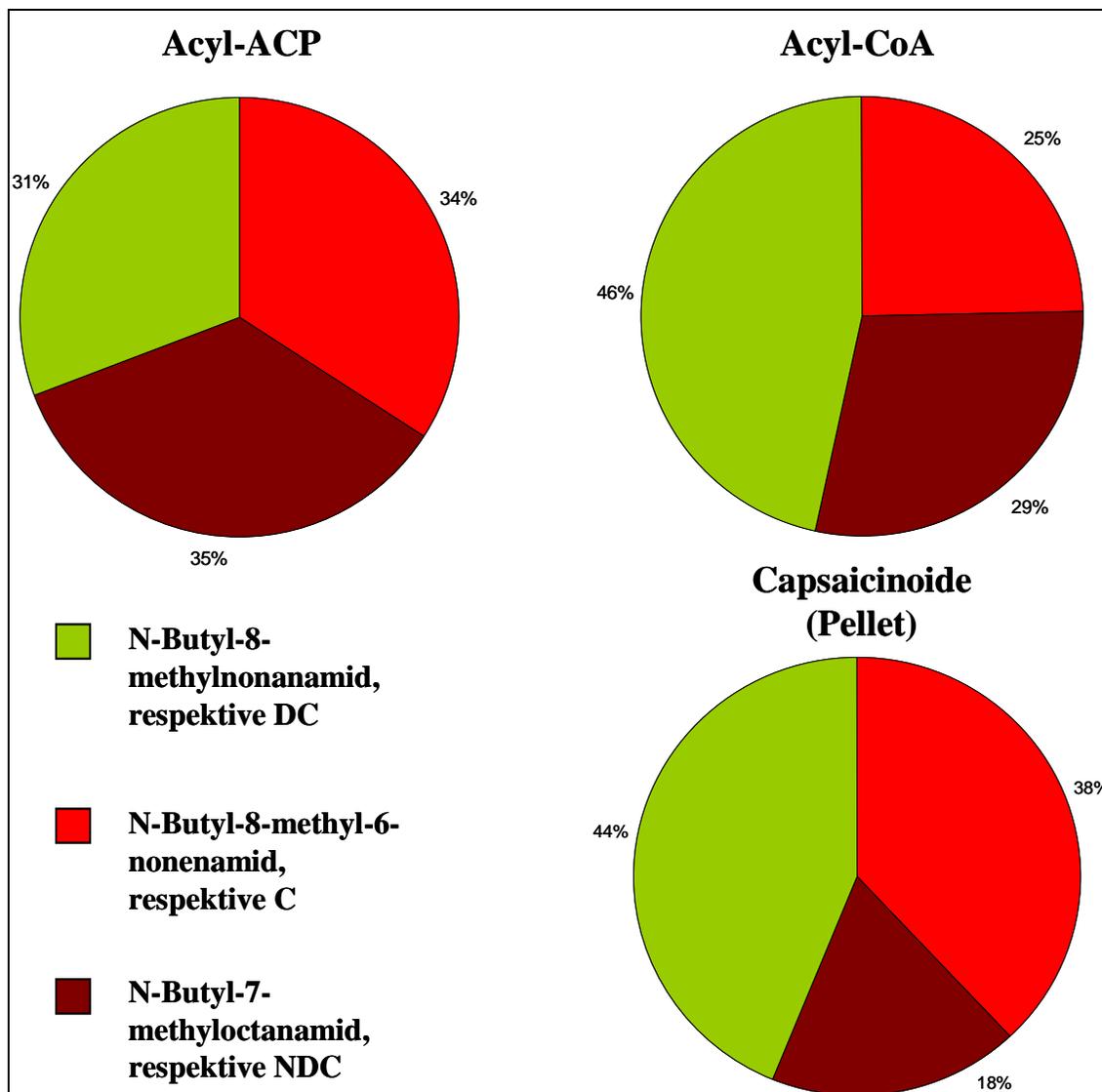


Abbildung 4-50 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der Fettsäure-Reste in beiden Acyl-Thioester-Fractionen (Acyl-ACP's und Acyl-CoA's) und in den bereits gebildeten Capsaicinoiden im Zentrifugationsrückstand (Plazenten-Matrix).

Die Zusammensetzung des Acyl-ACP-Pools entspricht exakt der ermittelten Verteilung unter 4.4.2.2 in Abbildung 4-45 und die drei Thioester finden sich zu je einem Drittel in den Früchten wieder. In Jalapeno-Früchten wurde einmal die Summe aus Acyl-CoA's und Acyl-ACP's (Abbildung 4-41) bestimmt und die Verteilung zeigte weniger NDC- und mehr C-Vorstufen im Vergleich zum Acyl-ACP-Pool. Dieses Verteilungsmuster ähnelt wiederum den Bestimmungen des Acyl-CoA-Pools (Abbildung 4-47 und Abbildung 4-50).

Zur Kontrolle wurde auch das Perikarp als auf Acyl-Thioester untersucht. Da die Bildung der Capsaicinoide in den Epidermiszellen der Plazenten stattfindet, sind diese Messungen unter anderem als Matrixblindwerte anzusehen.

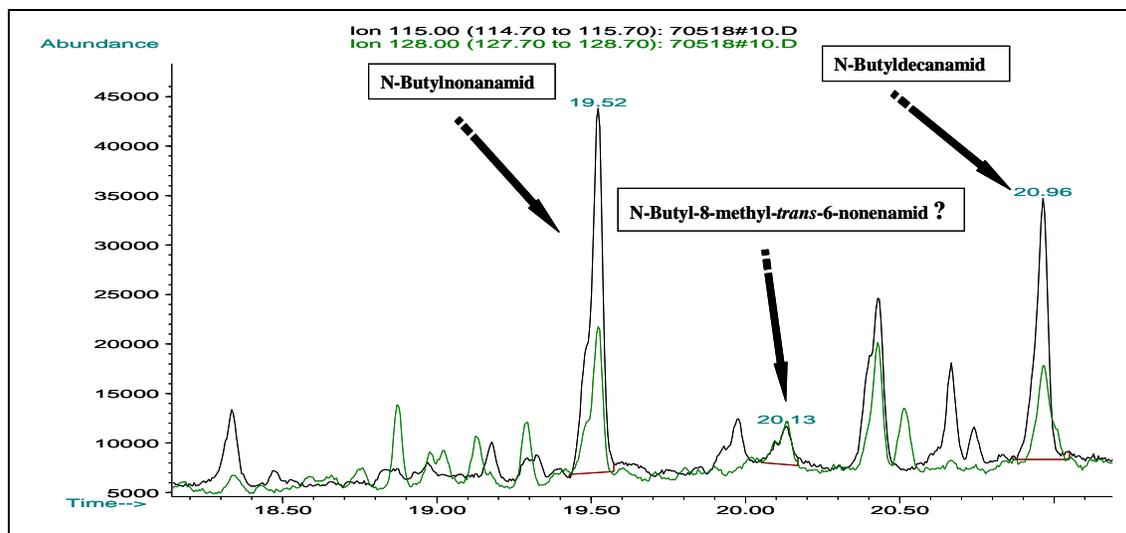


Abbildung 4-51 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Matrixblindwert, Chromatogramm zur Aufarbeitung des Perikarps von grünen, unreifen Früchten, Elution mit 0,15 M LiCl.

Im Vergleich zu den beiden Chromatogrammen zur Aufarbeitung der Plazenten kann man hier keine Peaks eindeutig den Acyl-Thioestern zuordnen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass kleine Mengen an Acyl-Thioester mit den Fettsäureresten der 3 Hauptcapsaicinoide in den Perikarp-Aufarbeitungen vorhanden sind, denn eine Trennung der verschiedenen Gewebearten nach dem visuellen Sinneseindruck ist nicht einfach. Deshalb kann bei der Trennung von Plazenta und Perikarp mittels Skalpell keine vollständige Separation gewährleistet werden.

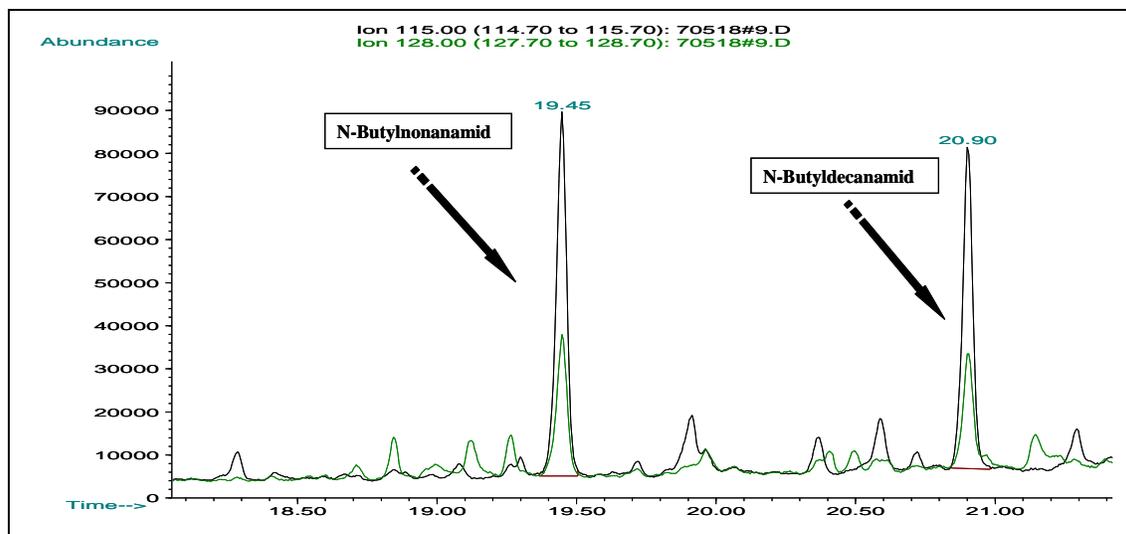


Abbildung 4-52 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Matrixblindwert, Chromatogramm zur Aufarbeitung des Perikarps von grünen, unreifen Früchten, Elution mit 0,5 M LiCl.

Fazit: Zu diesem Zeitpunkt (Erntemonat Mai) findet sich in den Früchten dieser Varietät, ohne dass es einen Anhaltspunkt für die Ursache gibt das Dihydrocapsaicin als Hauptcapsaicinoid. In der Fraktion der Acyl-ACP's zeigt sich im Vergleich zum CoA-Pool ein deutlich höherer Anteil an Thioestern mit ungesättigtem Fettsäurerest.

#### 4.4.2.5 Messung von Acyl-CoA's und Acyl-ACP's als *N*-Butylamide in vollreifen Chili-Früchten (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*)

Für diese Messung wurden ausschließlich vollreife, rote Früchte (älter als 45 d) von verschiedenen, aber gleich alten Pflanzen (6 Monate) geerntet. Insgesamt wurden 28 g Plazenta-Gewebe zur Untersuchung eingesetzt. Die Elution der Thioester erfolgte in einem Schritt mit einer LiCl-Konzentration von 0,5 M.

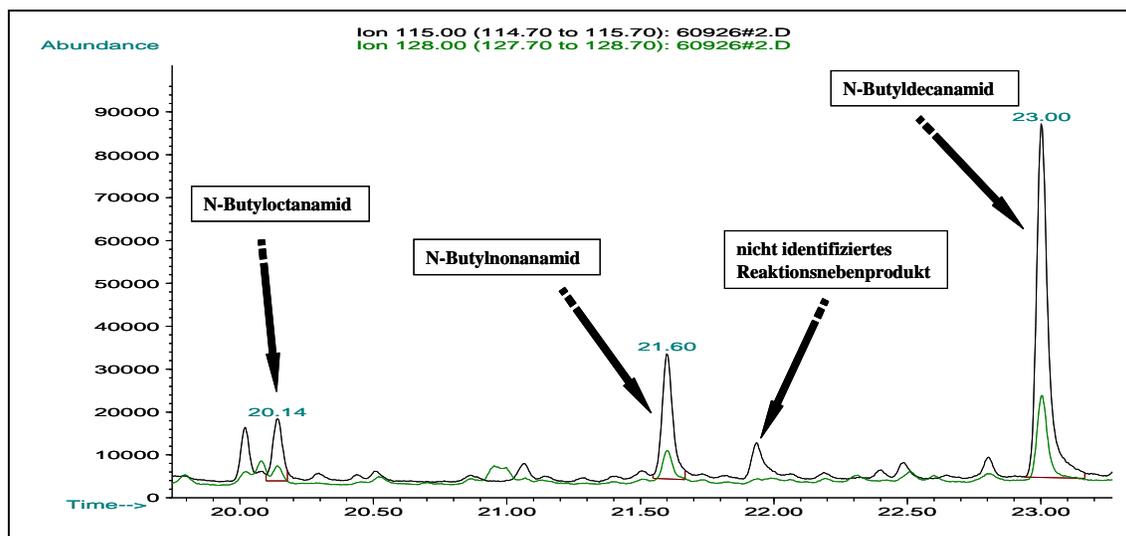


Abbildung 4-53 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung von Thioestern in Plazenten von reifen Chili-Früchten. SIM-Modus, Darstellung der Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$ .

Im Chromatogramm (Abbildung 4-53) erkennt man, dass außer dem *N*-Butyldecanamid bei einer Retentionszeit von 23 min und einem Reaktionsnebenprodukt der Derivatisierung (21,6 min) keines der gesuchten *N*-Butylamide zu detektieren ist. Zum Vergleich zeigt Abbildung 4-54 das Chromatogramm des Reagenzienblindwertes.

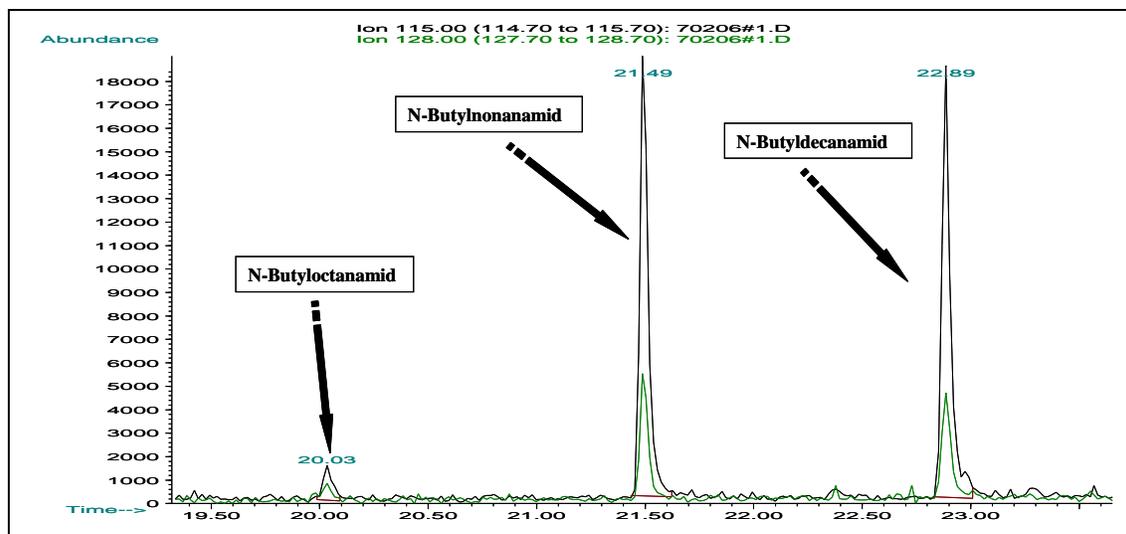


Abbildung 4-54 Reagenzien-Blindwert: Chromatogramm-Ausschnitt, Messung im SIM-Modus, Darstellung der Massenspuren  $m/z = 115$  und  $m/z = 128$ .

In reifen Chili-Früchten von *Capsicum annuum* var. *Jalapeno* sind keine Thioester als *N*-Butylamide nachweisbar.

#### 4.4.2.6 Untersuchung von Einzelfrüchten auf die 3 Hauptcapsaicinoide mittels

##### HPLC/Fluoreszenz in *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

Die verwendeten Pflanzen ( $n = 19$ ) dieser Varietät wurden über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr zur Gewinnung von definiertem Pflanzenmaterial genutzt. So war es möglich von den selben Pflanzen, bei denen die Thioesterbestimmung erstmals gelang (4.4.2.1), auch Untersuchungen zum Capsaicinoidgehalt vorzunehmen. Um die Heterogenität bei der Verteilung der Scharfstoffgehalte einer Pflanze (Hiepler et al. (159)) zu berücksichtigen, wurde eine große Anzahl von reifen Einzelfrüchten ( $n = 92$ ) untersucht. Dies war für Capsaicinoide möglich, da deren Gehalt um einige Zehnerpotenzen höher liegt, als der Gehalt der Thioester. Die Gesamt-Capsaicinoidgehalte der Einzelfrüchte liegen im Bereich von  $100 \mu\text{g}/\text{Frucht}$  bis zu  $6000 \mu\text{g}/\text{Frucht}$ . Ein ebenfalls breites Intervall findet man bei der Betrachtung der Capsaicinoidgehalte einzelner Früchte einer Pflanze. Die Scharfstoff-Gehalte pro Frucht bewegen sich z. B. bei Pflanze Nr. 4 in Abbildung 4-55 im Bereich von  $100 \mu\text{g}$  bis  $3000 \mu\text{g}$ .

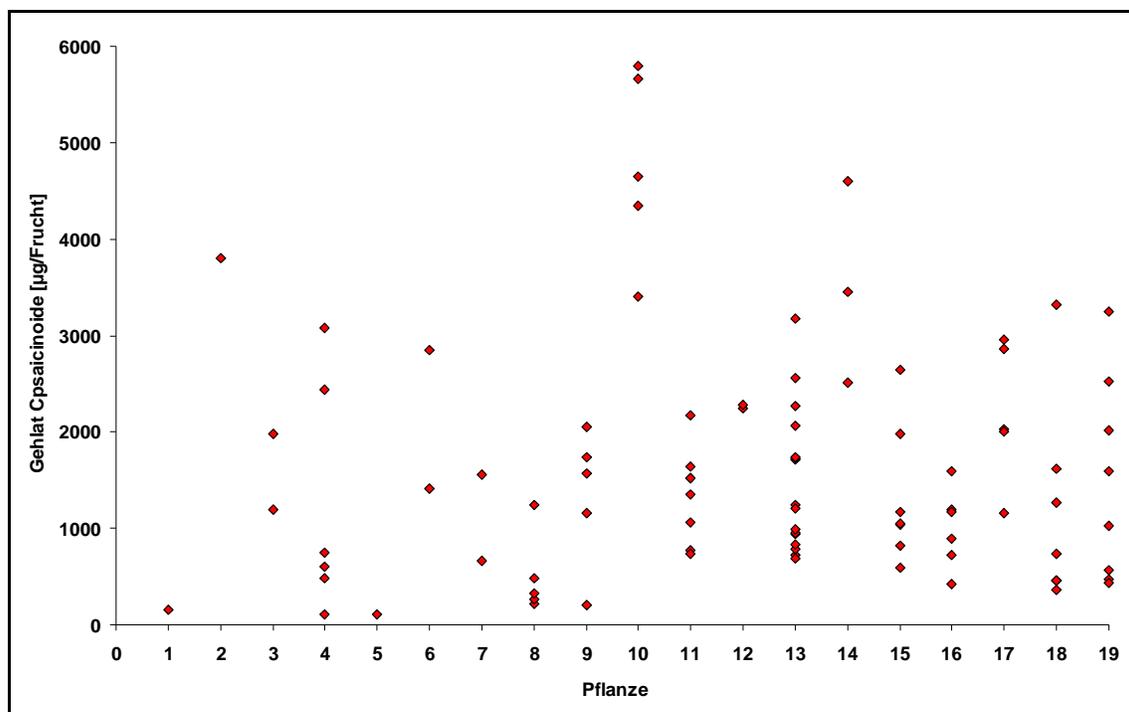


Abbildung 4-55 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Darstellung der Heterogenität im Gesamt-capsaicinoidgehalt aus 92 Einzelfrüchten von 19 Pflanzen.

Da die Capsaicinoidgehalte nicht normalverteilt sind (siehe Abbildung 4-55), wird zur Visualisierung in Abbildung 4-57 der Median der prozentualen Anteile der Capsaicinoide am Gesamt-Capsaicinoidgehalt aufgetragen.

Es wird kein konstantes Verteilungsmuster der Capsaicinoide beobachtet. Mit einer großen Anzahl von Einzelproben lässt sich jedoch eine Aussage über die mittlere Verteilung der drei Hauptcapsaicinoide treffen.

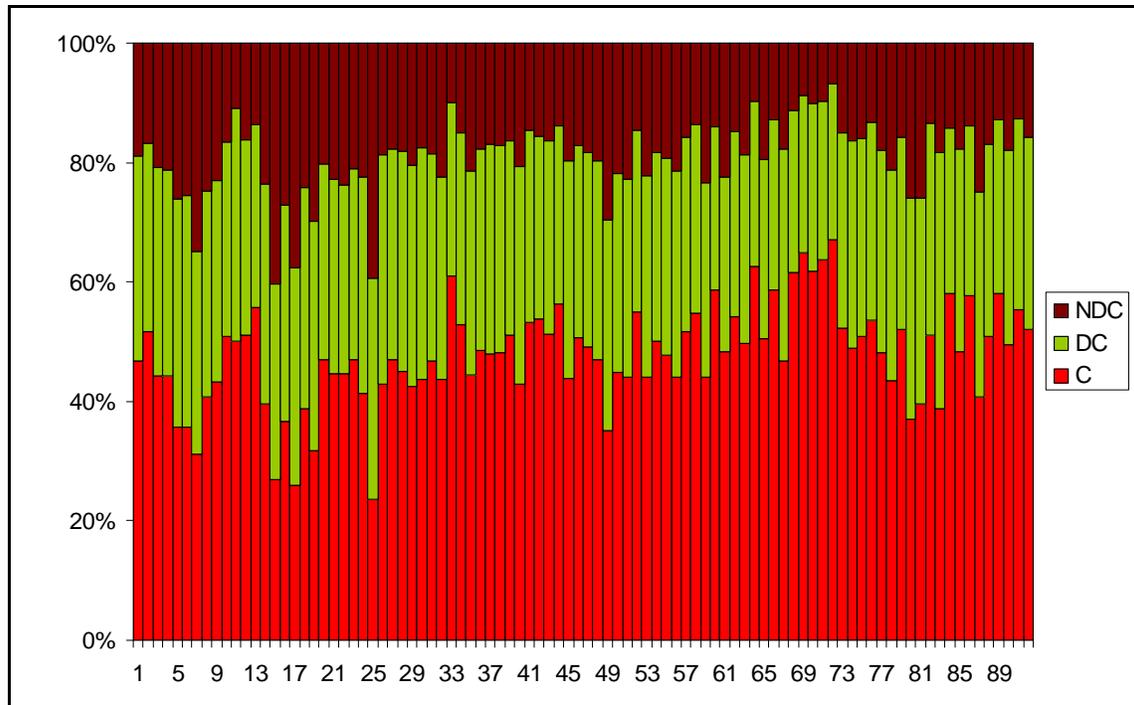


Abbildung 4-56 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Capsaicinoidmuster der 3 Hauptcapsaicinoide von 92 reifen Einzelfrüchten.

Zur Orientierung sind in Tabelle 4-30 die Quantile bei 10 % und 90 % angegeben.

Tabelle 4-30 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Capsaicinoidmuster der 3 Hauptcapsaicinoide in reifen Früchten (n = 92).

	NDC [%]	C [%]	DC [%]
<b>Median</b>	<b>18</b>	<b>48</b>	<b>33</b>
Quantil 10 %	13	37	29
Quantil 90 %	26	58	37

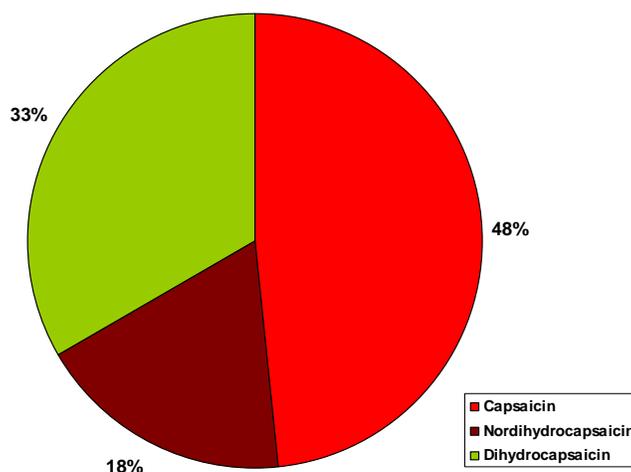


Abbildung 4-57 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der 3 Hauptcapsaicinoide (Median, n=92 Einzelfrüchte) in reifen Früchten.

Der Vergleich dieses Musters bei reifen Früchten mit dem Muster im Zentrifugationsrückstand aus 44 unreifen (bis 40 d alten) Früchten (Abbildung 4-47) zeigt

eine sehr gute Übereinstimmung. Das Alter der Pflanzen betrug 9 Monate und der Erntemonat war der Januar.

#### 4.4.2.7 Untersuchungen zur Fruchtentwicklung bei *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

Bei der Arbeit mit den Chili-Früchten fiel auf, dass sich die Plazenta unterschiedlich schnell im Vergleich zum Perikarp zu entwickeln schien. Dies sollte mit objektiven Daten belegt werden, weshalb drei Früchte einer Pflanze der Varietät *Jalapeno* (*Capsicum annuum*) unterschiedlichen Entwicklungsstadiums geerntet und vermessen und gewogen wurden.

**Tabelle 4-31 Dokumentation der Fruchtentwicklung Jalapeno: Es wurden 3 Früchte unterschiedlichen Alters einer Pflanze geerntet**

Frucht	Alter	Farbe	Samen	Gewicht	Gewicht Plazenta + Samen	Anteil Plazenta + Samen	Dicke des Perikarps
	[Tage]			[g]	[g]	[%]	[mm]
klein	ca. 20	grün	weich	1,403	0,25	18	1,6
mittel	41	grün	weich	5,332	0,902	17	2,9
groß	45-50	grün-rot	hart	11,467	1,475	13	3,5



**Abbildung 4-58 Fruchtentwicklung *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: links 3 Früchte unterschiedlicher Entwicklungsstadien, rechts Längsschnitt durch selbige Jalapeno-Früchte**

Um den Verlauf der Entwicklung der 3 Hauptcapsaicinoide während der Fruchtentwicklung auch bei jüngeren Früchten zu dokumentieren, wurden an vier verschiedenen Tagen jeweils ca. 75 bis 100 Blüten mit Baumwollbändchen markiert. Es zeigte sich, dass nur etwa 10 % der markierten Blüten auch eine Frucht hervorbrachten. Insgesamt konnten 38 markierte Früchte in 4 Altersgruppen zeitgleich geerntet und untersucht werden. Das Alter der Früchte wurde vom ersten Tag der Blüte bis zur Ernte der Frucht berechnet. Das Alter der Pflanzen betrug 10 Monate und der Erntemonat war der Februar.

**Tabelle 4-32 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Abhängigkeit des Capsaicinoidmusters von der Fruchtentwicklung (Gehalte als Median)**

Alter [d] Anzahl	Capsaicin [µg/Frucht]	Nordihydrocapsaicin [µg/Frucht]	Dihydrocapsaicin [µg/Frucht]	Gesamt-Capsaicin [µg/Frucht]
33; n = 11	810,5	242,1	627,2	1748,7
28; n = 11	574,3	154,8	383,2	1112,4
22; n = 8	136,4	66,1	139,4	337,1
18; n = 8	6,9	6,8	7,1	20,9

Da man nicht genau sagen kann, wann eine Blüte befruchtet wurde, täuscht die Angabe eines einzelnen Tages beim Fruchtalter eine nicht vorhandene Präzision vor. Zwischen den Altersgruppen gibt es jedoch dadurch keine Überschneidungen.

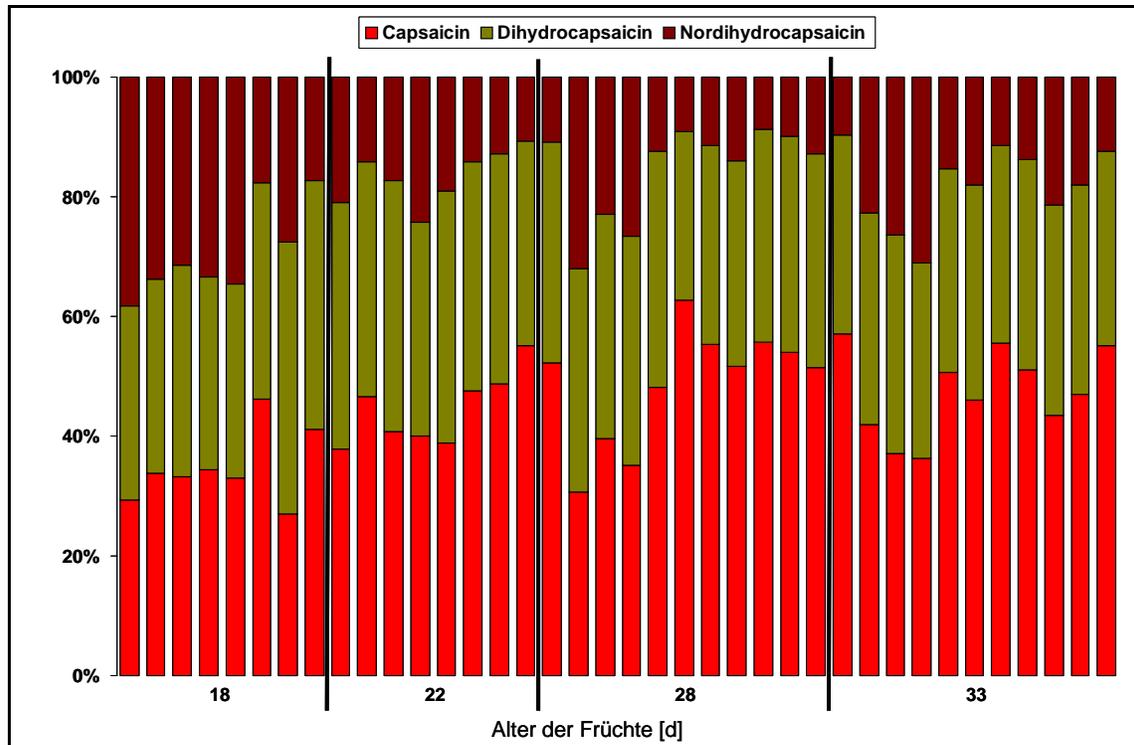


Abbildung 4-59 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Prozentuale Verteilung der 3 Hauptcapsaicinoide in 38 Einzelfrüchten (je n = 8 bzw. 11) unterschiedlicher Alterstufen (18, 22, 28 und 33 Tage)

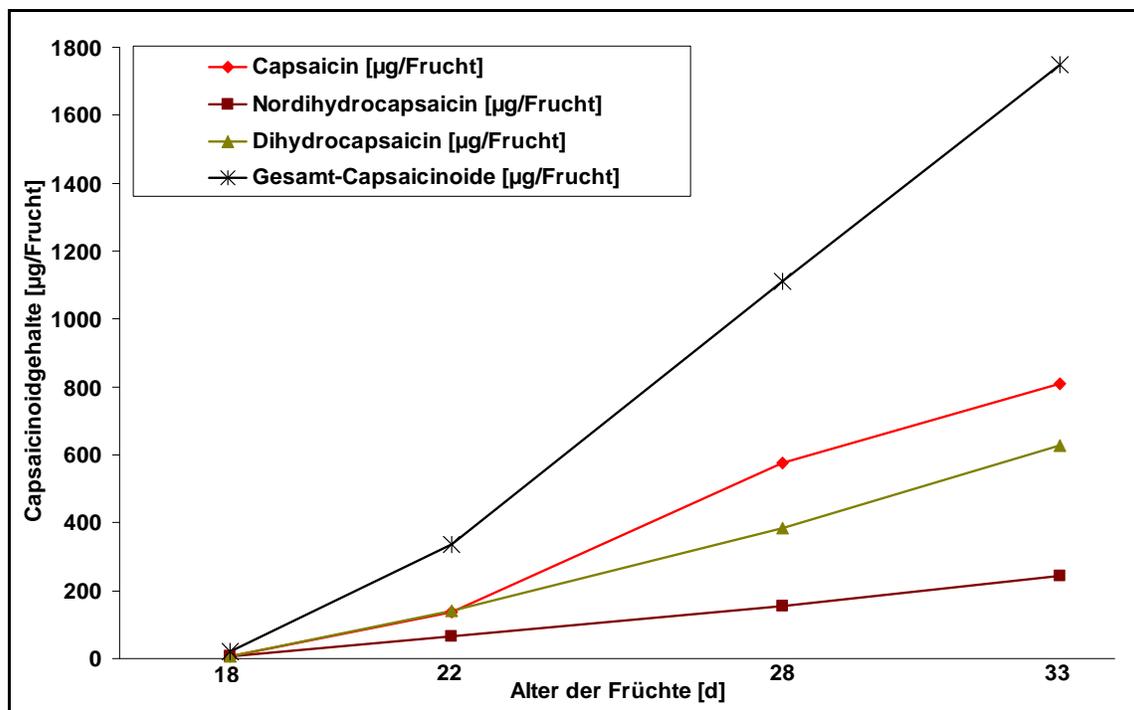


Abbildung 4-60 *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*: Entwicklung der Capsaicinoidgehalte in µg/Frucht in Abhängigkeit vom Alter der Früchte in Tagen nach Blüte.

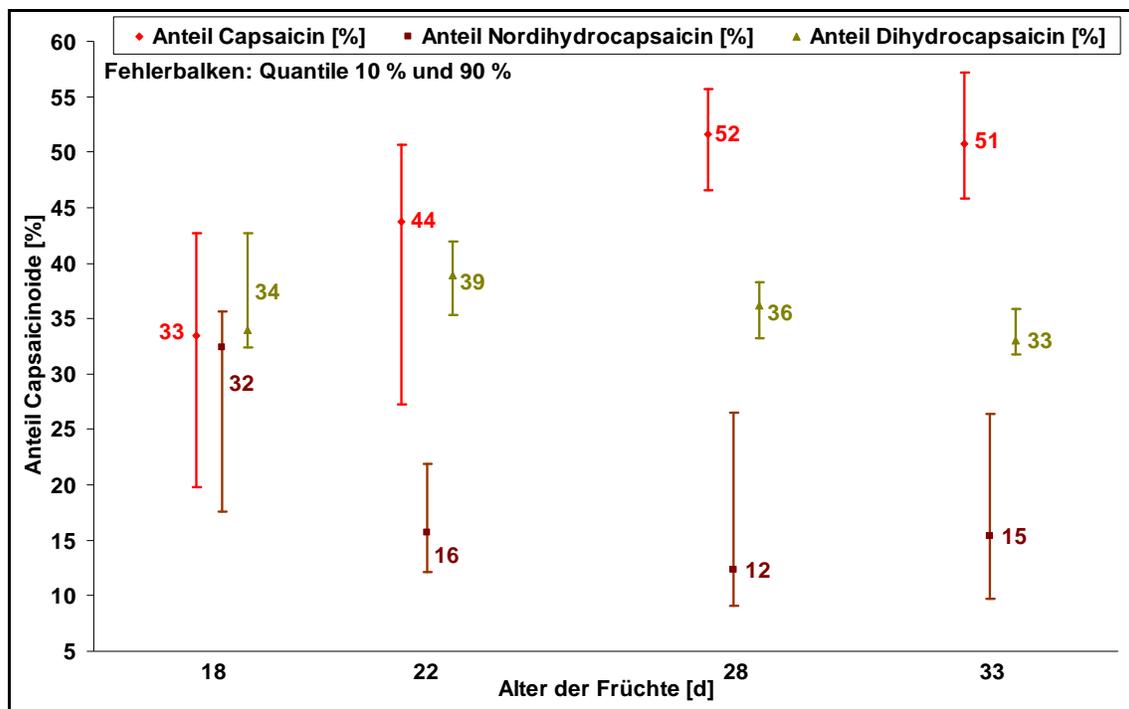


Abbildung 4-61 *Capsicum annuum* var. Jalapeno: Abbildung der prozentualen Anteile (Median und Quantile 10 % bzw. 90 %) der 3 Hauptcapsaicinoide zu vier verschiedenen Stadien der Fruchtentwicklung.

Das Muster der Capsaicinoide scheint nicht konstant zu sein. Zu Beginn der Fruchtentwicklung (18 d) ist das Verhältnis von C, DC und NDC ausgeglichen. Auf die 3 Capsaicinoide entfällt jeweils etwa ein Drittel der Gesamtscharfstoffe. Allerdings ist bei diesen niedrigen Gehalten die prozentuale analytische Unpräzision erhöht. Bei der Gruppe der ältesten Früchte (33 d) hat sich der Anteil von Dihydrocapsaicin im Rahmen der Einzelmesswert-Schwankungen nicht verändert. Der Capsaicin-Anteil liegt bei älteren Früchten höher (~ 50 %). Der Anteil von Nordihydrocapsaicin ist bei 18 Tage alten Früchten vergleichbar mit den Anteilen von C und DC. In den Gruppen  $\geq 28$  Tage stabilisiert sich der NDC-Anteil bei ~ 15 % und das Muster der Capsaicinoide ist im Rahmen der Schwankungen (Quantile 10 % und 90 %) ab diesem Zeitpunkt unverändert. Dieses Capsaicinoidmuster entspricht den gefundenen Verteilungsmustern aus den 92 reifen Einzelfrüchten (Abbildung 4-57) und aus dem Zentrifugationsrückstand der Untersuchung von 44 grünen Früchten (Abbildung 4-47). Zu Einzelfrüchten von 13 Monate alten Pflanzen wie bei der Thioesterbestimmung unter 4.4.2.4 liegen keine Ergebnisse vor.

#### 4.4.3 *Capsicum pubescens* var. *Yellow Tree Pepper Rocot*

*Capsicum*-Pflanzen der Varietät *Capsicum pubescens* stammen ursprünglich aus Höhenlagen (2000 bis 3000 m über dem Meeresspiegel) der Anden und besitzen i. d. R. ein von anderen Varietäten deutlich abweichendes Capsaicinoidmuster. Das Hauptcapsaicinoid ist in diesem Fall das Dihydrocapsaicin. Capsaicin ist das zweithäufigste Capsaicinoid bei *Capsicum pubescens* (164). Es wurden mehrfach Samen verschiedener *C. pubescens* Varietäten zur Kultivierung ausgebracht. Es erwies sich jedoch als schwierig diese Varietät mit ihren, im Vergleich zu den anderen Varietäten differierenden Anforderungen an Boden, Temperatur und Lichtverhältnissen, zu kultivieren. Eine der *Capsicum pubescens* Varietäten (Akzessionsnummer: CAP 1033, *Yellow Tree Pepper Rocot*, siehe 7.8.1) konnte erfolgreich bis zur Fruchtreife gebracht werden. Die Pflanzen wurden im Oktober 2006 eingesät und trugen am August 2007 die ersten reifen Früchte.

##### 4.4.3.1 Messung des Musters von Acyl-CoA's in *Capsicum pubescens* var. CAP 1033

Es war nicht bekannt, wie lang der Zeitraum der Fruchtreife bei dieser Varietät ist. Der erste beobachtete Farbwechsel einer Frucht von grün nach gelb wies auf eine Reifedauer von  $\geq 48$  Tagen hin. Nachdem diese Erkenntnis vorlag, wurden von derselben Pflanze 13 grüne Früchte, mit einem Fruchtgewicht im Median von 11,9 g, geerntet. Das Gesamtfruchtgewicht lag bei 168,5 g, wovon 145,0 g auf das Perikarp und 23,5 g auf die Plazenten entfielen. Das Fruchtalter lag bei  $> 18$  bis  $\leq 48$  Tagen nach Blüte. Dieses Zeitfenster wurde gewählt, weil die Untersuchung einer 14 Tage alten Frucht zeigte, dass zwar das Capsaicinoidmuster mit Dihydrocapsaicin als Hauptcapsaicinoid den Erwartungen entspricht, jedoch der Gesamtscharfstoffgehalt noch sehr niedrig lag (0,3 mg/Frucht).

Das Clean-up wurde gemäß Abbildung 4-2 durchgeführt, d.h., dass zur Elution der Thioester zunächst der Eluent mit 0,15 M LiCl für die erste Fraktion verwendet wurde und nach einem Zwischenwaschschritt mit MES-Puffer eine weitere Fraktion mit 0,5 M LiCl Eluenten erhalten wurde. Der Zentrifugationsrückstand wurde zur Untersuchung auf Capsaicinoide verwendet. Jeweils ein Reagenzienblindwert für die 0,15 M LiCl- und die 0,5 M LiCl-Fraktion wurde mitgeführt.

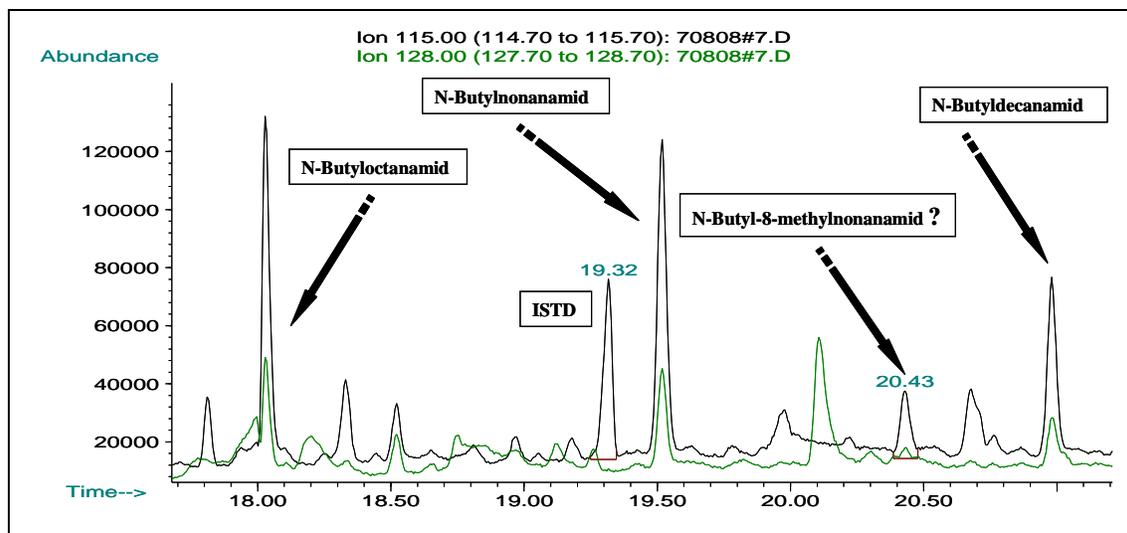


Abbildung 4-62 *Capsicum pubescens* var. CAP 1033: Chromatogramm der Acyl-CoA-Fraktion (Plazenten-Matrix). Der Peak bei  $t_R = 19,3$  min stammt vom ISTD und der Peak bei  $t_R = 20,4$  min hat die Retentionszeit von *N*-Butyl-8-methylnonanamid.

Im Chromatogramm (Abbildung 4-62) lassen sich keine eindeutigen Indizien für den Nachweis von *N*-Butylamiden finden, die das Vorhandensein der gesuchten Acyl-CoA's wahrscheinlich machen würden. Selbst der Peak bei 20,4 min ist kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein des Precursors von Dihydrocapsaicins, dem Hauptcapsaicinoid in *Capsicum pubescens*, denn dieser findet sich auch im Chromatogramm des Reagenzienblindwertes (Abbildung 4-63). Auch hier liegt ein kleines Signal bei  $t_R = 20,4$  min vor, welches jedoch ein noch schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis aufweist. Das Chromatogramm des Reagenzienblindwertes unterscheidet sich nicht signifikant vom Chromatogramm aus der Aufarbeitung der Plazenten-Fraktion, welche mit 0,15 M LiCl eluiert wurde.

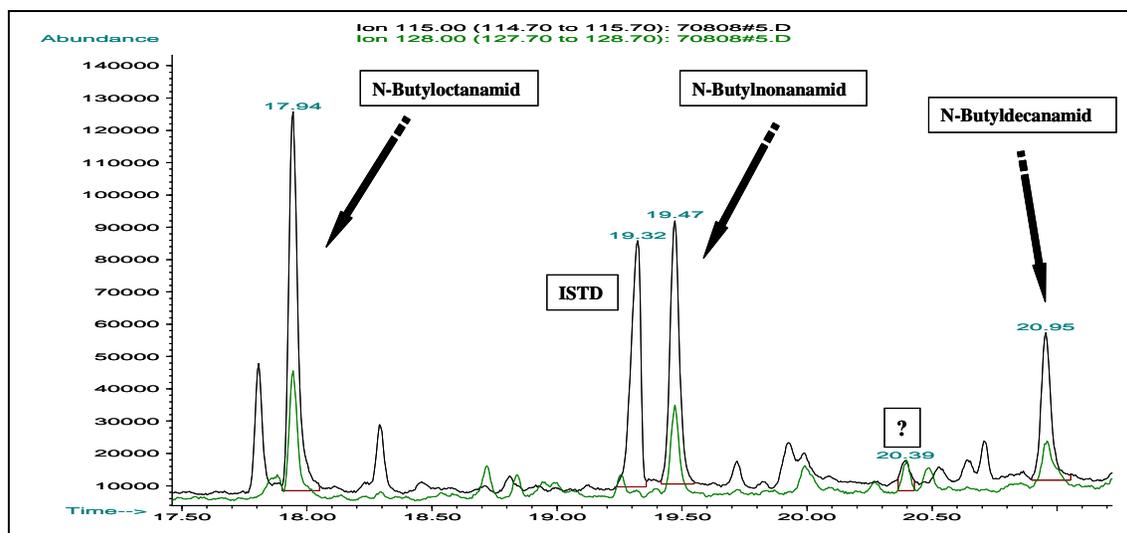


Abbildung 4-63 Reagenzien-Blinwert: (Pufferlösung mit 0,15 M LiCl). Der Peak bei  $t_R = 19,3$  min stammt vom ISTD und der Peak bei  $t_R = 20,4$  min hat die Retentionszeit von *N*-Butyl-8-methylnonanamid.

Aus der Fraktion, welche mit 0,5 M LiCl in der Pufferlösung zur Elution verwendet wurde, konnte folgendes Chromatogramm für die Plazenta-Matrix gemessen werden:

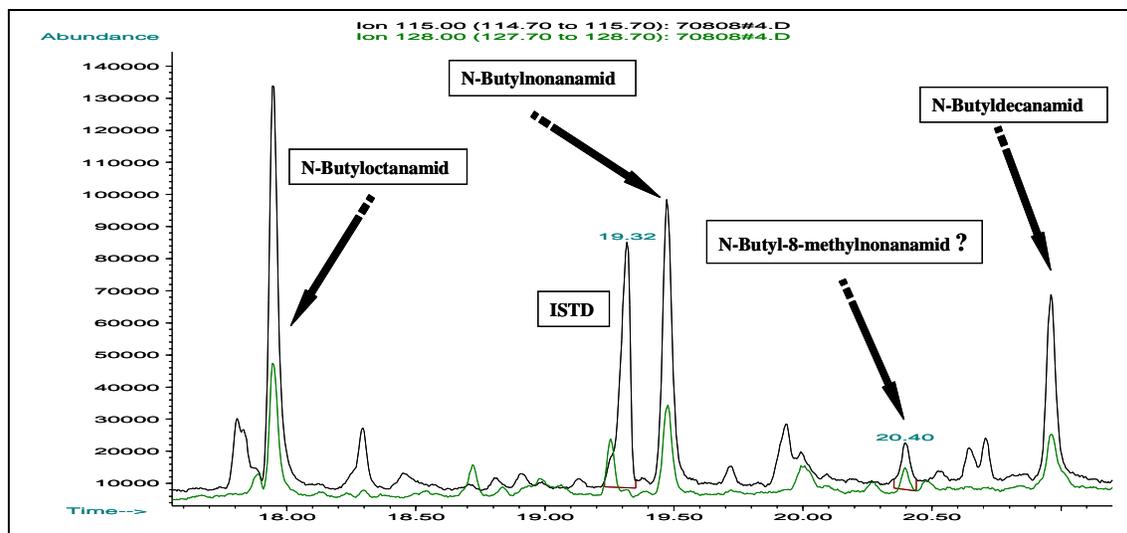


Abbildung 4-64 *Capsicum pubescens* var. CAP 1033: Chromatogramm der Messung der Acyl-ACP-Fraktion der Plazenten-Matrix. Der Peak bei  $t_R = 19,3$  min stammt vom ISTD und der Peak bei  $t_R = 20,4$  min hat die Retentionszeit von *N*-Butyl-8-methylnonanamid.

Das oben angeführte Chromatogramm (Abbildung 4-64) unterscheidet sich nicht von den Chromatogrammen der mit 0,15 M LiCl im Eluenten erhaltenen Fraktion. Ebenfalls deckungsgleich ist das entsprechende Chromatogramm des Reagenzienblindwertes für die Fraktion mit 0,5 M LiCl im Eluenten der Festphasenanreicherung.

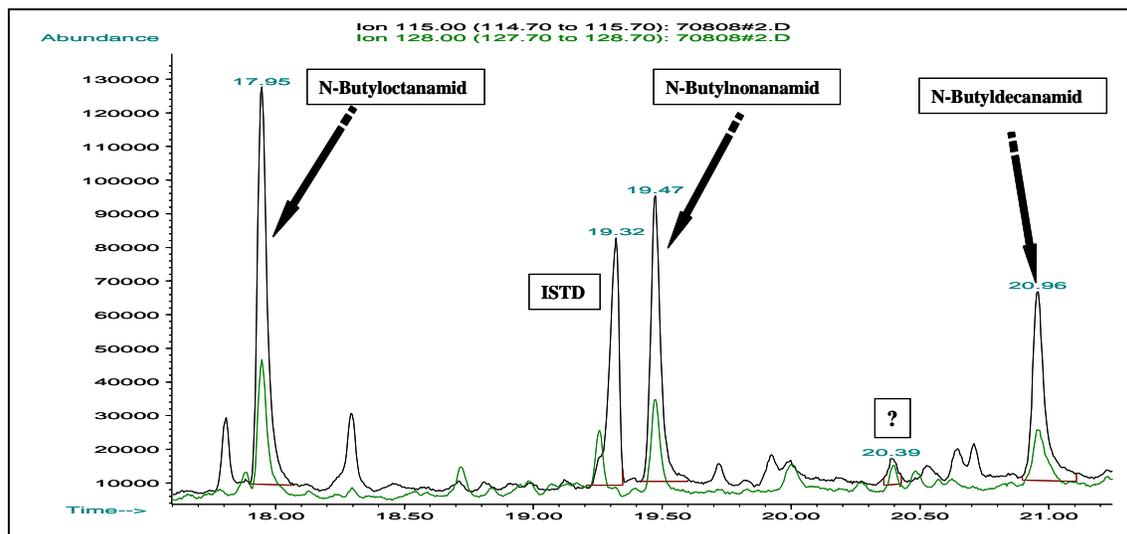


Abbildung 4-65 Reagenzien-Blindwert: (Pufferlösung mit 0,5 M LiCl). Der Peak bei  $t_R = 19,3$  min stammt vom ISTD und der Peak bei  $t_R = 20,4$  min hat die Retentionszeit von *N*-Butyl-8-methylnonanamid.

Die Chromatogramme aus der Aufarbeitung der Plazenten, des Perikarps (hier nicht gezeigt) und der Reagenzienblindwerte aus jeweils beiden Fraktionen (0,15 M LiCl und 0,5 M LiCl) sind identisch. Es wurden keine Acyl-Thioester nachgewiesen.

#### 4.4.3.2 Messung der Capsaicinoidmuster in *Capsicum annum* var. CAP 1033

Zum Capsaicinoidmuster dieser Varietät liegen folgende Messergebnisse von Früchten einer Pflanze vor:

1. Untersuchung des Zentrifugationsrückstandes (13 grüne Früchte) aus der Aufarbeitung der Acyl-Thioester (Alter der Früchte: > 18 bis ≤ 48 Tage nach Blüte)
2. Untersuchung einer grünen Einzelfrucht (Alter Frucht: 14 Tage nach Blüte)
3. Untersuchung einer gelben Einzelfrucht (Alter Frucht: 48 Tage nach Blüte)

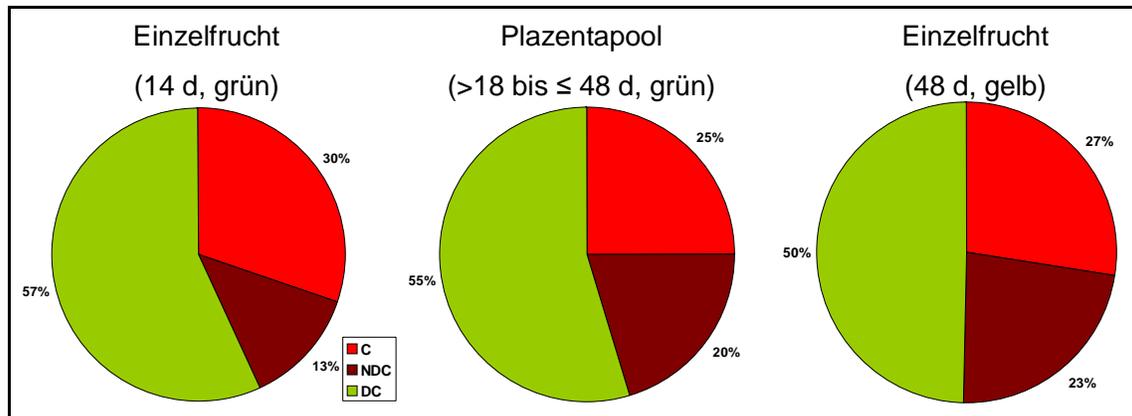


Abbildung 4-66 *Capsicum pubescens* var. CAP 1033: Capsaicinoidmuster zu unterschiedlichen Reifestadien.

Der Capsaicinoidgehalt der Einzelfrüchte lag mit 0,3 mg /Frucht bei der grünen, 14 d alten Frucht bzw. mit 0,7 mg/Frucht bei der gelben, 48 d alten Frucht in einem sehr niedrigen Bereich, so dass die Bestimmung des Capsaicinoidmusters stärker fehlerbehaftet ist als beim Zentrifugationsrückstand (Plazenten-Pool). Aus diesem Grund sind Aussagen über die Veränderung des Capsaicinoidmusters im zeitlichen Verlauf der Fruchtentwicklung nur bedingt möglich. Übereinstimmend zeigt sich, dass das Dihydrocapsaicin das Hauptcapsaicinoid ist.

#### 4.4.4 *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*

Da die Kultivierung eigener schärfeärmer bzw. capsaicinoidfreier Varietäten aus den Samen von Gemüsepaprika (*C. annuum* var. *annuum*) des Lebensmitteleinzelhandels nicht erfolgreich verlief, wurde eine Gemüsepaprikapflanze im Gartenfachhandel käuflich erworben. Es handelt sich dabei um eine Varietät, die im Vergleich zu den üblichen Gemüsepaprika, kleine Früchte hervorbringt. Sie trägt den Namen *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*. Die Untersuchung von capsaicinoidfreien *Capsicum*-Früchten soll als weiteres Indiz, in Form eines negativen Nachweises, die Theorie der Acyl-Thioester als Vorstufen der Capsaicinoide unterstützen. Denn in einer Schärfe-freien Varietät sollten auch keine Acyl-Thioester mit den Capsaicinoid-typischen Fettsäuren zu detektieren sein. Vor der instrumentellen Analytik der Früchte wurde gustatorisch ermittelt, ob es sich tatsächlich um capsaicinoidfreie *Capsicum*-Früchte handelt. Nachdem dies sowohl sensorisch als auch mittels instrumenteller Analytik bestätigt werden konnte, wurden grüne, unreife und rote, reife Früchte geerntet und getrennt voneinander untersucht. Dabei wurde sowohl jeweils für das Plazenta-Gewebe, wie auch für das Perikarp eine gestufte Elution der Thioester nach Abbildung 4-2 durchgeführt.

##### 4.4.4.1 Messung des Musters von Acyl-Thioestern in reifen *Capsicum*-Früchten der Varietät *Capsicum annuum* var. „*Tinkerbell*“

Da die Früchte im Vergleich zu den Chili-Früchten der Varietäten „*Jalapeno*“ und „*Habanero orange*“ wesentlich größer sind, wurden nur drei rote Früchte mit einem Gesamtgewicht von 54,1 g geerntet. Davon entfielen 40,1 g auf das Perikarp und 14,0 g auf die Plazenten.

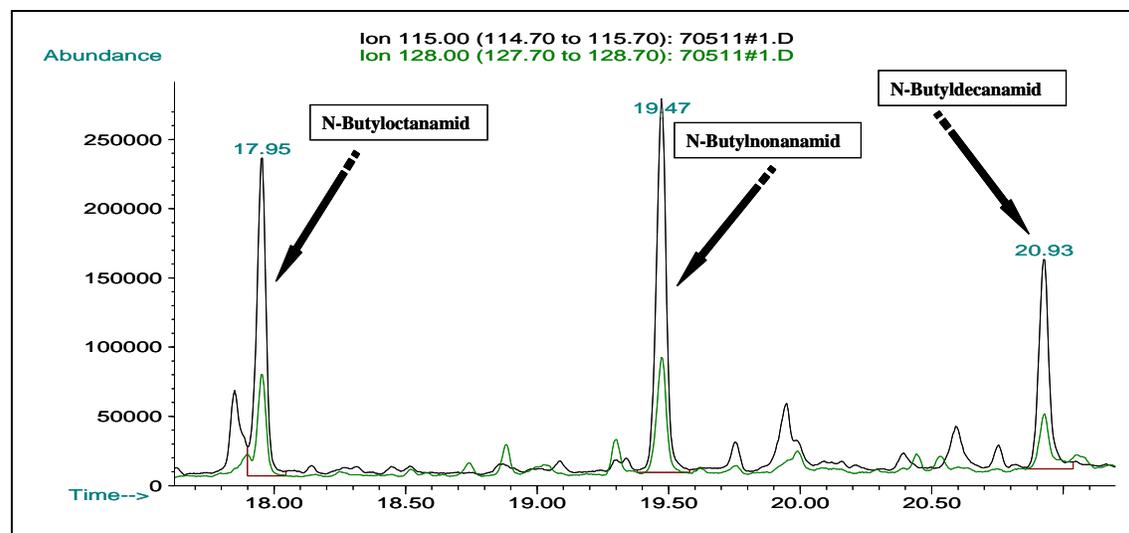


Abbildung 4-67 *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung der Acyl-ACP's (Perikarp-Matrix), reife Früchte, SIM-Modus. Darstellung der Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$ .

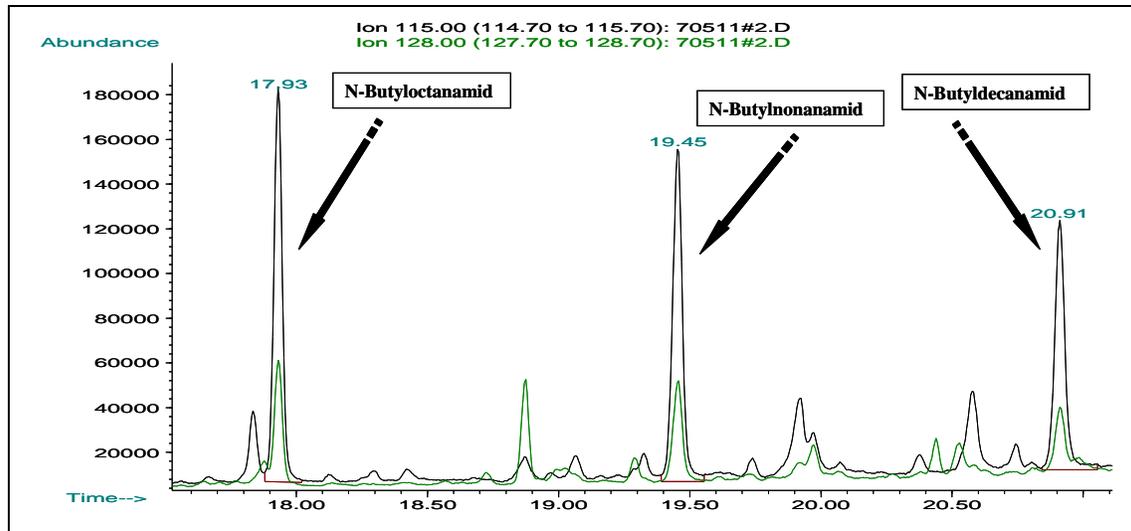


Abbildung 4-68 *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung der Acyl-ACP's (Plazenta-Matrix), reife Früchte, SIM-Modus. Darstellung der Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$ .

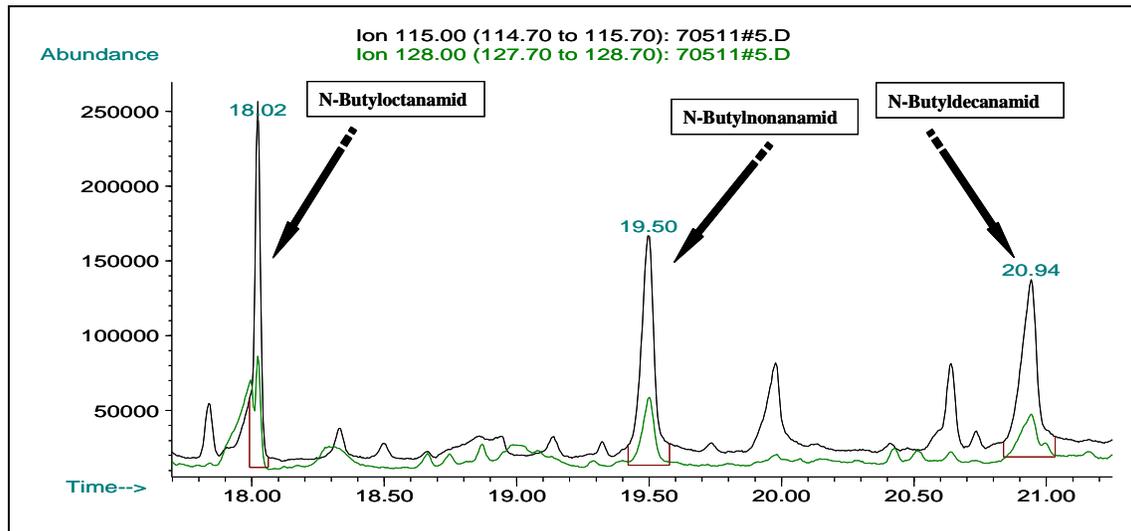


Abbildung 4-69 *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung der Acyl-CoA's (Perikarp-Matrix), reife Früchte, SIM-Modus. Darstellung der Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$ .

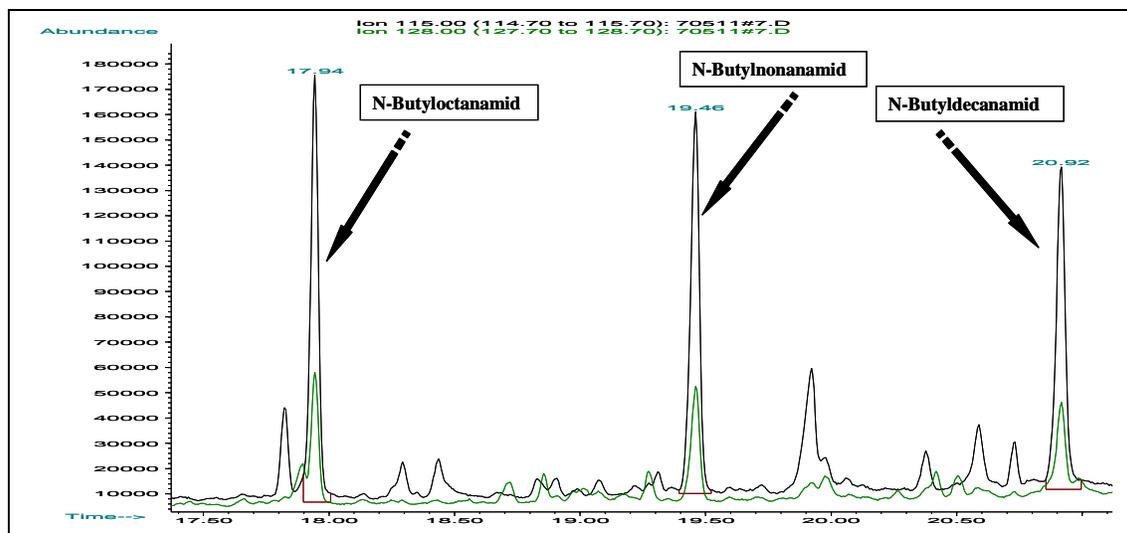


Abbildung 4-70 *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung der Acyl-CoA's (Plazenta-Matrix), reife Früchte, SIM-Modus. Darstellung der Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$ .

Die Messungen der verschiedenen Gewebearten (Plazenta und Perikarp) und Unterscheidung nach Thioester-Spezies mittels verschiedener Ionenstärken an LiCl (0,15 M und 0,5 M) bei der Elution der Fraktionen, liefert keine *N*-Butylamide, welche die Fettsäurereste der 3 Hauptcapsaicinoide tragen.

#### 4.4.4.2 Messung des Musters von Acyl-Thioestern in unreifen *Capsicum*-Früchten der Varietät *Capsicum annuum* var. „*Tinkerbell*“

Bei den grünen Früchten dieser Varietät reichte es ebenfalls aus, 3 Einzelfrüchte zu einem Pool zur Untersuchung zu vereinigen. Das Gesamtgewicht betrug 34,5 g. Dieses gliedert sich in 9,8 g Plazenta und 24,7 g Perikarp.

Wie in Abbildung 4-71 zu erkennen ist, welche exemplarisch für die Untersuchung der unreifen „*Tinkerbell*“-Früchte gezeigt wird, lassen sich keine *N*-Butylamide nachweisen, die die Fettsäurereste der 3 Hauptcapsaicinoide enthalten.

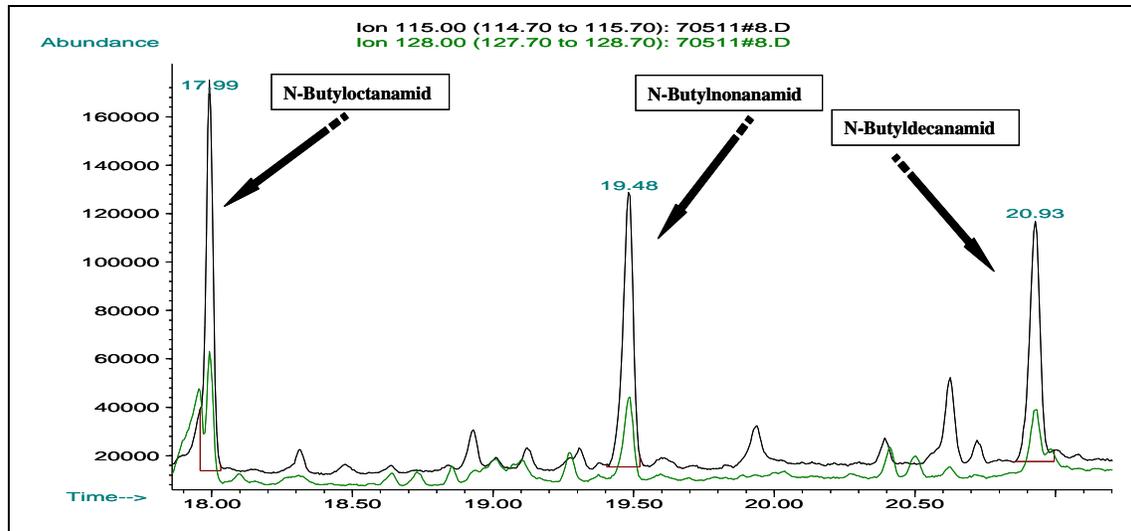


Abbildung 4-71 *Capsicum annuum* var. *Tinkerbell*: Chromatogramm-Ausschnitt zur Messung der Acyl-CoA's (Plazenta-Matrix), unreife Früchte, SIM-Modus. Darstellung der Massenspuren  $m/z=115$  und  $m/z=128$ .

Der Capsaicinoidgehalt lag bei dieser Varietät unterhalb der Nachweisgrenze ( $<0,1 \mu\text{g/ml}$ ), so dass keine Bestimmung des Capsaicinoidgehaltes des Zentrifugationsrückstandes per HPLC vorgenommen werden konnte.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion zur Methodenentwicklung

Die Methodenerwicklung erfolgte in Anlehnung an ein von Kopka et al. (160) entwickeltes Verfahren zur Bestimmung der Acyl-Acyl-Carrier-Proteine (Acyl-ACP) in Spinat. Die Untersuchungen an Spinatblättern zielten darauf ab, Stoffwechsel-Intermediate der Lipid-Biosynthese unabhängig von der vorliegenden Isoform des ACP selektiv analysieren zu können. Bis zu diesem Zeitpunkt erfüllten die molekularbiologischen Techniken, wie das Immunoblotting, die Anforderungen nicht. Besonders interessant schien diese Methode im Hinblick auf die Untersuchung von Pflanzen zu sein, deren Fettsäuremuster gentechnisch verändert wurde. Kopka et al. legten durch die Wahl der Matrix ihren Fokus auf Acyl-ACP's, die bei der Bildung von Zellwand-Lipiden für jede Zelle von großer Bedeutung sind und fanden folgerichtig hauptsächlich C16:0-ACP und C18:0-ACP's.

Mit dieser Methode wurden von den Autoren sowohl Acyl-CoA als auch Acyl-ACP analysiert. Sie erwähnten nicht, dass durch die Vorgehensweise bei der Probenvorbereitung nicht die Gesamtheit des Acyl-CoA-Pools erfasst wird. Vielmehr wurde durch Kopka et al. die Fraktion der Acyl-CoA's als störende, interferierende Verbindungen verworfen. Trotz der Einschränkung, dass nur der Teil des Acyl-CoA-Pools vorliegt, der im ersten Aufarbeitungsschritt mit Trichloressigsäure gefällt wird, wurde die Acyl-CoA-Fraktion bei der Untersuchung von Chili-Früchten nicht verworfen, sondern ebenfalls analysiert.

Die Separation der beiden Thioester-Fractionen stellten Kopka et al. durch Wiederfindungsversuche mit radioaktiv markierten Standards (je [1-<sup>14</sup>C] markierte: Oleoyl-ACP, Oleoyl-CoA, Oleoyl-Phosphatidylcholin, Glycerintrioleat und Ölsäure) sicher. Nur 0,2 % des Oleoyl-CoA befand sich in der Acyl-ACP-Fraktion. Dieses Resultat wurde durch eigene Kontrollexperimente bestätigt: Der eingesetzte Octanoyl-CoA-Standard wurde in der Acyl-ACP-Fraktion nicht nachgewiesen.

Dagegen wurden 75,1 % des eingesetzten Oleoyl-ACP in der zu erwartenden Fraktion (Elution mit 0,5 M Lithiumchloridlösung als Gegen-Ionen beim Anionenaustausch) mittels Szintillationsmessung detektiert. Über den Verbleib des Restes gaben Kopka et al. keine Auskunft. Hier konnten eigene Kontrollexperimente mangels geeigneter Acyl-ACP-Standards nicht realisiert werden.

Ohne einen mittelkettigen, methylverzweigten Acyl-ACP-Standard kann keine quantitative Aussage bezüglich der Acyl-Thioester gemacht werden. Es war aber sichergestellt, dass die Acyl-ACP-Fraktion nicht mit Acyl-CoA verunreinigt war. Mit dieser an Kopka et al. angelehnten Methode ließen sich demnach Informationen über das Verteilungsmuster der Acyl-ACP's gewinnen.

Da die in Chili-Früchten untersuchten Vorstufen der Capsaicinoide zum einen in einer anderen Matrix (anderer Teil der Pflanze) zu suchen und zum anderen strukturell sehr unterschiedlich waren (mittelkettige, methylverzweigte Acyl-Reste), musste die Methode entsprechend modifiziert werden.

**Tabelle 5-1 Gegenüberstellung der Methoden zur Analyse von Acyl-Thioestern in Spinat-Blättern und der daraus abgeleiteten Vorgehensweise zur Untersuchung der Thioester-Pools in Chili-Früchten.**

	<b>Methode nach Kopka et al. (160)</b>	<b>Eigene modifizierte Methode zur Untersuchung von Chili-Früchten</b>	<b>Bemerkung zur eigenen Methode</b>
<b>Zielanalyten</b>	Intermediate der Lipidbiosynthese	Intermediate der Capsaicinoid-Biosynthese	Hier sind nur mittelkettige, methylverzweigte Acyl-Reste von Interesse.
<b>Substanzklassen</b>	Acyl-ACP	Acyl-ACP	Bei der modifizierten Methode wurde die Acyl-CoA-Fraktion nicht verworfen, sondern ebenfalls untersucht.
<b>Pflanzenart</b>	Spinat ( <i>Spinacia oleracea</i> )	Chili und Paprika <i>Capsicum spp.</i>	
<b>Matrix</b>	Blätter	Früchte	Früchte wurden in zwei Fraktionen getrennt:  1. Plazenta + Scheidewände + Samen  2. Perikarp
<b>Standards zur Identifizierung und Quantifizierung</b>	[1- <sup>14</sup> C] markierte Standards (Kettenlänge je C16 oder C18): Acyl-ACP's, Acyl-CoA's, Phosphatidylcholin, Triglyceride und freie Ölsäure	eigene Synthese und strukturelle Charakterisierung von 10 <i>N</i> -Butylamiden  Octanoyl-CoA	Kopka et al. benutzten Reaktionsprodukte der Aminolyse-Reaktion zur Identifizierung - es lagen keine unabhängigen Standards vor. Quantifizierung mittels [1- <sup>14</sup> C] markierter Standards.  Eigene Methode: Vergleich der Verteilungsmuster über relative Responsefaktoren
<b>Aufschluss der Zellen und Fällung der Proteine</b>	Trichloressigsäure („eiskalt“)	Trichloressigsäure (4° C)	1. Waschschrift: 5% CCl <sub>3</sub> COOH 2. Waschschrift: 1% CCl <sub>3</sub> COOH
<b>Anionenaustauscher- Material</b>	DEAE-Cellulose 0,2 ml/g Spinat	DEAE-Sepharose 10 ml/ ~25g Matrix	Geringere Verstopfung der Fritten mit Pflanzenmatrix durch Verwendung großer SPE-Kartuschen (75 ml, Ø 1/2").
<b>Acyl-CoA-Fraktion</b>	verwerfen	auffangen und analysieren	Dies stellt nur einen Teil der Acyl-CoA-Fraktion dar, weil die Waschschriffe der Matrix mit CCl <sub>3</sub> COOH Acyl-CoA nicht auszufällen vermögen.
<b>Acyl-ACP-Fraktion</b>	auffangen und analysieren	auffangen und analysieren	
<b>Aminolyse-Reaktion</b>	2-Phasen-System (n-Hexan / MES-Puffer)	rein wässrig (MES-Puffer)	In rein wässrigen Systemen ist die Bildung von unerwünschten Nebenkomponenten am geringsten.

<b>Derivatisierungs-Reagenz</b>	2 M n-Butylamin	1 M n-Butylamin	- jeweils Endkonzentration im Reaktionsansatz  - Konzentration verringert, da weniger Nebenprodukte aber Umsetzung trotzdem gleich gut
<b>Reaktions-Abbruch</b>	Zugabe von 12 M HCl (Volumen entspricht 0,5 x dem Elutionsvolumen)	Neutralisation (pH-Papier) des Ansatzes mit 4 M HCl	Vermeidung der Hydrolyse bereits gebildeter Produkte
<b>Flüssig-flüssig-Extraktion der Reaktionsprodukte</b>	2 x 2 ml n-Hexan	2 x 20 ml Diisopropylether (frisch destilliert)	Hier wurde der größeren Polarität der Analyten (kürzerer Acyl-Rest) Rechnung getragen. Zugabe von <i>N</i> -Butyl-2-methylhexanamid zur Kontrolle von Verlusten bei der weiteren Aufarbeitung.
<b>Entfernung des Lösungsmittels</b>	Abblasen mit Stickstoff bei 55 °C	Trocknung des Lösungsmittels mit Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Filtration; Rotationsverdampfer bei 55 °C	Effizientere Vorgehensweise durch das größere Lösungsmittelvolumen notwendig.
<b>Lösen des Rückstandes</b>	5-10 µl n-Hexan	20 µl Diisopropylether	Volumina < 20 µl ließen sich nicht reproduzierbar pipettieren

Die mit dieser Methode erhobenen Daten zeigten eine Momentaufnahme der Stoffwechselfvorgänge bei der Capsaicinoid-Biosynthese. Durch die Betrachtung der Verteilungsmuster der Acyl-CoA's, der Acyl-ACP's und der Capsaicinoide aus der Pflanzenmatrix wurden drei Stationen des Biosyntheseweges erfasst.

Die Acyl-ACP's dokumentieren den frühen Schritt der Fettsäure-Kettenverlängerung und liefern durch die Reinheit diese Pools verlässliche Daten. Der Acyl-CoA-Pool hat im FAS II-Komplex nur eine beschränkte Aussagekraft über das Verteilungsmuster der Acyl-Thioester, welche mit Vanillylamin zum Capsaicinoid kondensiert werden. Eine Diskriminierung der polareren Acyl-CoA's (z.B. 8-Methyl-6-nonensäure-CoA) war eventuell möglich, so dass in der Trichloressigsäure-Fällung unpolare Anteile (z.B. 8-Methylnonansäure-CoA) überproportional vertreten sein konnten.

Die Capsaicinoide stellen die Endprodukte der Capsaicinoid-Biosynthese dar und zeigen die bis zu diesem Zeitpunkt bereits gebildeten Vanillylamide und deren Verteilungsmuster.

### 5.1.1 Charakterisierung der Methode zur gestuften Elution der Thioester

Der käuflich erworbene Coenzym A-Standard (n-Octanoyl-CoA) ließ sich per Aminolyse-Reaktion in das entsprechende *N*-Butylamid überführen und dieses mittels GC/MS identifizieren und quantifizieren. Das eingesetzte Octanoyl-CoA konnte nach Derivatisierung als *N*-Butyloctanamid im Rahmen der Säulenchromatographie (Anionenaustausch) in der Fraktion nachgewiesen werden, welche mit 0,15 M LiCl eluiert wurde und fand sich nicht in der 0,5 M LiCl-Fraktion (Acyl-ACP-Fraktion).

Es liegen keine eigenen Daten darüber vor, in welcher Fraktion Acyl-Thioester des ACP zu finden wären, denn dafür waren keine Modellsubstanzen verfügbar. Hier muss auf die

Experimente von Kopka et al. (160) verwiesen werden, die zeigten, dass sich Acyl-ACP's in der zweiten Fraktion, welche mit einem LiCl-Gehalt von 0,5 M eluiert wird, wiederfinden. Die Wiederfindung nach der Aminolyse-Reaktion bzw. nach der Ionenaustausch-Chromatographie konnte für Octanoyl-CoA's nicht quantifiziert werden.

Über die Ausbeute an zugesetztem Aufarbeitungsstandard (*N*-Butyl-2-methylhexanamid) sollten sich die Schwankungen, welche durch die Anreicherung des Ether-Extraktes entstehen, ausgleichen lassen. Der Aufarbeitungsstandard wurde unter der Annahme verwendet, dass er sich trotz der Verzweigung während der Anreicherung analog zum geradkettigen *N*-Butyloctanamid verhält. Er konnte jedoch aufgrund des stark abweichenden Ionisierungsverhaltens (nicht erwartete hohe Wiederfindungen) nicht als zuverlässiger Standard zur Quantifizierung verwendet werden.

Aufgrund des geringen Gesamtvolumens der Probelösung am Ende der Aufarbeitung, war eine manuelle Injektion in das GC/MS notwendig. Die Schwankungen, welche sich bei manuellen Injektionen ergaben, ließen sich mittels des internen Standards (ISTD; Myristinsäuremethylester) ausgleichen. Dieser Standard war im Diisopropylether enthalten, in dem der Rückstand zum Ende der Anreicherung wieder aufgenommen wurde. Die Standardabweichung von Einzelinjektionen eines Tages lagen bei maximal 10 %. Die Standardabweichung aus den Schwankungen in der Peakfläche des ISTD im Verlauf der Charakterisierung der Methode (mehrere Tage; Anzahl der Injektionen:  $n=25$ ) lag bei 25 %. Die Schwankungen des Detektoransprechverhaltens überstiegen die auftretende Varianz durch die erfolgte manuelle Injektion. Daran erkennt man, dass ohne einen isotonenmarkierten Standard diese Methode nicht zur Quantifizierung geeignet ist (siehe 5.1.3).

Die Nachweisgrenze der GC/MS-Bestimmung lag im Bereich von  $0,2 \mu\text{g}$  *N*-Butyloctanamid/ml ( $0,4 \text{ pg}$  *N*-Butyloctanamid absolut). Um unter diesen Rahmenbedingungen in dem von Kopka et al. genannten ppb-Bereich Acyl-Thioester erfassen zu können, ist eine Anreicherung während der Aufarbeitung um den Faktor 1000 notwendig. Dies kann gewährleistet werden, indem 10 bis 20 g Probenmaterial (Frischgewicht) aufgearbeitet werden.

Die Messung von Thioestern in Einzelfrüchten war mit der vorliegenden Methode und den apparativen Bedingungen nicht zu realisieren.

### 5.1.2 Kontrollexperimente

Als wichtigste Voraussetzung zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse beim Nachweis von Acyl-Thioestern konnte gezeigt werden, dass Capsaicinoide unter den Bedingungen der Aminolyse-Reaktion **nicht** zu den entsprechenden *N*-Butylamiden umgesetzt werden. Der größte Teil der Capsaicinoide wurde durch das Clean-up von den Acyl-Thioestern abgetrennt. Das Capsaicin ist in dem zur Aufarbeitung benutztem Morpholinpropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  schlecht löslich und wurde im Zentrifugationsrückstand gefunden. Weiterhin trägt das Capsaicin in wässriger, neutraler Lösung keine Ladung und kann nicht durch den Anionen-Austausch-Vorgang angereichert werden. Reste an Capsaicin lösen sich sehr gut in Isopropanol und werden mit der Waschlösung von der Kartusche gewaschen (siehe Abbildung 4-16, S. 68).

Freie 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure wurde bei der Aminolyse-Reaktion in geringem Ausmaß (etwa 0,35 %) zu *N*-Butylamid umgesetzt. Das ist eine wichtige Voraussetzung, um *N*-Butylamide aus der Untersuchung der Acyl-Thioester eindeutig auf diese zurückführen zu

können. Zudem wurden durch den hohen Anteil an Isopropanol (80 vol. %) im 2. Waschschrift bei der Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Acyl-Thioester nach Kopka et al. evtl. vorhandene freie Fettsäuren sowie andere Lipide entfernt.

Prasad et al. (120) zeigten 2006, dass es im Hinblick auf mögliche regulatorische Auswirkungen auf die Capsaicinoid-Biosynthese wichtiger ist, sich die Zwischenprodukte des Fettsäurestoffwechsels anzuschauen, als die Zwischenprodukte des Phenylpropanoidweges. Sie zeigten, dass der Vanillylamin-Pool nicht der limitierende Faktor für die Scharfstoffbildung ist. Diese und weitere Experimente von Prasad et al. (165), bei denen gezeigt werden sollte, dass die 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure ein wichtiger Precursor für das Capsaicin ist, sind unter folgenden Gesichtspunkten mit Vorsicht zu betrachten. Prasad et al. isolierten aus drei unterschiedlich scharfen Varietäten (milde, mittelscharfe und sehr scharfe *Capsicum*-Früchte) Phenylpropanoid-Intermediate und 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure. Die „freie“ Fettsäure wurde zunächst mit Petrolether extrahiert und anschließend mit NaOH/BF<sub>3</sub> zum Fettsäuremethylester zur GC/MS-Bestimmung umgesetzt. Hierbei wurde von den Autoren übersehen, dass durch die Extraktion mit Petrolether als Lösungsmittel ein großer Teil der Capsaicinoide mitextrahiert wird (166, 167). Bei der Behandlung des Extraktes mit NaOH wird ein Teil des Capsaicins verseift und die Fettsäure freigesetzt und dann ebenfalls als Methylester quantifiziert. Dadurch wird eine Korrelation des Gehaltes an freier Fettsäure mit dem Capsaicinoidgehalt lediglich vorgetäuscht. So ist zu erklären, dass Prasad et al. in sehr scharfen Früchten mehr von der freien Fettsäure finden als in Früchten einer eher milden Varietät. Ein eindeutiges Indiz für freie 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure als Vorstufe für das Capsaicin ist das nicht.

Bei eigenen Vorversuchen zur Entwicklung einer Analysenstrategie wurde u.a. die Verseifbarkeit der Capsaicinoide (nicht gezeigte Daten) untersucht. Pelargonsäurevanillylamid wurde als Modellsubstanz (0,609 mg/ml) mit verdünnter NaOH-Lösung über Nacht (20 h) bei 80 °C inkubiert. Nach Neutralisation und anschließender Extraktion der Produkte mit Pentan wurde die entstandene Pelargonsäure mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) zum Methylester derivatisiert und mittels GC/MS analysiert. Selbst bei der geringsten NaOH-Konzentration aller 10 Versuchsansätze von (0,25 g NaOH/100 ml  $\equiv$  62,5 mM) wurde das Vanillylamid vollständig verseift. PSVA war in den Proben nicht mehr nachweisbar. Aus dieser Erkenntnis resultiert die oben angeführte Vermutung, dass Prasad et al. Verseifungsprodukte mitbestimmt haben könnten und diese als vorher vorhandene freie Fettsäuren fehlinterpretierten.

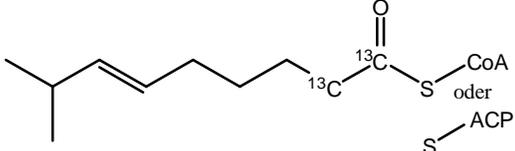
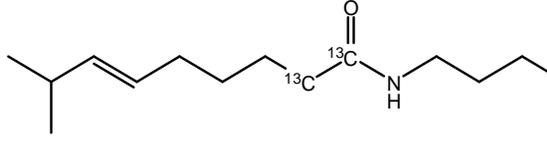
Von den kultivierten *Capsicum*-Pflanzen wurden Samen der Varietät Jalapeno auf ihren Fettgehalt und die Fettsäurezusammensetzung untersucht. Es zeigte sich, dass die Fettsäuren, welche die Reste der drei Hauptcapsaicinoide darstellen, nicht in den Lipiden der Chilisaamen nachweisbar sind (< 0,5 %) und diese besonderen Fettsäuren lediglich in den Capsaicinoiden vorkommen. Die Fettsäurebiosynthese der drei Fettsäuren der Hauptcapsaicinoide dient nicht zusätzlich zur Bildung von wesentlichen Anteilen an Speicherlipiden.

### 5.1.3 Quantifizierung

Die beiden eingesetzten Standards ISTD (Myristinsäuremethylester) und der Aufarbeitungsstandard (ASTD; *N*-Butyl-2-methylhexanamid) ermöglichen keine Quantifizierung der Acyl-Thioester. Sie wurden verwendet, um abzuschätzen, wie groß die Verluste bei der Anreicherung nach der Aminolyse-Reaktion sind. Außerdem konnte die

Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Messung abgeschätzt werden. Unbeachtet blieb dabei die geringe Stabilität der Thioester und damit einhergehende Verluste vom Zeitpunkt der Ernte der Früchte, über das Clean-up mittels DEAE-Sephrose, bis hin zur Umsetzung zu *N*-Butylamiden während der Aminolyse-Reaktion. Zu diesem Zweck werden interne Standards benötigt, die sich analog zu den natürlichen Thioestern verhalten (in Bezug auf physikalische und chemische Eigenschaften). Isotopenmarkierte Acyl-Thioester erfüllen diese Anforderungen. Sie müssten am C1- und am C2-Atom des Acyl-Restes mit dem Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  markiert sein. Durch die Fragmentierung im Massenspektrometer (EI, 70 eV) entstehen zwei Hauptfragmente, welche die Kohlenstoffatome C1 und C2 des Acyl-Restes sowie den Butylamid-Teil des Moleküls enthalten. Durch diese zweifache Markierung erhalte man Hauptfragmente mit den Massen  $m/z = 117$  und  $m/z = 130$ , welche als separate Massenspuren gemessen werden könnten. In der unten angeführten Tabelle ist exemplarisch dargestellt, wie solch ein markierter Acyl-Thioester und das entsprechende *N*-Butylamid aussehen würden.

**Tabelle 5-2 Stabilisotopen-markierte Acyl-Thioester ( $^{13}\text{C}$ )**

Thioester-Standard Stabilisotopen-Markierung: 2 mal [ $^{13}\text{C}$ ], an C1 und C2 der Fettsäure	resultierendes <i>N</i> -Butylamid
	

Das Molekulargewicht dieser Standards läge bei  $M+2$  im Vergleich zu den natürlichen Derivaten. Derartige maßgeschneiderte Standards sind kommerziell nicht verfügbar. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur enzymatischen Synthese von Acyl-Thioestern verwenden Acyl-Thioester-Synthetasen aus *E. coli*. Diese Enzyme zeigen eine spezifische Aktivität für Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C10 und C18:1 (168). Es gibt keine Erkenntnisse darüber, wie sich verzweigte Fettsäuren mittlerer Kettenlänge bei dieser Reaktion verhalten. Des Weiteren ist nicht klar, ob ein Acyl-ACP, welches durch ein bakterielles Enzym synthetisiert wurde, identische Eigenschaften wie das pflanzliche Acyl-ACP hat (169). Auch bei den Methoden zur chemischen Synthese von Acyl-ACP, welche häufig zu größeren Veränderungen der Sekundärstruktur durch *N*-Acylierung führen, wird als Edukt ACP aus *E. coli* verwendet (170). Ray et al. (171) isolierten eine Acyl-ACP-Synthase aus *E. coli*, welche aus freien Fettsäuren und ACP native Thioester bildet. Das Enzym ist jedoch für gesättigte Fettsäuren  $<C8$  und ungesättigte Fettsäuren  $<C12$  inaktiv.

Bevor man so gewonnene Verbindungen als Standards hätte einsetzen können, müsste eine Charakterisierung dieser sehr reaktiven, instabilen Verbindungen erfolgen. Man erhält über die spektralphotometrische Gehaltsbestimmung für Acyl-CoA nach Kopka et al. (160) allerdings unzuverlässige Werte (siehe hierzu 4.2.1). Die genaue Gehaltsbestimmung eines analytischen Standards wäre jedoch unverzichtbar.

### 5.1.4 Fazit zur Methodenentwicklung:

Es konnte eine selektive und empfindliche Methode in Anlehnung an Kopka's Vorgehensweise etabliert werden. Dabei wurden falsch-positive Ergebnisse mittels diverser Kontrollexperimente ausgeschlossen.

Die Trennung der beiden Thioester-Derivate erfolgte bei der Säulenchromatographie am Ionenaustauscher-Material. Die zu analysierenden Thioester fanden sich in den Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie wieder. Da Kopka et al. die Methode ursprünglich zur Bestimmung von Acyl-ACP entwickelte, legte er auf die Acyl-CoA Fraktion keinen besonderen Wert. Die Acyl-CoA's wurden als störende Verbindungen durch die Elution mit 0,15 M LiCl im Eluenten von der Festphasenkartusche gewaschen, sie hätten sonst die Werte aus der Acyl-ACP-Fraktion beeinflusst. Die eigene Experimente zeigten, dass die Acyl-CoA's mit einer Ionenstärke von 0,15 M LiCl vollständig eluiert werden. Die Acyl-CoA-Fraktion verfälscht demnach nicht die Acyl-ACP-Fraktion, welche jeweils im Anschluss mit 0,5 M LiCl im Eluenten eluiert wurde. Eine Kontamination in die andere Richtung (Acyl-ACP's in der Acyl-CoA-Fraktion) konnte nicht ausgeschlossen werden.

Die Methode von Kopka hatte also das vorrangige Ziel ACP-Thioesterfraktion zu isolieren und zu bestimmen. Dabei nahm Kopka auch in Kauf, dass bei der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials die Acyl-CoA-Fraktion nicht vollständig erfasst wird. Durch die Fällung der Acyl-ACP mittels Trichloressigsäure im wässrigen Milieu bleibt ein Teil der polaren Acyl-CoA's in Lösung (Acyl-CoA's sind in 1 mM Essigsäure löslich; siehe 4.2.1) und wird beim Waschen des Zentrifugationsrückstandes verworfen. Nur unter der Annahme, dass an dieser Stelle keine Diskriminierungseffekte (z.B. polarere Fettsäurereste wurden überproportional stark ausgewaschen) bezüglich der Fettsäurereste vorliegen, kann aus der 0,15 M LiCl Fraktion eine Aussage zum Fettsäuremuster im Acyl-CoA Pool gemacht werden.

Eine Quantifizierung lässt sich mit der vorliegenden Methode in Ermangelung analytischer Standards nicht realisieren. Eine Abschätzung und damit Plausibilitätsprüfung der Resultate ist möglich. Das Fettsäure-Musters kann relativ zu einem Thioester (hier bezogen auf 8-Methyl-6-nonensäure-Thioester) bestimmt werden. Bei der Bestimmung des Verteilungsmusters wurde ein gleichartiges Verhalten der jeweils 3 Thioester angenommen. Nimmt man Diskriminierungen wegen der leicht variierenden Struktur als vernachlässigbar klein an, so kann man davon ausgehen, dass man die Thioester in dem Verhältnis analysiert, in dem sie auch *in vivo* vorliegen.

Die Methode lässt einen Vergleich der Acyl-ACP-Muster mit den Capsaicinoiden zu und ermöglicht die Diskussion der möglichen Reaktions-Pfade bei der Capsaicinoid-Biosynthese.

Zur Systematik der durchgeführten Experimente darf noch angemerkt werden, dass zur Messung nur ein betagtes Messinstrument zur Verfügung stand. Häufige Störungen und Ausfälle durch z.B. Elektronikfehler, Pumpendefekte etc. führten dazu, dass das Gerät für zuverlässige Messungen nur in begrenzter Zeit verwendet werden konnte. Ein weiterer limitierender Faktor war die anspruchsvolle Kultivierung der Capsicum-Pflanzen, welche viel Zeit (bis 10 Monate nach Aussaat erste Ernte der Früchte) und Pflege (Schädlingsbefall und Pflanzenkrankheiten vernichteten große Teile des gesamten Bestandes) bedurfte. Dadurch war selten der Fall gegeben gleichzeitig Früchte ernten zu können und ein funktionierendes Messinstrument zur Verfügung zu haben.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse aus der Untersuchung des Pflanzenmaterials

### 5.2.1 Vorüberlegungen zur Wahl des Pflanzenmaterials

Nachdem die Leistungsfähigkeit und Grenzen der Methode abgesteckt waren, musste eine strategische Entscheidung bezüglich des zu untersuchen Pflanzenmaterial getroffen werden. Unter der Voraussetzung, dass keine Quantifizierung der Acyl-Thioester möglich sein würde, mussten Untersuchungsobjekte gewählt werden, die dennoch eine möglichst große Aussagekraft der Analysenergebnisse versprachen. Um aus dem Muster der Acyl-Thioester-Pools aussagekräftige Informationen zur Biosynthese der Capsaicinoide abzuleiten, war es notwendig Capsicum-Arten zu untersuchen, die sich im Fettsäuremuster der Capsaicinoide deutlich unterschieden. In Erwartung einer höheren Konzentration an Acyl-Thioestern wurden besonders scharfe Varietäten mit relativ großen Früchten ausgewählt.

**Tabelle 5-3 Darstellung der untersuchten Varietäten aufgelistet nach Alter der Früchte und den jeweils untersuchten Frucht-Matrices.**

Varietät	Alter [d] und Farbe der geernteten Früchte	Alter der Pflanzen [Monate]	Plazenta	Perikarp	Plazenta	Perikarp	Plazenta	Perikarp
Fraktion [M LiCl] entspr. Thioester	Capsaicinoide untersucht: ●		0,15+0,5 CoA+ACP	0,15+0,5 CoA+ACP	0,15 CoA	0,15 CoA	0,5 ACP	0,5 ACP
<b>C. chinense</b> var. Habanero (sehr scharf)	≤ 45 grün und orange ●	10	-	-	✓	✗	-	-
	≤ 14 grün ●	10	-	-	✓	✗	-	-
	≤ 15 grün ●	11	✓	✗	✓	✗	✓	✗
	≥ 50 orange ●	10	-	-	✗	✗	-	-
<b>C. annuum</b> var. Jalapeno (scharf)	~ 45 grün bis grün-rötlich ●	4,5	✓	✗	-	-	-	-
	≤ 40 grün ●	6	-	-	✓	✗	✓	✗
	≤ 40 grün ●	10	-	-	✓	✗	-	-
	≤ 40 grün ●	13	-	-	✓	✗	✓	✗
	≥ 45 rot ●	6	✗	✗	-	-	-	-
<b>C. pubescens</b> var. Yellow Tree Pepper Rocot (mild)	≥ 18 und ≤ 48 grün ●	10	-	-	✗	✗	✗	✗
<b>C. annuum</b> var. Tinkerbelle (schärfefrei)	n.b. rot ●	n.b.	-	-	✗	✗	✗	✗
	n.b. grün ●	n.b.	-	-	✗	✗	✗	✗

- nicht untersucht

✓ Nachweis positiv

✗ Nachweis negativ

*Capsicum chinense* var. *Habanero* brachte sehr scharfe Früchte mit dünnem Perikarp und einer großen Plazenta hervor. Hier waren die Voraussetzungen durch das Verhältnis von Perikarp/Plazenta ideal für den Nachweis von Zwischenstufen der Capsaicinoid-Biosynthese.

*Capsicum annuum* var. *Jalapeno* brachte sehr große Früchte mittlerer bis hoher Schärfe hervor. Das Verteilungsmuster der Capsaicinoide unterschied sich deutlich von dem der *Habanero*-Früchte. Ein weiterer positiver Aspekt war die unkomplizierte Kultivierung dieser Pflanzen im Vergleich zu den anderen Arten.

*Capsicum pubescens* var. *Yellow Tree Pepper Rocot* war die einzige Varietät von *C. pubescens*, die überhaupt Früchte hervorbrachte. Diese zeichneten sich durch ein dickfleischiges Perikarp und eine kleine Plazenta aus. Ihre Schärfe lässt sich mit gering bis mittelmäßig beschreiben. Sehr interessant war allerdings das im Vergleich zu allen anderen Arten stark unterschiedliche Capsaicinoidmuster. Dihydrocapsaicin war das klar dominierende Vanillylamid. Der Großteil dieser außerordentlich empfindlichen Pflanzen wurde durch Schädlinge und Krankheiten vernichtet, bevor sie die ersten Früchte hervorbrachten.

*Capsicum annuum* var. *Tinkerbelle* war eine zugekaufte schärfefreie Varietät, an der untersucht werden sollte, ob Thioester mit den Capsaicinoid-typischen Fettsäureresten, wider Erwarten, auch dort zu finden sind.

### 5.2.2 Erstmaliger Nachweis von Acyl-Thioestern in *Capsicum* spp.

In den Varietäten *C. chinense* var. *Habanero orange* und *C. annuum* var. *Jalapeno* konnten Acyl-Thioester von mittelkettigen verzweigten Fettsäuren in unreifen Früchten im Plazenta-Gewebe nachgewiesen werden. Erstmalig gelang es somit, das Vorkommen dieser postulierten Verbindungen bei *Capsicum*-Pflanzen zu verifizieren. Die Thioester waren in einem Zeitraum zwischen von bis zu 40 Tagen nach Blüte in *Jalapeno* und bis zu 45 Tagen nach Blüte in *Habanero* nachweisbar.

Aus der Bestimmung der Acyl-Thioester in Plazenta-Gewebe von *C. chinense* var. *Habanero orange* und einer externen Kalibration (hier nicht gezeigt) mit *N*-Butyloctanamid, lässt sich die Größenordnung der vorkommenden Thioester abschätzen:

Kalibrationsgerade <i>N</i> -Butyloctanamid (µg/ml):	$y = 1775116,6x - 234891,3$ (R=0,9896)
Massenspuren:	115 und 128 m/z als Summe
Injektionsvolumen Probelösung:	2 µl von insg. 20 µl
Masse Plazenta-Gewebe (siehe Absatz 4.4.1):	43,9 g
Flächenwert <i>N</i> -Butyl-8-methyl-6-nonenamid:	2638270 (s. Tabelle 4-18)
resultierende Konzentration:	1,6 µg/ml

Bei einem Molekulargewicht von 225 g/mol für *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid erhält man eine absolute Stoffmenge von etwa 1,5 pmol in der Probelösung. Die Stoffmenge an *N*-Butylamid entspricht bei einer Umsetzung von 1 Mol Thioester zu 1 Mol *N*-Butylamid

ebenfalls 1,5 pmol. Aus der gesamten Aufarbeitung von 43,9 g Plazenta-Gewebe erhält man demnach für den am stärksten vertretenden Thioester (trägt den Rest des Capsaicins; s. Abbildung 4-24) lediglich 1,5 pmol.

Nach einer Lagerzeit der Früchte von 2 Tagen nach Ernte bei +4 °C sind diese empfindlichen Verbindungen nicht mehr zu detektieren.

Die Bildung der Capsaicinoide in Abhängigkeit vom Fruchtalter, korreliert mit der Nachweisbarkeit der Thioester. In sehr jungen Früchten sind (noch) keine Acyl-Thioester nachweisbar und in vollreifen Früchten ist die Bildung der Capsaicinoide abgeschlossen und die Acyl-Thioester sind nicht mehr nachweisbar.

Die Acyl-Thioester mit den für die Capsaicinoide charakteristischen Fettsäure-Resten wurden auch nur im Plazenta-Gewebe gefunden. In der Fruchtwand (Perikarp) wurden erwartungsgemäß keine dieser Acyl-Thioester nachgewiesen. Die Biosynthese der Capsaicinoide ist in den Epidermiszellen der Plazenta lokalisiert, somit korreliert der Nachweis der Acyl-Thioester auch räumlich mit der Biosynthese der Scharfstoffe. In der schärfefreien Varietät *C. annum Tinkerbell* lassen sich keine Acyl-Thioester nachweisen. Das ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Thioester als Vorstufen der Capsaicinoide anzusehen sind.

Bei der Untersuchung der Früchte von *Capsicum pubescens* var. *CAP 1033 (Yellow Tree Pepper Rocot)*, welche sich durch ein besonderes Capsaicinoidmuster auszeichnen, stellte sich nach der Kultivierung der Pflanzen heraus, dass die Früchte von geringer Schärfe (0,3 bzw. 0,7 mg/Frucht) waren. Bei der Untersuchung des Zentrifugationsrückstandes aus der Aufarbeitung der Plazenten war das Dihydrocapsaicin (55 %) vor Capsaicin (25 %) und Nordihydrocapsaicin (20 %) das Hauptcapsaicinoid. Deshalb wäre hier eine Bestimmung der Acyl-Thioester-Fractionen besonders interessant gewesen. Vermutlich konnten bedingt durch die geringen Gehalte an Capsaicinoiden auch deren Vorstufen nicht nachgewiesen werden.

### 5.2.3 Einführung der Doppelbindung in die 8-Methyl-6-nonansäure

Es fiel als Besonderheit auf, dass auch der Pool der Acyl-ACP's den ungesättigten Fettsäurerest der 8-Methyl-*trans*-6-nonansäure enthält. Die Einführung der Doppelbindung muss schon im FAS II-Komplex erfolgen. Damit ist klar, dass durch eine Desaturase die *trans*-Doppelbindung eingeführt wird, bevor Fatty-Acid-Thioesterase (FAT) die Fettsäure freisetzt. Für eine Desaturase, die zu diesem Zeitpunkt eine Doppelbindung in *trans*-Konfiguration einführt gibt es bislang keine Hinweise. In *Arabidopsis thaliana* findet die Einführung einer alleinigen *trans*-Doppelbindung zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich während die Fettsäure an Phosphatidylglycerin gebunden ist, statt (132). Der Punkt der Einführung der *trans*-Doppelbindung könnte von regulatorischer Bedeutung für die Capsaicinoid-Biosynthese sein.

Die Arbeitsgruppe von Iwai (143) vermutete wegen des konstanten Fettsäuremusters der Capsaicinoide während der Fruchtreifung, dass keine Veränderung der an Vanillylamin gebundenen Fettsäuren mehr stattfindet. Für die beiden Hauptcapsaicinoide bestätigten Jurenitsch et al., dass weder die Einführung der Doppelbindung noch eine Hydrierung an der im Vanillylamin gebundenen ungesättigten Fettsäure erfolgt (144). Die Doppelbindung muss also vor der Kondensation zum Vanillylamid im Acyl-Rest der Fettsäure vorhanden sein.

Auch die Arbeitsgruppe Blum et al. (145) vermutet die Einführung der Doppelbindung vor der Kondensation zum Capsaicinoid und postulierte die Desaturase in einem Schema zum Biosyntheseweg der Capsaicinoide, zwischen dem 8-Methylnonansäure-CoA und dem daraus entstehenden 8-Methyl-6-nonensäure-CoA.

Prasad et al. (120) veröffentlichten 2006 ein Biosyntheschema, welches eine 8-MNAD (8-methyl-nonanoic acid dehydrogenase) aufführt. In der Diskussion wird 8-Methylnonansäure als Vorstufe von 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure bezeichnet. Dies wurde weder durch ein Zitat noch durch experimentelle Daten belegt.

Da die 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure bereits im Acyl-ACP-Pool zu finden ist, muss die hier „zuständige“ Desaturase zu einem früheren Zeitpunkt der Biosynthese aktiv sein.

Ein nächster Schritt wäre die subzelluläre Fraktionierung von Epidermis-Zellen etwa 30 Tage alter Chilifrüchte und die Aufreinigung und Sequenzierung der Enzyme. Ein Datenbankvergleich könnte etwaige Sequenzhomologien zu Desaturasen aufdecken.

#### 5.2.4 Bestimmung des Acyl-ACP-Musters

Macht man von dem Punkt der Bildung der Acyl-CoA's aus gedanklich einen Schritt in der Biosynthese rückwärts, so ist der Blick auf die Kettenverlängerung und somit die ACP-gebundenen Fettsäuren gerichtet.

Zur Untersuchung des Acyl-CoA-Pools liegen relativ wenige Messergebnisse vor, so dass sich kaum zuverlässige Rückschlüsse aus den Ergebnissen ziehen lassen. Einige Beobachtungen könne liefern erste Interessante Erkenntnisse.

##### 5.2.4.1 Acyl-ACP-Muster in *Capsicum chinense* var. *Habanero*

Betrachtet man die Bestimmung des Capsaicinoidmusters aus Einzelfrüchten bei *Capsicum chinense* var. *Habanero*, so erkennt man ein sehr einheitliches Capsaicinoidmuster (Abbildung 4-35; S. 85).

Das Verteilungsmuster der Acyl-ACP's unterscheidet sich dennoch vom Muster der Acyl-CoA's. Da die Bestimmung der drei Parameter (Acyl-ACP, Acyl-CoA, Capsaicinoide) jeweils als eine Momentaufnahme zu unterschiedlichen Stadien der Capsaicinoid-Biosynthese aufzufassen ist, stellt sich dieser Umstand als umso bemerkenswerter dar. Findet man zu unterschiedlichen Zeitpunkten (gemessen in Tagen nach Blüte) in den Früchten (im Median) ähnliche Capsaicinoidmuster, so muss eine Regulation zur Bildung bestimmter Capsaicinoide vorliegen.

Würden aus den zur Verfügung stehenden, Acyl-Thioestern ohne Beschränkung Capsaicinoide gebildet, so könnte das entstehende Capsaicinoidmuster nicht die vorliegende Homogenität aufweisen.

##### 5.2.4.2 Acyl-ACP-Muster in *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

Im Fall von *C. annuum* var. *Jalapeno* sind die Gehalte an Acyl-Thioestern (Abschätzung aus den Signalintensitäten) niedriger als bei der schärferen Varietät *Habanero*. Vermutlich sind die größeren Unterschiede der Thioester-Fractionen der dadurch bedingten verminderten Präzision der Messungen geschuldet. In den *Jalapeno*-Früchten zeigte sich auch nicht ein gleichartig homogenes Capsaicinoidmuster wie in *Habanero*-Früchten.

Wie bei der Untersuchung der Habanero-Früchte kann man hier eine Übereinstimmung des Acyl-CoA-Musters mit dem Capsaicinoid-Muster beobachten (Abbildung 4-50, S. 97). Der ACP-Pool zeigt hingegen ebenfalls ein abweichendes Muster.

Das Acyl-CoA Muster zeigt den Thioester mit 7-Methyloctansäure-Rest als Hauptkomponente (46 %), was sehr gut mit dem Capsaicinoidmuster korreliert. Das Acyl-ACP Muster hingegen bildet die drei Thioester zu jeweils gleichen Anteilen ab. Es ist also auch in diesem Fall nicht zu sagen, welche Einflussgröße die Veränderung der Acyl-Thioester Pools hervorruft.

Aufgrund der Anzahl der Messungen, ist es unklar, wie repräsentativ die Werte wirklich für die unterschiedlichen Zeitpunkte sind. Um diese Effekte besser interpretieren zu können besteht weiterer Forschungsbedarf.

### 5.2.5 Bestimmung des Acyl-CoA-Musters

Die Acyl-CoA Fraktion wurde aufgrund des unterschiedlichen Fällungsverhalten im Vergleich zu den Acyl-ACP's nicht quantitativ erfasst. Das sollte jedoch nicht zu einer Diskriminierung einer der drei Acyl-CoA's geführt haben, denn die Acyl-CoA's unterscheiden sich lediglich um ein Kohlenstoffatom bzw. eine Doppelbindung im Fettsäurerest (bei einem Molekulargewicht zwischen 900 und 1000 g/mol). Der relativ kleine Fettsäure-Molekülteil hat vermutlich einen geringen Einfluss auf das gesamte Acyl-Coenzym A.

Die Korrelation des Fettsäuremusters der Acyl-CoA's mit dem Fettsäuremuster der Capsaicinoide unterstützt Ergebnisse aus den Untersuchungen durch Fujiwake et al. (131), die zeigten, dass Acyl-CoA's 6,4 mal schneller zu Capsaicinoiden umgesetzt werden als die entsprechenden freien Fettsäuren. Daraus wurde geschlossen, dass bei der Kondensation der Fettsäuren mit Vanillylamin zum Capsaicinoid die Fettsäuren als CoA-Derivate vorliegen. Das Fettsäuremuster der Capsaicinoide wird nach Fujiwake et al. nicht durch die Spezifität der Capsaicin-Synthase (CS) bestimmt, sondern vermutlich durch den Pool an Acyl-CoA's determiniert.

#### 5.2.5.1 Acyl-CoA-Muster in *Capsicum chinense* var. *Habanero*

Das ermittelte Muster der Acyl-CoA's entspricht dem Muster der Capsaicinoide, die von der Pflanze bis zu diesem Zeitpunkt bereits gebildet wurden. So zeigt sich, dass bei *C. chinense* var. *Habanero orange* das Capsaicin mit mehr als 2/3 der Gesamtcapsaicinoide eindeutig das Hauptcapsaicinoid darstellt. Dementsprechend enthält die Haupt-Acyl-CoA-Fraktion den 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure-Rest. Umgekehrt stellt das NDC den geringsten Anteil der 3 Hauptcapsaicinoide (Median 5%; n=34, reife Einzelfrüchte) und damit übereinstimmend ist der Anteil des Acyl-CoA's mit 7-Methyloctansäure-Rest (8-11%; n=3 Fruchtepools) auch der niedrigste der 3 Thioester.

#### 5.2.5.2 Acyl-CoA-Muster in *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

Das Capsaicinoidmuster von *C. annuum* var. *Jalapeno* unterscheidet sich stark von der Verteilung der Capsaicinoide in Habanero-Früchten. So ist das Capsaicin mit 48 % (Median, n=92, reife Einzelfrüchte) auch das Hauptcapsaicinoid und der Anteil von DC (33 %) ist in etwa vergleichbar mit den Habanero-Werten, aber der NDC-Anteil ist mit 18 % deutlich erhöht. Das Capsaicinoidmuster ist also zu Ungunsten von C in Richtung NDC verschoben im

Vergleich zu Habanero-Früchten. Sieht man sich die Verteilung der Acyl-CoA's an, so ist diese Verschiebung hier in einer noch stärkeren Ausprägung zu beobachten, denn der Anteil der Thioesters mit dem 7-Methyloctansäure-Rest variiert von 28-36% (n=3 Fruchtepools).

Für beide Varietäten lässt sich übereinstimmend konstatieren, dass das ermittelte Acyl-CoA-Muster eine starke Korrelation mit dem Muster der Capsaicinoide aufweist, welche bis zu diesem Zeitpunkt gebildet wurden.

### 5.2.6 Weitere Aspekte zur Bestimmung der Acyl-Thioester

Da die Acyl-Thioester lediglich in einem begrenzten Zeitraum während der Capsaicinoid-Biosynthese und ausschließlich im Plazenta-Gewebe scharfer Chili-Früchte nachgewiesen werden konnten, kann man davon ausgehen, dass es sich um Vorstufen der Capsaicinoide handelt.

Die Weiterentwicklung der Analytik zum Nachweis der Acyl-Thioester in Einzelfrüchten könnte eine Veränderung des Thioester-Pools in Relation zur Fruchtreife zeigen und weitere Anhaltspunkte für diese These liefern. Ein Ansatz zur Analytik von Acyl-Thioestern im Bereich <0,2 pmol sollte die von Gao et al. vorgestellte LC/MS-Methode sein (172). Wenn diese für tierisches Gewebe ausgearbeitete Methode auf Pflanzen-Matrix übertragen werden kann und Isotopen-markierte Standards zur Verfügung stehen, dann ist die Untersuchung von Einzelfrüchten realisierbar.

Bei der Bestimmung von Einzelfrüchten könnte dann auch die Diskrepanz zwischen dem stabilen Capsaicinoidmuster (über den Zeitraum der verschiedenen Entwicklungsstadien der Chili-Früchte) und dem deutlich unterschiedlichen Thioester-Muster besser untersucht werden.

### 5.2.7 Bestimmung der Capsaicinoid-Muster

Bei der Vergleichsmessung der Capsaicinoidmuster mit einer etablierten, zuverlässigen HPLC-Methode (7.1; S. 128) fiel eine Veränderung des Capsaicinoidmusters bei *C. annum* var. Jalapeno auf.

Aus der Bestimmung des Capsaicinoidmusters aus 92 Einzelfrüchten ist bekannt, dass Capsaicin mit einem Anteil von 48 % im Median das Hauptcapsaicinoid ist. Die Ernte dieser Früchte erfolgte im Januar 2007 von 9 Monate alten Pflanzen. Dieser Anteil an Capsaicin im Capsaicinoid-Pool wurde auch im Februar in Früchten dieser Pflanzen gefunden. Weitere 3 Monate später ist das Capsaicinoidmuster jedoch stark verändert und DC (44 %) stellt vor C (38 %) und NDC (18 %) das Hauptcapsaicinoid dar. In diesem Zeitraum sind zum einen das Alter der Pflanzen und zum anderen die jahreszeitlich bedingte Änderung der Licht- und Temperaturverhältnisse Variablen die sich geändert haben.

Die Untersuchung dieser Beobachtung im Rahmen der Untersuchung von Einzelfrüchten könnte gegebenenfalls weitere Erkenntnisse zur Regulation der Biosynthese führen.

Das Capsaicinoid-Muster der Habanero-Früchte zeigte sich hingegen als einheitlich und über die Zeit der Untersuchungen hin konstant.

## 6 Zusammenfassung

Für die Untersuchung der Vorstufen der Capsaicinoide in *Capsicum*-Pflanzen war authentisches Pflanzenmaterial definierter Herkunft eine wichtige Voraussetzung. Im hochschuleigenen Gewächshaus gelang die Kultivierung von 4 verschiedenen Varietäten. Es wurden zwei besonders scharfe Spezies (*Capsicum annuum* var. *Jalapeno* und *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*) mit relativ großen Früchten ausgewählt, um somit die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Vorstufen der Capsaicinoide zu erhöhen. Mit der Spezies *Capsicum pubescens* var. *Yellow Tree Pepper Rocot* standen Früchte zur Verfügung, die ein stark unterschiedliches Capsaicinoidmuster aufwiesen, denn hier war das Dihydrocapsaicin das Hauptcapsaicinoid. Eine schärfefreie Sorte (*Capsicum annuum* var. *Tinkerbelle*) komplettierte die Gruppe der untersuchten Pflanzen und diente der Absicherung der Ergebnisse.

Mit der eigens modifizierten Methode, die Kopka et al. entwickelten um Acyl-ACP's in Spinatblättern zu analysieren, konnten zum ersten Mal in *Capsicum*-Früchten Acyl-Thioester nachgewiesen werden. Deren Aufreinigung erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie. Nach Derivatisierung der Acyl-Thioester zu *N*-Butylamiden wurden deren Verteilungsmuster mittels GC/MS gemessen. Damit gelang erstmalig der Nachweis von Thioestern, die den gleichen mittelkettigen, verzweigten Fettsäurerest wie die 3 Hauptcapsaicinoide haben.

Für eine zweifelsfreie Identifizierung der Fettsäurestruktur der Thioester wurden Standards (*N*-Butylamide der Fettsäuren) synthetisiert und charakterisiert (GC/MS, <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR). Umfangreiche Kontrollexperimente belegten, dass durch freie Fettsäuren, Triglyceride und andere Lipidkomponenten, sowie durch bereits in der Frucht gebildete Capsaicinoide keine falsch-positiven Ergebnisse auftreten können. Die Kontrollexperimente belegten ebenso, dass die Acyl-ACP-Fraktion, welche das vorrangige Untersuchungsziel darstellte, nicht durch die Acyl-CoA-Fraktion verunreinigt war.

Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass der Pool der Acyl-ACP's den Fettsäurerest des Capsaicins (nämlich 8-Methyl-6-*trans*-nonensäure) enthält. Dies deutet darauf hin, dass im FAS II-Komplex in enger zeitlicher und räumlicher Nähe zur Fettsäuren-Kettenverlängerung eine Desaturierung des Fettsäurerestes geschieht. Das Muster der Capsaicinoide wird schon zum Zeitpunkt der Fettsäurebiosynthese determiniert.

Anders als bei den Untersuchungen von Kopka et al., wurde die Acyl-CoA-Fraktion nicht als unerwünschte Matrixkomponente verworfen, sondern ebenfalls charakterisiert.

Gleichzeitig wurde aus derselben Pflanzenmatrix jeweils das Capsaicinoidmuster mittels HPLC/Fluoreszenz ermittelt. Dadurch war es möglich eine Momentaufnahme der Capsaicinoid-Biosynthese zu verschiedenen Stadien zu erhalten:

1. Die Acyl-ACP-Fraktion stellt das Verteilungsmuster während der Fettsäurebiosynthese dar.
2. Die Acyl-CoA-Fraktion stellt den darauf folgenden Schritt des Verteilungsmusters während des Transportes respektive unmittelbar vor der Kondensation zum Amid (Capsaicinoid) dar.
3. Das Capsaicinoidmuster bildet die Endprodukte, die aus den Thioester-Vorstufen resultieren, ab.

Die Thioester mit den Fettsäureresten der 3 Hauptcapsaicinoide, wurden nur in Plazenten unreifer, scharfer Früchte nachgewiesen und zeigten somit auch eine räumliche und zeitliche Korrelation mit der Capsaicinoid-Biosynthese. In scharfen aber reifen Früchten ließen sich keine Acyl-Thioester mehr nachweisen. In Früchten von milden bzw. schärfefreien Varietäten, wurden die Acyl-Thioester mit den Fettsäureresten 7-Methyloctansäure, 8-Methylnonansäure und 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure ebenfalls nicht nachgewiesen. Nach einer Lagerzeit der Früchte von 2 Tagen nach Ernte im Kühlschrank können keine Acyl-Thioester mehr nachgewiesen werden.

Die Acyl-Thioester können als biosynthetische Vorstufen der Capsaicinoide angesehen werden. Das Fettsäuremuster der Acyl-Thioester bestimmt das Capsaicinoidmuster. Die von Prasad et al. (120) vorgeschlagenen freien Fettsäuren als Vorstufen der Capsaicinoide können nicht bestätigt werden, da keine freien Fettsäuren in der Plazenten-Matrix nachweisbar war. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurden die von Prasad et al. analysierten Fettsäuren während der Umesterung mit NaOH/BF<sub>3</sub> aus den Capsaicinoiden gebildet und stellen analytische Artefakte dar.

Der Acyl-CoA-Pool wird bedingt durch die Probenaufarbeitung bei der vorliegenden Vorgehensweise nicht vollständig erfasst. Der beim Aufschluss der Pflanzenmatrix mittels Trichloressigsäure lösliche Teil wurde noch nicht untersucht. Die bisher erhaltenen Daten zeigen ein ähnliches Muster wie die Acyl-ACP's. Für zuverlässige Gehaltsermittlungen sind mit Stabilisotopen-markierte Thioester notwendig. Beim Vergleich der Fettsäureverteilung in den Thioester-Pools mit denen in den Capsaicinoiden desselben Pflanzenmaterials zeigte sich jeweils eine Korrelation. Dies wurde so erwartet.

Die Fettsäurereste der drei Hauptcapsaicinoide wurden in den Speicherlipiden der Samen von *Capsicum annuum* var. *Jalapeno* nicht nachgewiesen.

## 7 Arbeitsvorschriften

### 7.1 HPLC-Fluoreszenz

Die Messung der Capsaicinoide erfolgte mittels des in Tabelle 7-1 dargestellten HPLC-Systems. Zur Identifizierung wurden zwei Standards verwendet. Der erste dieser Standards (Capsaicin, natürlich, Fa. Roth, Karlsruhe) ist eine Mischung verschiedener Capsaicinoide natürlichen Ursprungs. Hierin enthalten ist zu etwa 65 % Capsaicin, ca. 30 % Dihydrocapsaicin und in geringen Anteilen Nordihydrocapsaicin und andere Minorcapsaicinoide.

Der zweite verwendete Standard (Dihydrocapsaicin, 90 %, Fa. Sigma, Taufkirchen) ist das Hydrierungsprodukt aus der Umsetzung des „natürlichen“ Capsaicins, welches deshalb auch lediglich eine Mischung verschiedener Capsaicinoide mit gesättigtem Fettsäure-Rest ist.

**Tabelle 7-1 HPLC-System zur Bestimmung der Capsaicinoidgehalte**

<b>HPLC-System</b>	Solvent Delivery Module LC-6A Sample Injector Module SIL 6A System Controller SCL-6A Column Oven CTO-6A (jeweils Shimadzu, Duisburg) Interface Autochrom CSI 162
<b>Detektor</b>	Fluoreszenz-HPLC-Monitor RF551 mit 12 RL Durchflusszelle (Shimadzu, Duisburg) EX= 280nm, EM= 320 nm
<b>Trennsäule</b>	250x4 mm LiChroCART® LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, endcapped (VWR International, Darmstadt)
<b>Vorsäule</b>	RP-18, 4x4 mm, 25 µm (VWR International, Darmstadt)
<b>Datenaufzeichnung</b>	APEX® Chromatography- Workstation, Typ M 625-15, Version 3.10a (Autocrom Inc.)
<b>Eluent</b>	Acetonitril/Wasser/Essigsäure (940/1060/10,v/v/v) isokratisch (ca. 10 min mit Helium entgast)
<b>Fluss</b>	1,2 mL/min
<b>Säulentemperatur</b>	30°C

### 7.1.1 Qualifizierung der Analyten

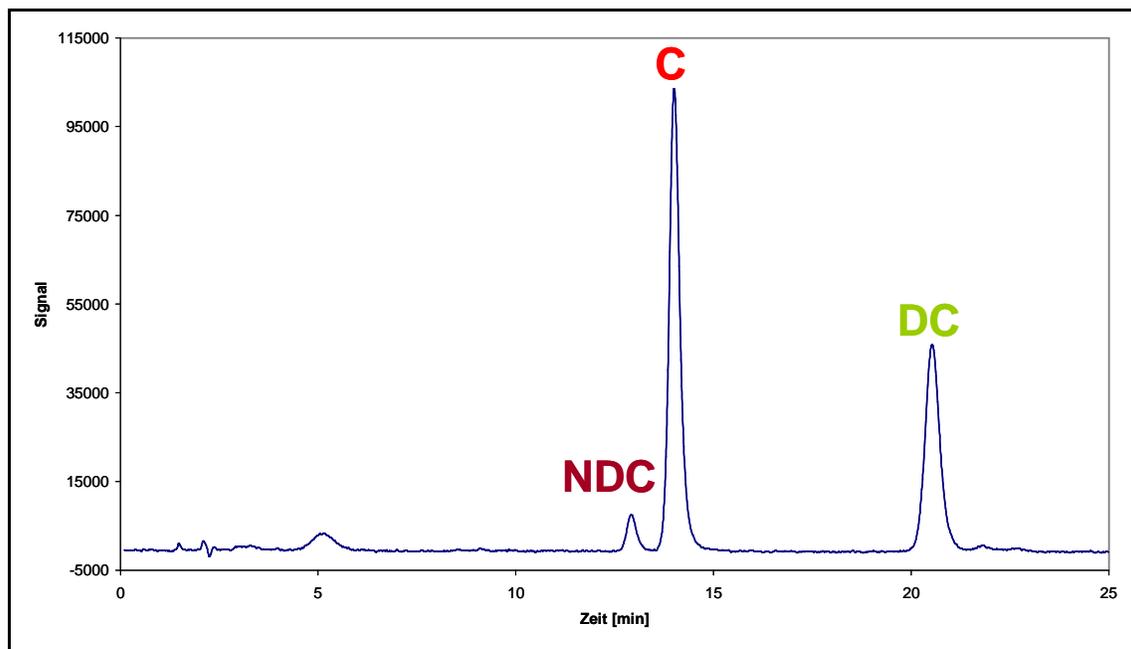


Abbildung 7-1 HPLC-Fluoreszenz Chromatogramm Capsaicin (ca. 65 %, natürlich, Fa. Roth)

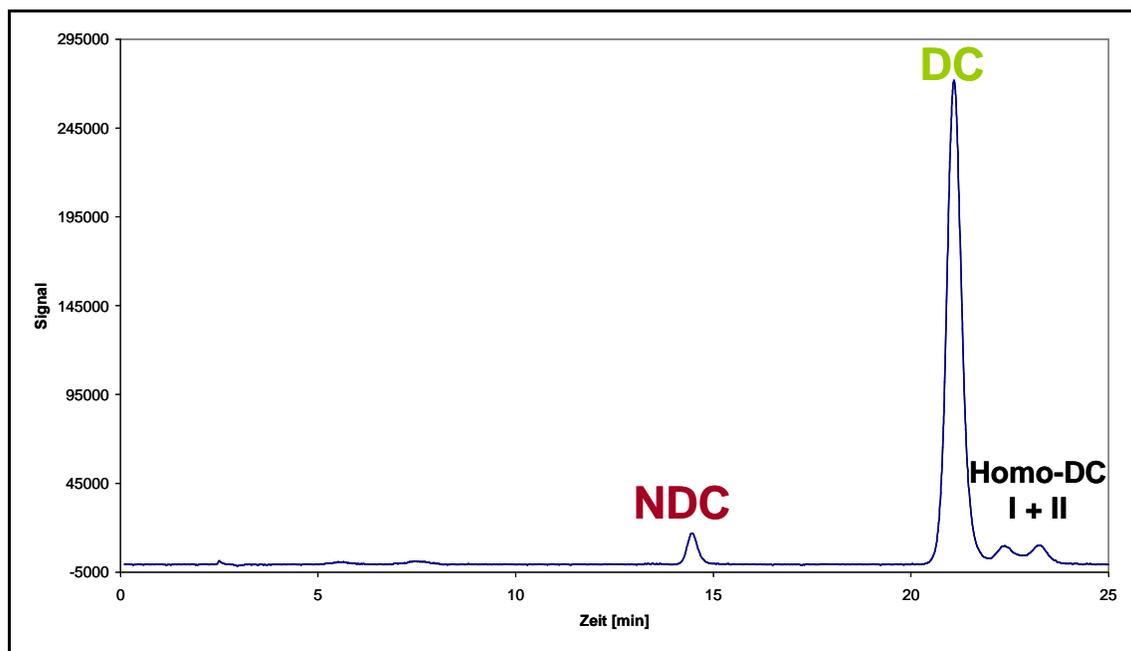


Abbildung 7-2 HPLC-Fluoreszenz Chromatogramm Dihydrocapsaicin (90 % Fa. Sigma), weitere Komponenten sind NDC, Homodihydrocapsaicin I und II, welche per LC-TOF-MS identifiziert wurden.

Das Chromatogramm (Abbildung 7-3) zeigt die Messung eines methanolischen Extraktes einer reifen Frucht der Varietät *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*. Das Capsaicin ist hier die Hauptkomponente der Capsaicinoide. Nach einer Retentionszeit von 2 min (bis ca. 10 min) erkennt man im Chromatogramm Matrixbestandteile, die Fluoreszenz aufweisen.

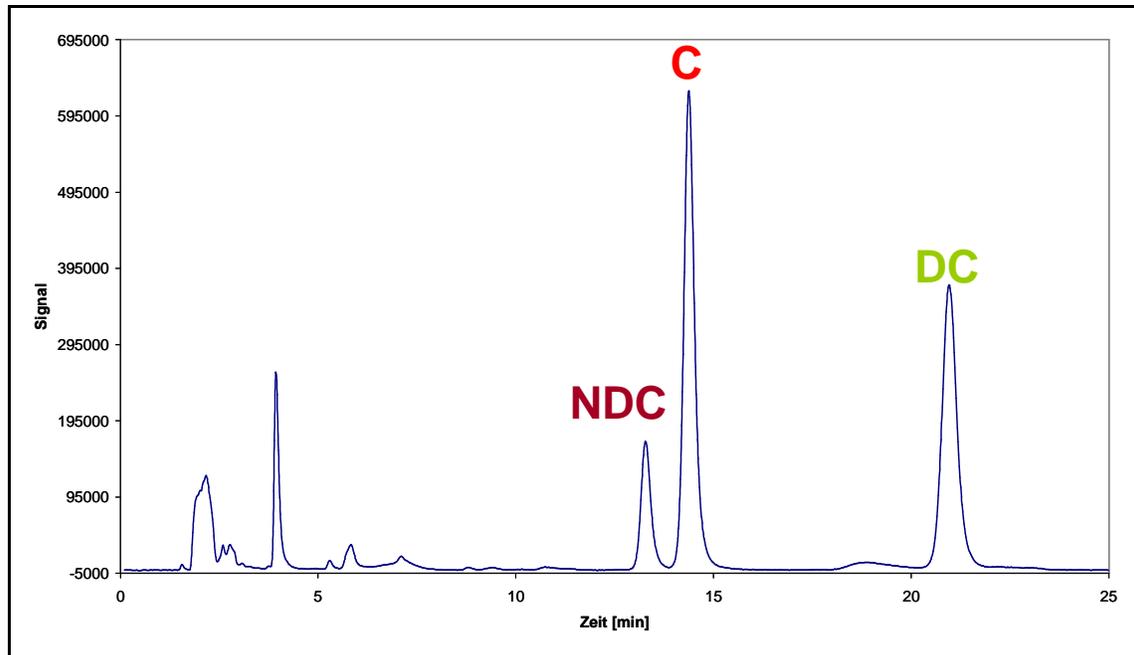


Abbildung 7-3 HPLC-Fluoreszenz Beispiel-Chromatogramm *Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

Bei dem Chromatogramm (Abbildung 7-4) handelt es sich um ein Beispiel für die Aufarbeitung einer reifen Frucht der Varietät *Capsicum chinense* var. *Habanero orange*. Da der Scharfstoffgehalt des methanolischen Extraktes bei dieser Varietät so hoch war, dass die Probe verdünnt werden musste, sind die Matrixinterferenzen zu Beginn des Chromatogramms hier nicht so deutlich zu erkennen.

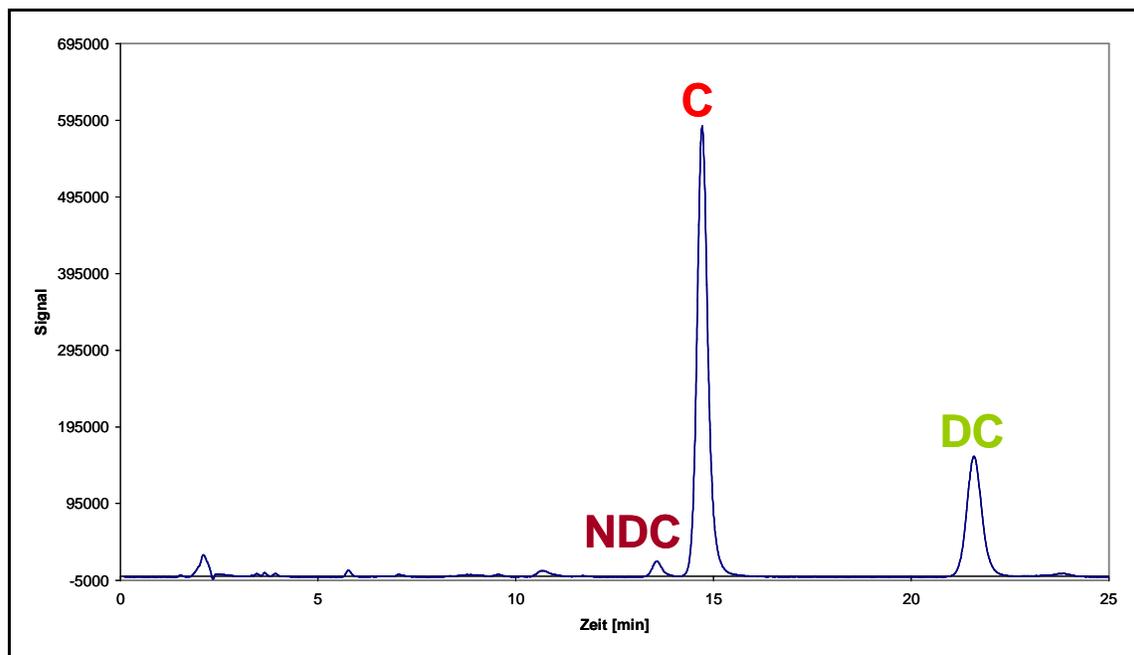


Abbildung 7-4 HPLC-Fluoreszenz Beispiel-Chromatogramm *Capsicum chinense* „Habanero“

### 7.1.2 Quantifizierung der Analyten

Capsaicinoide zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm eine Fluoreszenz, welche bei einer Wellenlänge von 320 nm detektierbar ist. Als Standard wurde Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) gewählt, da dieses wie die Capsaicinoide über einen Vanillyl-Rest verfügt, welcher die fluoreszierende Eigenschaft besitzt. Aufgrund der gleichen Struktur, wird näherungsweise ein Detektorresponse von 1 angenommen.

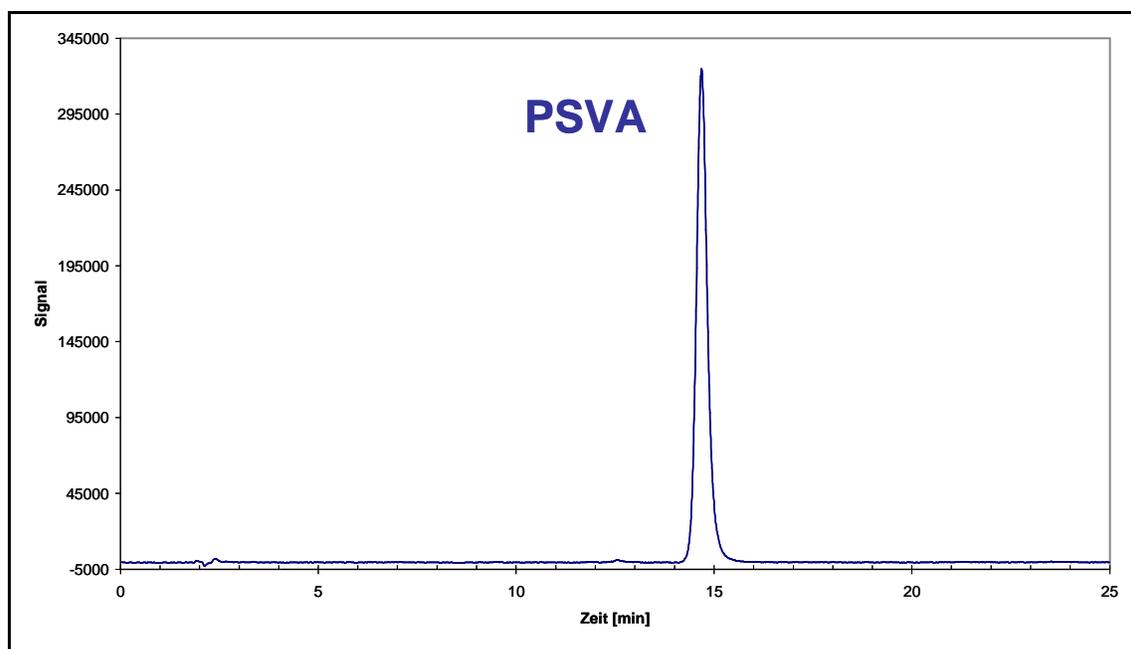


Abbildung 7-5 HPLC-Fluoreszenz Beispiel-Chromatogramm Pelargonsäurevanillylamid (PSVA), Kalibrierstandardlösung 1:20

Die Kalibrierlösungen des Standards wurden in Methanol/Wasser (50/50 v/v) angesetzt. Für eine Stammlösung wurden 37,5 mg PSVA eingewogen, in einen 100 mL-Messkolben überführt und mit Lösungsmittels aufgefüllt. Hiervon wurden 5 mL (Vollpipette) auf 250 mL verdünnt. (=Standardlösung I) Von dieser Lösung ausgehend wurden alle weiteren Kalibrierlösungen angesetzt.

Tabelle 7-2 Kalibrationslösungen PSVA zur Quantifizierung der Capsaicinoide

Volumen der Standardlösung I [mL]	Verdünnungsfaktor	Verdünnung auf ... mL	Konzentration [mg/100mL]
5	1:50	250	15,0
5	1:20	100	37,5
5	1:10	50	75,0
5	1:5	25	150,0
5	1:4	20	187,5
5	1:2	10	375,0

Während der Messungen wurden in der Regel abwechselnd 1 Standard und anschließend 3-4 Proben gemessen, um sicherzustellen, dass abweichendes Ansprechverhalten des Detektors über den Zeitraum der Messung (drift) keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Der

Gesamtgehalt an Capsaicinoiden wird als Summe aus den Gehalten an Nordihydrocapsaicin, Capsaicin und Dihydrocapsaicin berechnet. Minorkomponenten waren nicht detektierbar und werden beim Gesamtgehalt nicht berücksichtigt.

Zur Auswertung über die Kalibriergerade wurde folgende Formel verwendet:

$$\omega_n = \frac{(y_n - b) \cdot V_p \cdot 20}{V_i \cdot 20}$$

$\omega_n$  = Konzentration der Einzelkomponenten [ $\mu\text{g}/\text{Frucht}$ ]

$y_n$  = Peakfläche der Einzelsubstanz [Flächeneinheit Integrator]

$b$  = Ordinatenabschnitt der Kalibriergerade [ Flächeneinheit Integrator]

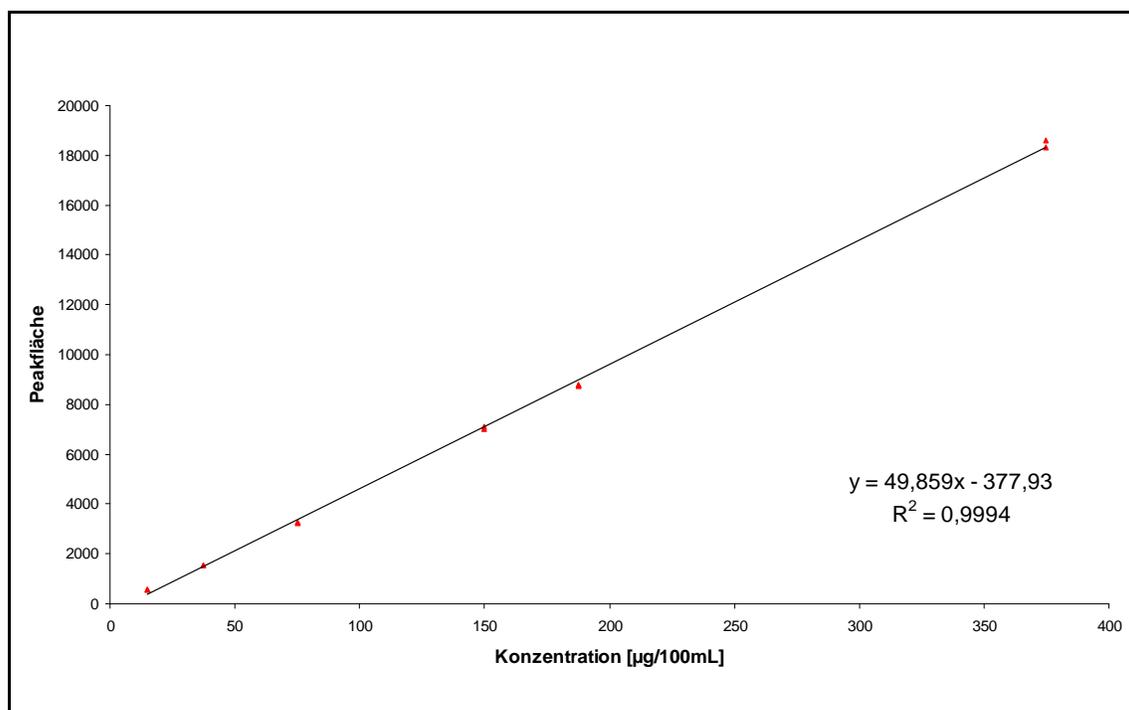
$V_p$  = Verdünnung der Probe, wobei z.B. bei einer 1:10 Verdünnung der Wert 10 eingesetzt wird.

$V_i$  = Injektionsvolumen [ $\mu\text{L}$ ]

$m$  = Steigung der Kalibriergeraden [Flächeneinheit Integrator /  $\mu\text{g}/100\text{mL}$  ]

20 = Standardinjektionsvolumen

Der Wert „20“ entspricht dem Standardinjektionsvolumen. Da bei manchen Proben weniger injiziert wurde, entspricht der Quotient dem Standardinjektionsvolumen/ Injektionsvolumen einer weiteren Verdünnung. Da die Capsaicinoide der Einzelfrüchte in 100 mL Lösung vorliegen und die Kalibriergerade auch auf 100 mL bezogen ist, kann hierbei der ermittelte Gehalt direkt auf die Einzel-Frucht bezogen werden und muss nicht noch weiter umgerechnet werden. Wenn allerdings der Gehalt pro Gramm Frucht erhalten werden soll, so muss  $\omega_n$  noch durch die Masse der jeweiligen Einzelfrucht dividiert werden.



**Abbildung 7-6 Kalibration mit PSVA (ohne Matrix) zur Bestimmung der 3 Hauptcapsaicinoide mittels HPLC-Fluoreszenz**

Um den Einfluss der Matrix auf die Quantifizierung zu untersuchen, wurde die Kalibration auch mit einer Capsaicin-armen Matrix durchgeführt. Hierzu wurden 2 Gemüsepaprika (*Capsicum annuum*, eine rote und eine grüne Frucht) weitgehend gemäß Abschnitt 7.3 getrennt aufgearbeitet. Die Früchte wurden dazu mit einem Haushaltsgerät (Moulinette, Fa. Moulinex) zerkleinert und 50 g der Pulpe wurden in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 150 ml Methanol aufgeschlämmt. Nach 30 min wurde die Suspension abgenutscht und mit 100 ml Methanol in einen 500 ml Messkolben überführt. Anschließend wurde die Matrixlösung mit Reinstwasser ad 500 ml aufgefüllt.

Zur Erstellung der Kalibrationslösungen wurden dann entsprechend die Matrix-Lösungen (rot und grün; MeOH/Wasser ~50/50 (v/v)) verwendet um die Kalibrierung erneut durchzuführen. Für diese drei Systeme (Kalibration ohne Matrix und in Matrix aus grünen bzw. roten Gemüsepaprika) wurden gemäß DIN 32645 (173) Verfahrenskenndaten wie Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze ermittelt:

**Tabelle 7-3 Verfahrenskenndaten der Kalibrationsgeraden-Methode zur Ermittlung der NG, EG und BG nach DIN 32645.**

<b>Matrix</b>	<b>Nachweisgrenze µg/100 ml</b>	<b>Erfassungsgrenze µg/100 ml</b>	<b>Bestimmungsgrenze µg/100 ml</b>	<b>Korrelationskoeffizient der Kalibrationsgeraden</b>
<b>ohne</b>	7,5	15,1	21,7	0,9994
<b>grün</b>	13,3	26,6	38,2	0,9982
<b>rot</b>	5,4	10,9	15,6	0,9997

## 7.2 LC-TOF-MS

Für die Charakterisierung des verwendeten Octanoyl-CoA Standards konnte für einige Messungen auf ein HPLC-System mit Flugzeitmassenspektrometer zurückgegriffen werden. Dieses Gerät stand dem Arbeitskreis routinemäßig nicht zur Verfügung. Die Geräteparameter finden sich in Tabelle 7-4. Während der chromatographischen Trennung wird die Absorption bei 260 nm, das Totalionen-Chromatogramm von  $m/z$  50 bis 1000 und gleichzeitig jede Massenspur einzeln aufgezeichnet.

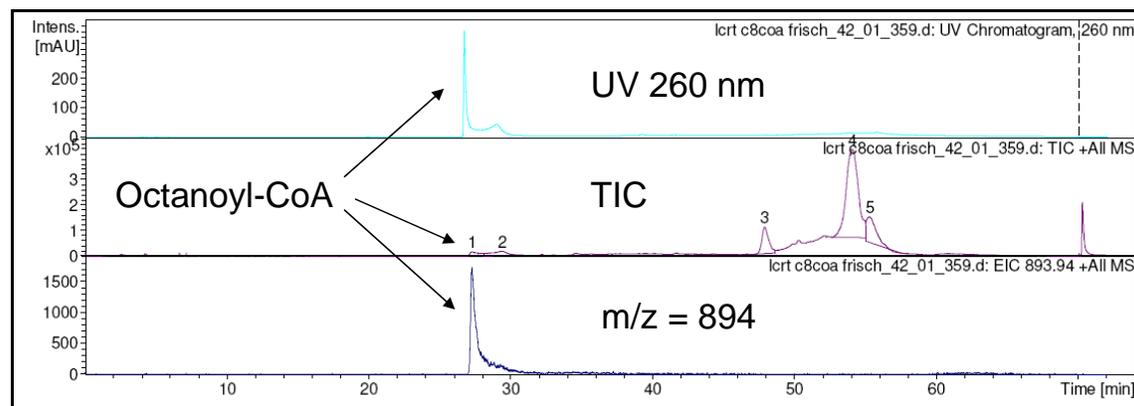
Flüssigchromatographie	Agilent 1100 Series
Time of Flight Massenspektrometer	Bruker microTOF
Säule	M2 PerfectSil Target ODS-3; 3 $\mu$ m; 100*4,6 mm
Eluent A	Reinstwasser; 25 mM Ammoniumacetat; 0,5 % Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril; 0,5 % Ameisensäure
Flussrate	0,25 ml/min

**Tabelle 7-4 Geräteparameter LC-TOF-MS**

Die Methode zur Untersuchung von Acyl-CoA's wurde in Anlehnung an Kasuya et al. (174) optimiert. Das Programm zur Gradienten-Elution des binären Gemisches zeigt Tabelle 7-5.

**Tabelle 7-5 Programm des binären Eluenten-Gemisches**

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
20	60	40
30	20	80
40	20	80
42	0	100
47	0	100
70	90	10



**Abbildung 7-7 UV-Spur, Totalionen-Chromatogramm und Massenspur  $m/z = 894$**

Das hier abgebildete Chromatogramm (Abbildung 7-7) zeigte die beste, unter diesen Bedingungen zu erzielende Trennung. So war es nicht möglich die Verbindungen, welche im Zeitfenster zwischen 45 und 60 min eluieren, bis auf die Basislinie zu trennen oder zu identifizieren. Das Octanoyl-CoA eluierte mit einer Retentionszeit von 27,2 min und wurde über das Massenspektrum (Abbildung 7-8) eindeutig identifiziert.

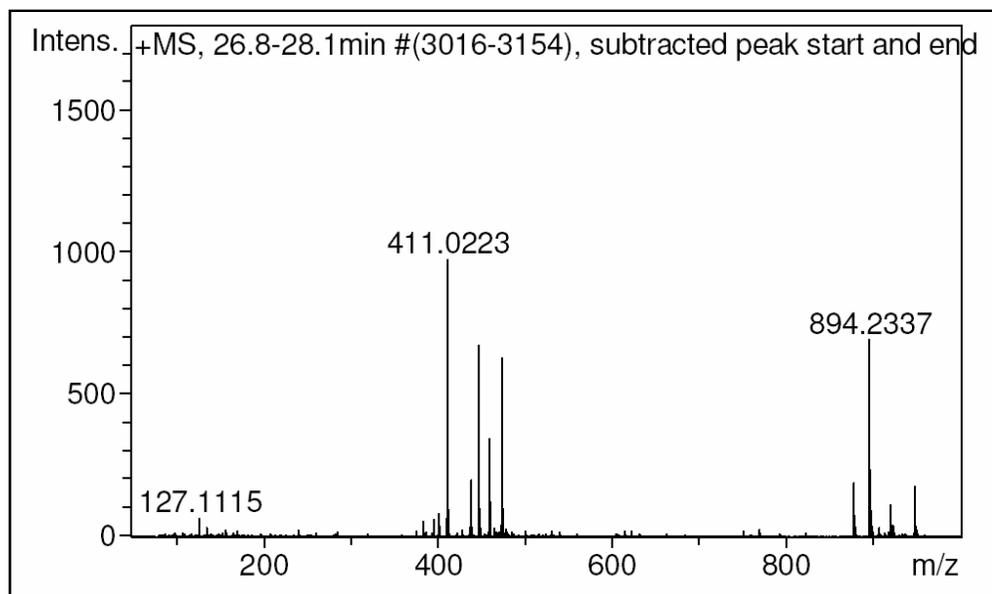


Abbildung 7-8 Massenspektrum n-Octanoyl-CoA, LC-TOF-MS, ESI im (+)-Mode

### 7.3 Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Capsaicinoide in Einzelfrüchten

Nach der Ernte der Einzelfrüchte wurden diverse Parameter notiert. So ermittelte man die Position der Frucht an der Pflanze [Nr. des Nodiums], Fruchtfarbe, Länge der Frucht [cm], Fruchtgewicht [g] und gegebenenfalls das Alter der Frucht [DAF, Tage nach Blüte]. Die Aufarbeitung der Früchte schloss sich direkt an die Ernte an und erfolgte immer am selben Tag. Hierzu wurde die Frucht ohne Stiel mit einem Skalpell auf einem Uhrglas in kleine Stücke grob zerkleinert (ca. 5 x 5 x 5 mm). Danach überführte man die zerkleinerte Frucht quantitativ in einen Kunststoffzentrifugenbecher und spülte das Uhrglas mit dem Extraktionsmittel ab. Für die Extraktion verwendete man, je nach Fruchtgewicht, 30 ml unterschiedlich stark konzentrierter Methanol-Wasser-Mischungen. Damit glich man den Wassereintrag durch die Frucht aus und gewährleistete, dass auch bei unterschiedlichen Fruchtgewichten die Extraktion reproduzierbar ablief. Da der durchschnittliche Wassergehalt von Chili-Früchten bei 90 % liegt, ergaben sich für die eingesetzten Extraktionslösungen folgende Mischungsverhältnisse:

Tabelle 7-6 Konzentration der zur Extraktion der Capsaicinoide eingesetzten wässrigen Methanol-Lösung in Abhängigkeit vom jeweiligen Fruchtgewicht.

Fruchtgewicht	V (Wasser) [mL]	V (Methanol) [mL]	C (Methanol)
≤ 1g	9	30	77
1-2 g	8	30	79
2-3 g	7	30	81
3-4 g	6	30	83
4-5 g	5	30	86
5-6 g	4	30	88
6-7 g	3	30	91
7-8 g	2	30	94
8-9 g	1	30	97
9-10 g	0	30	100

Nach Zugabe der 30 ml Extraktionslösung lag bei allen Früchten eine vergleichbare Methanolkonzentration von etwa 75 vol. % vor. Dies gewährleistete identische Bedingungen bei der Extraktion. Die Mischung wurde danach mit dem Ultra-Turrax (ca. 1 min auf Stufe 7-8) zu einer homogenen Pulpe verarbeitet. Anschließend wurde das Dispergierwerkzeug mit 6 Pasteurpipettenfüllungen Methanol derart abgespült, dass die Spüllösung ebenfalls in das Zentrifugengefäß floss. Danach ließ man die Mischung 30 min verschlossen stehen und nutschte im Anschluss durch einen Büchnertrichter, in welchem ein mit Wasser angefeuchtetes Filterpapier liegt, ab. Mit weiteren 20 ml Methanol spülte man den Auslauf des Büchnertrichters nach und fing das Methanol ebenfalls in der Saugflasche auf. Den Inhalt der Saugflasche überführte man daraufhin in einen 100 ml Messkolben (mittels Glastrichter) und spülte 2-mal mit jeweils 10 ml Methanol nach. Nach dem Auffüllen des Messkolbens mit Methanol betrug der Wassergehalt ~1 %. Diese Lösung konnte verdünnt oder unverdünnt zu chromatographischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Um die Güte dieser Extraktionsmethode abschätzen zu können, wurden einige (n = 22) Filterkuchen samt Filterpapier einer erschöpfenden Extraktion mittels einer Soxhlet-Apparatur unterzogen. Hierzu wurde der Filtrerrückstand samt Filterpapier quantitativ in eine Extraktionshülse überführt und mit Methanol 5 h lang erschöpfend extrahiert. Die Extraktion wurde zu einem Zeitpunkt abgebrochen, bei dem es möglich war, den gesamten Inhalt des Vorlagekolbens in einen 50 ml Messkolben zu überführen. Nach dem Auffüllen mit Methanol bis zum Kalibrierstrich, wurde die Lösung ebenfalls chromatographisch untersucht. Dadurch konnte der zunächst nicht extrahierte Capsaicinoidgehalt ermittelt und zur Berechnung des Wirkungsgrades der einfachen Extraktion eingesetzt werden.

**Tabelle 7-7 Überprüfung des Wirkungsgrades der einfachen Methanol-Extraktion unter Einsatz der erschöpfenden Extraktion mittels Soxhlet-Apparatur**

Probe	einfache Extraktion Gesamtcapsaicinoid – Gehalt [ $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ]	Soxhlet- Extraktion Gesamtcapsaicinoid – Gehalt [ $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ]	Ergebnis der Soxhlet- Extraktion in [%]	Wirkungsgrad der einfachen Extraktion [ $\eta$ ]
1	1591	50,9	3,1	0,97
2	2016	51,9	2,5	0,97
3	563	27,4	4,6	0,95
4	438	242,9	35,7	0,64
5	3253	151,1	4,4	0,96
6	2528	110,1	4,2	0,96
7	154	20,0	<BG	n.b.
8	3808	19,7	<BG	n.b.
9	1980	94,9	4,6	0,95
10	1191	32,2	2,6	0,97
11	1483	16,9	<BG	n.b.
12	28	7,2	<BG	n.b.
13	19	7,2	<BG	n.b.
14	1749	27,8	1,6	0,98
15	3328	86,0	2,5	0,97
16	3745	110,3	2,9	0,97
17	175	7,3	<BG	n.b.
18	5758	52,9	0,9	0,99
19	916	19,2	<BG	n.b.
20	2305	14,3	<BG	n.b.
21	4695	44,6	0,9	0,99
22	114	7,9	<BG	n.b.

Der Wirkungsgrad der einfachen Extraktion wurde wie folgt berechnet:

$$\eta = \frac{W_{\text{einfach}}}{W_{\text{Soxhlet}} + W_{\text{einfach}}}$$

$W_{\text{(einfach)}}$  = Gehalt aus einfacher Extraktion [ $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ]

$W_{\text{(Soxhlet)}}$  = Gehalt aus Soxhlet- Extraktion [ $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ]

Der Tabelle (Tabelle 7-7) kann man entnehmen, dass bei der Untersuchung von 22 Proben ein Ausreißer (Probe Nr. 4) auftrat und 9 Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Die einfache Extraktion verläuft nahezu quantitativ. Dies bestätigt auch der mittlere Wirkungsgrad der einfachen Extraktion von 0,971 ( $n = 12$ ).

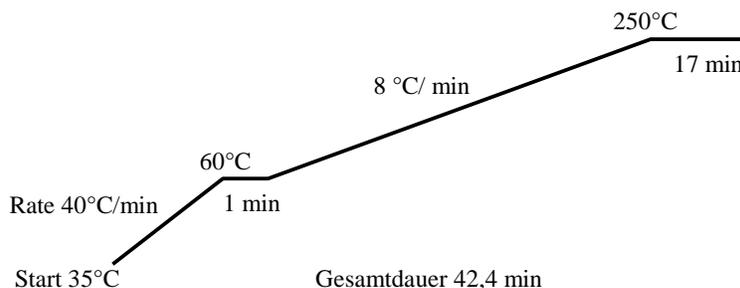
## 7.4 Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Capsaicinoide in Zentrifugationsrückständen

Zur Aufarbeitung des Zentrifugationsrückstandes, welche bei der Bestimmung der Acyl-Thioester als Pflanzenmatrix-Rückstand anfallen, wurde standardmäßig mit 30 ml Methanol extrahiert. Die Zerkleinerung per Skalpell konnte entfallen, zur besseren Durchmischung wurde jedoch nochmals mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung verlief gemäß 7.2. Zur Messung mussten die Capsaicinoidlösungen aus Zentrifugationsrückständen der Plazenten in der Regel mit Methanol verdünnt werden.

## 7.5 GC/MS

<b>Gaschromatograph</b>	HP 5980 Series II
<b>Massenselektiver Detektor</b>	HP 5989 MS Engine (Quadrupol / HED)
<b>Autosampler</b>	HP 7673
<b>Injektor</b>	Split/Splitless 250°C
<b>Vorsäule</b>	CS FS Phenyl-Sil-Desaktivierung (3 m * 0,25 $\mu\text{m}$ ID)
<b>Säule</b>	J&W DB-5 MS (30 m * 0,25 $\mu\text{m}$ Film * 0,25 mm ID)
<b>Trärgas</b>	Helium 1,2 ml / min
<b>Transferline</b>	250°C
<b>Ionenquelle</b>	200°C
<b>Ionisation</b>	Elektronenstoßionisation mit 70 eV
<b>Quadrupol</b>	100°C
<b>Vakuum</b>	ca. $3,5 \cdot 10^{-6}$ torr

Zur gaschromatographischen Trennung der *N*-Butylamide wird i.d.R. folgendes Temperaturprogramm verwendet:



### 7.5.1 Arbeitsvorschrift zur linearen Kalibration mit ISTD zur Bestimmung analytischer Grenzwerte

Einwaage: Es wurden 12,839 mg *N*-Butyloctanamid ( $M = 199$  g/mol) eingewogen und in 100 ml DIPE gelöst. Außerdem wurden 4,674 mg *N*-Butyloleoylamid eingewogen, mit 25 ml der *N*-Butyloctanamid Lösung ( $c = 0,12839$  mg/ml) versetzt und mit DIPE auf 50 ml aufgefüllt. Alle weiteren Verdünnungen wurden ebenfalls in 50 ml Messkolben angesetzt. Von dem ISTD wurden 6,773 mg eingewogen und in 100 ml DIPE gelöst.

Tabelle 7-8 Kalibration *N*-Butylamide

Verdünnung	V (Stammlsg. bzw. Standardlsg.) [ml]	ISTD [c= 67,73 µg/ml]	DIPE	c (C8:0- BA) [µg/ml]	c (C18:1- BA) [µg/ml]	c (ISTD) [µg/ml]
Stammlsg.	-	-	-	64,195	93,480	-
1/20	2,5	2,5 ml	ad 50	3,2098	4,6740	3,3865
1/25	2	2,5 ml	ad 50	2,5678	3,7392	3,3865
1/50	1	2,5 ml	ad 50	1,2839	1,8696	3,3865
1/100	0,5	2,5 ml	ad 50	0,6420	0,9348	3,3865
Standardlsg. 1/100*	0,5	2,5 ml	ad 50	0,3210	0,4674	3,3865
1/200	25 (Standardlsg.)*	2,5 ml	ad 50	0,3210	0,4674	3,3865
1/500	10 (Standardlsg.)*	2,5 ml	ad 50	0,1284	0,1870	3,3865

\*Für die Lösungen mit der 1/200 und der 1/500 Verdünnung wurde eine weitere Zwischenverdünnung von 1/100 von der Stammlösung vorgenommen und als Standardlösung bezeichnet.

Tabelle 7-9 Kalibration Butylamide Flächenwerte; 2 Injektionen

Verdünnung	FE 1 (C8:0-BA)	FE 2 (C8:0-BA)	FE 1 (C 18:1-BA)	FE 2 (C 18:1-BA)	FE 1 (ISTD)	FE 2 (ISTD)
1/20	25173353	25443775	5405222	4033834	41531003	42325187
1/25	19206789	18281942	3103828	2761052	42464166	40893862
1/50	7808496	7321469	1419324	1235958	42078265	40809806
1/100	3864385	3870694	392510	482593	47641235	45158152
1/200	1647331	1654542	149646	130008	48710911	48137455
1/500	467839	473707	0	0	46336212	47138390

## 7.6 Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Acyl-Thioester in Fruchtepools

Zur Bestimmung der Acyl-Thioester sind mindestens etwa 15 Chilifrüchte notwendig. Dies ist jedoch vom mittleren Fruchtgewicht abhängig. Es sollte eine Gesamtmasse an Plazenta + Scheidewände + Samen in der Größenordnung von 10 g Frischgewicht vorliegen.

Die Früchte wurden sukzessive geerntet, gewogen, der Länge nach mit dem Skalpell halbiert, das Perikarp vom Rest getrennt und ebenfalls gewogen und direkt im Anschluss wurden beide Matrices (Perikarp und Plazenta (enthält immer auch Scheidewände und Samen) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Danach wurde die Zweite Frucht geerntet und ebenfalls wie oben angeführt und bearbeitet. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis der Pool ausreichend groß zur Untersuchung der Acyl-Thioester ist. Die beiden Matrices wurden durch Dekantieren vom flüssigen Stickstoff getrennt und nacheinander im gefrorenen Zustand mit der Moulinette zerkleinert. Mit einem in flüssigen Stickstoff gekühltem Spatel überführte man die Plazenta-Matrix quantitativ in einen Kunststoffzentrifugenbecher. Die Perikarp-Matrix, die aus den Früchten gewonnen wurde, überwog den Anteil der Plazenta-Matrix. Aus diesem Grund wurde nach der

Zerkleinerung der noch gefrorenen Früchte mit der Moulinette die gleiche Masse an Perikarp in die Kunststoffzentrifugenbecher eingewogen, die auch an Plazenta-Matrix vorlag. Ergab die Ernte von 15 Früchten beispielsweise 18 g Plazenten, so wurde auch eine Einwaage von 18 g Perikarp getätigt.

Die beiden Matrices, welche sich noch in gefrorenem Zustand befanden, wurden mit 70 ml kalter Trichloressigsäure (50 g/l, 4 °C) versetzt und mit dem Ultra-Turrax zu einer homogenen Pulpe verarbeitet. Hierzu wurde zunächst bei mittlere Drehzahl (Stufe 5) des Ultra-Turrax durch eine Auf- und Abwärtsbewegung des Zentrifugenbechers die Probe dem Dispergierwerkzeug zugeführt. Nach etwa 2 Minuten war die Viskosität der Pulpe durch fortschreitenden Zellaufschluss so weit herabgesetzt, dass die Pulpe selbständig am Ultra-Turrax-Stab vorbeiströmte und keine weitere Bewegung des Zentrifugenbechers mehr notwendig war. Ab diesem Zeitpunkt wurde mit höherer Drehzahl (Stufe 7-8) für genau 2 Minuten (Stoppuhr) weiter homogenisiert. Das Dispergierwerkzeug wurde danach mit 5 ml Wasser (Millipore) abgespült, wobei die Flüssigkeit mit dem Zentrifugengefäß aufgefangen wurde.

Auf einer Waage wurden die Zentrifugenbecher (samt Deckel) mit Wasser auf 1 g genau tariert und verschlossen. Der erste Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 6000 min<sup>-1</sup> dauerte 20 min. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Nach der Zugabe von 50 ml Trichloressigsäure (10 g/l, 5 °C) wurden die Gefäße verschlossen, kräftig geschüttelt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Durch Zugabe von 50 ml 3-Morpholinpropansulfonsäure-Puffer (MOPS-Puffer) (50 mM, pH 7,6, enthält 10 mM *N*-Maleinimid) wurden die Acyl-Thioester des Zentrifugationsrückstandes in Lösung gebracht. Dies geschah durch Verschließen und kräftiges Schütteln der Zentrifugengefäße. Die Pflanzenmatrix wurde durch einen dritten Zentrifugationsschritt (4 °C, 6000 min<sup>-1</sup>, 20 min) abgesetzt. Der Zentrifugationsrückstand wurde entsprechend 7.4 aufgearbeitet und zur Untersuchung, der zu diesem Zeitpunkt der Fruchtentwicklung bereits gebildeten Capsaicinoide, verwendet.

Der Überstand enthielt die gelösten Acyl-Thioester und wurde vorsichtig dekantiert. Dabei gab man den Überstand auf eine konditionierte Festphasenkartusche, welche mit Diethylaminoethyl-Sepharose (DEAE-Sepharose) beladen war. Die Kartusche wurde zuvor mit 10 ml DEAE-Sepharose beladen, welche zwischen 2 Fritten eingebettet war. Danach wurde der Anionenaustauscher mit 70 ml 3-Morpholinethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer) (10 mM, pH 6,1) konditioniert und 10 Sekunden lang trockengesaugt. Auf die derart präparierten Festphasenkartuschen wurde der Überstand des dritten Zentrifugationsschrittes direkt dekantiert. Die Probe tropfte ohne Vakuum anzulegen durch das Anionenaustauschermaterial. Das Eluat wurde nicht aufgefangen.

Nach der Bindung der Acyl-Thioester wusch man die Festphasenkartusche in 3 Schritten um unerwünschte Begleitstoffe (Lipide, freie Fettsäure, Capsaicinoide, Chlorophylle und andere Pflanzenbestandteile, die evtl. z.T. in Lösung gegangen sein könnten) zu entfernen. Beim ersten Schritt wurde mit 60 ml des MES-Puffers gespült. Hierzu wurde ein leichtes Vakuum angelegt, so dass ein Fluss von etwa 30 ml/min entstand. Im Anschluss folgte ein Waschschrift mit 250 ml einer Mischung aus 80 vol. % Isopropanol und 20 vol. % des MES-Puffers. Dabei wurde die Waschlösung kontinuierlich nachgegeben, so dass die Kartusche zwischenzeitlich nicht bis zur Trockene auslief. Danach wiederholte sich der erste Waschschrift. Jetzt war die Festphasenkartusche so weit vorbereitet, dass die Acyl-Thioester konsekutiv eluiert werden konnten.

Hierzu stellte man unter den Auslass der Kartusche ein Reagenzglas und gabt zur Elution der Acyl-Coenzym A-Derivate 50 ml einer Mischung aus 25 vol. % Isopropanol und 75 % MES-Puffer, welcher noch zusätzlich 0,15 M LiCl enthält, auf die Säule. Die Fraktion wurde vollständig aufgefangen, indem man das Reagenzglas zwischenzeitlich bei geschlossenem Absperrventil in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliff entleerte. Diese ersten aufgefangenen Fraktionen, also sowohl von Perikarp als auch Plazenta, wurden mit einem Glasstopfen verschlossen und bis zur Aminolyse-Reaktion in den Kühlschrank (5 °C) gestellt. Bevor in der nächsten Elutionstufe die Acyl-ACP-Derivate erhalten wurden, wurde die Kartusche mit 60 ml MES-Puffer nochmals gespült. Dies gewährleistete eine bessere Trennung der Fraktionen.

Die Elution der Acyl-ACP-Derivate erfolgte dann mit 50 ml einer Mischung aus 25 vol. % Isopropanol und 75 vol. % MES-Puffer, welcher in diesem Fall 0,5 M LiCl enthält. Das Eluat wurde ebenfalls, wie zuvor beschrieben, aufgefangen und in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt.

Nachdem die Eluate aus beiden Fraktionen unterschiedlicher Ionenstärke vorlagen, wurde die Aminolyse-Reaktion direkt im Erlenmeyerkolben durchgeführt. Dabei wurden die vorliegenden Acyl-Thioester selektiv zu *N*-Butylamiden entsprechender Kohlenwasserstoff-Kettenlänge umgesetzt. Zu jedem der Erlenmeyerkolben mit 50 ml des Eluates wurden 5 ml Butylamin (99 %) pipettiert, die Kolben mit Glasstopfen verschlossen und 20 Sekunden kräftig geschüttelt. Die Gesamtreaktionszeit betrug genau 15 min (Stoppuhr), wobei das Schütteln in 5 Minuten-Intervallen wiederholt wurde. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 12,5 ml HCl (4 M, Dispenser). Mit Universalindikatorpapier wurde der pH-Wert kontrolliert und bei basischer Reaktion noch tropfenweise HCl bis zur Neutralisation hinzugegeben.

Einen Reagenzienblindwert erhielt man, indem 50 ml des Elutionspuffers der Aminolyse-Reaktion unterzogen werden.

Die wässrigen Reaktionsmischungen wurden in einen 250 ml Scheidetrichter gegeben und 2-mal mit 20 ml Diisopropylether (DIPE) (HPLC-Grade, nochmals destilliert) extrahiert. Die in einem 100 ml Weithals-Erlenmeyerkolben vereinigten organischen Phasen wurden mit ca. 20 g wasserfreiem Natriumsulfat vom Wasser befreit und durch einen Faltenfilter direkt in einen 100 ml Rundkolben filtriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis auf einen Rest von ca. 2 ml eingedampft. (An dieser Stelle war es ratsam, nicht bis zur Trockene einzudampfen, da die große Oberfläche der Innenwandung des 100 ml Kolbens vermutlich dazu führte, dass die Verluste beim Lösen stark zunahmen.) Der noch flüssige Rückstand wurde mit DIPE quantitativ (3-mal Nachspülen mit je 1 ml) in einen 10 ml Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft. Nach erneutem Lösen in wenigen  $\mu$ l DIPE wurde der Rückstand in ein  $\mu$ -Insert (V ca. 220  $\mu$ l) eines 2 ml Vials quantitativ überführt und erneut bis zur Trockene eingedampft um anschließend in 20  $\mu$ l DIPE (enthält ISTD (Myristinsäuremethylester, 67,7  $\mu$ g/ml) zur Erkennung von Injektionsschwankungen) gelöst zu werden. Danach konnten von dieser Lösung 2  $\mu$ l (manuelle Injektion) zur gaschromatographischen Untersuchung verwendet werden.

Nach jeder Probe musste der Rotationsverdampfer zur Reinigung demontiert werden, da sonst Verschleppungen auftraten. Insbesondere die Antriebswelle aus Glas sollte ausgebaut und gründlich mit 1. Wasser, 2. Aceton und 3. DIPE gespült werden. Des Weiteren war es

empfehlenswert nach jeder chromatographischen Messung den GC auszuheizen und dabei 5 µl DIPE in den heißen Injektorblock zu injizieren. Zudem sollte zur Vermeidung falsch-positiver Messungen durch Memory-Effekte zuerst die Matrix bzw. Probe gemessen werden, in der keine Analyten erwartet wurden (also z.B. zuerst Reagenzienblindwerte, dann Perikarp-Proben und dann Plazenta-Proben).

## 7.7 Synthese analytischer Standards

### 7.7.1 Synthese von *N*-Butylamiden aus Carbonsäurechloriden

In Anlehnung an eine allgemeine Arbeitsvorschrift des *Organikums* (175) wurden die *N*-Butylamide wie folgt synthetisiert:

500 mg eines Säurechlorides wurden in 10 ml Diethylether (frisch destilliert) in einem 50 ml Rundkolben gelöst. Zu dieser Mischung (Tropftrichter) wurde unter Rühren eine Butylamin-Lösung von 2 ml Butylamin in 10 ml Diethylether getropft (Tropftrichter). Das gebildete Präzipitat wurde nach 10 min auf 50 ml Eiswasser gegossen und tropfenweise mit 4 M HCl zuerst neutralisiert und dann leicht angesäuert. Das Produkt wurde im 250 ml Scheidetrichter 1-mal mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und danach 3-mal mit 10 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen versetzte man zur Entfernung des im Ether gelösten Wassers mit Natriumsulfat und filtrierte durch einen Faltenfilter in einen 50 ml Rundkolben ab. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, blieb ein öliges, fruchtig riechendes, farbloses Rückstand, der nach Abkühlen in der Regel kristallisiert.

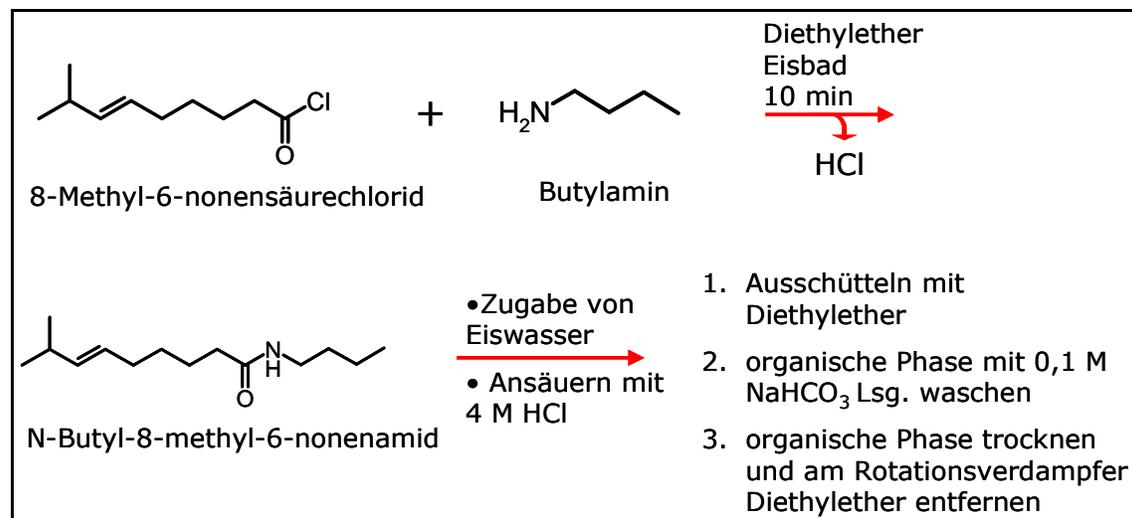


Abbildung 7-9 Synthese von Butylamiden aus Carbonsäurechloriden am Beispiel der 8-Methyl-6-nonensäure

Die Identifizierung und Reinheitskontrolle erfolgt per GC/MS. In den meisten Fällen hatte das Produkt eine Reinheit von mindestens 99 % und konnte ohne weitere Maßnahmen (Umkristallisation, präperative Säulenchromatographie etc.) eingesetzt werden. Falls eine Verbesserung der Produktreinheit erforderlich schien, wurde mit Kieselgel 60 (LiChroprep Si 60 (40-63 µm)) eine säulenchromatographische Abtrennung der Verunreinigungen vorgenommen. Hierzu wurde eine Glassäule (Länge ca. 20 cm, Innendurchmesser 10 mm) mit eingeschmolzener Glasfritte mit 8 g Kieselgel (entspricht einer Füllhöhe von 15 cm)

gefüllt und mit Diisopropylether konditioniert. Das zu reinigende Produkt wurde in möglichst wenig DIPE gelöst und mit einer Pasteurpipette vorsichtig (Festphasenmaterial sollte nicht aufgewirbelt werden) auf die Säule gegeben. Danach gab man sukzessive 120 ml DIPE über die Säule und fängt das Eluat in 30 Fraktionen zu 4 ml auf. Mittels GC/MS und Auftragung auf eine DC-Platte (nur Detektion: UV-Löschung bzw. Iodkammer) wurden die Fraktionen ermittelt, die das Produkt enthalten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

### 7.7.2 Synthese von *N*-Butylamiden aus Carbonsäuren

Waren die Carbonsäurechloride der Fettsäuren kommerziell nicht verfügbar, so wurden diese durch die Umsetzung mit Oxalsäuredichlorid synthetisiert.

Hierzu wurden 500  $\mu$ l der Fettsäure (z. B. 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure siehe Abbildung 7-10) unter Rühren im Eisbad langsam mit 2 ml Oxalsäuredichlorid versetzt. Danach gab man 2 Tropfen *N,N*-Dimethylformamid als Katalysator hinzu. Die Gasbildung während der Zugabe zeigte die Entstehung von Kohlendioxid und Kohlenmonoxid an. Der Kolben wurde anschließend mit einem Glasstopfen locker verschlossen. Die Reaktion wurde nach 90 min durch Entfernen des *N,N*-Dimethylformamides und des Oxalsäuredichlorides am Rotationsverdampfer bei 60 °C und 50 mbar abgebrochen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise lag in der Tatsache begründet, dass keine weitere Abtrennung der Edukte und Nebenprodukte erfolgen musste. Man konnte nun das Produkt in dem Reaktionskolben in 10 ml wasserfreiem Diethylether lösen und gemäß 7.7.1 weiterverfahren.

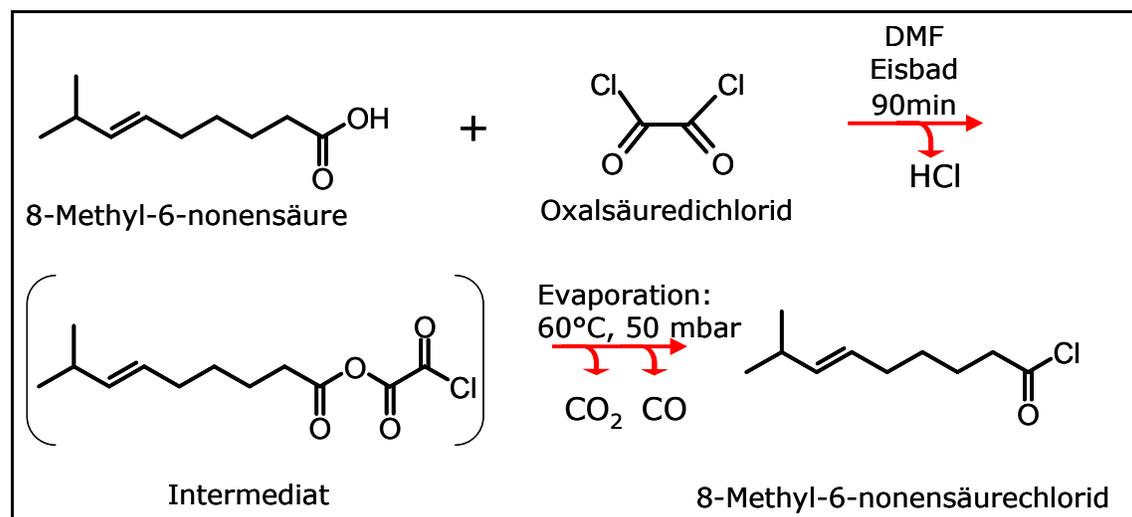
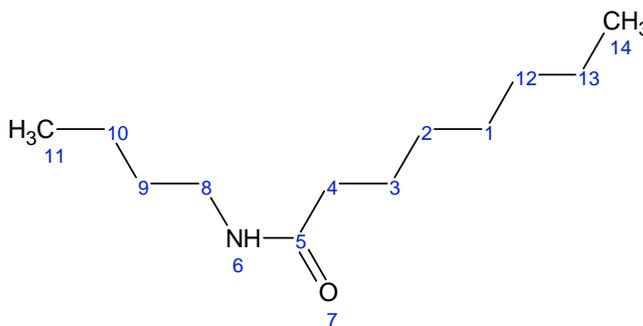


Abbildung 7-10 Synthese von Carbonsäurechloriden aus Carbonsäuren am Beispiel der 8-Methyl-*trans*-6-nonensäure

### 7.7.3 Charakterisierung der synthetisierten analytischen Standards mittels $^1\text{H}$ -NMR, $^{13}\text{C}$ -NMR und GC-MS.

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit einem FT-Kernresonanzspektrometer der Fa. Bruker (Model ARX 400, 400 MHz) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde deuteriertes Dichlormethan ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) verwendet. Die Einwaage betrug jeweils 50 mg. Die Massenspektren wurden mit dem unter 7.5 gezeigten System aufgenommen. Es handelt sich um EI-Spektren die mit einer Ionisationsenergie von 70 eV gemessen wurden.

#### 7.7.3.1 *N*-Butyloctanamid



$^1\text{H}$ NMR: (400,13 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^1\text{H}$  [ppm]: 0,85-0,92 (6 H, dt,  $2\times\text{CH}_3$ , 11,14); 1,27-1,37 (10 H, m,  $6\times\text{CH}_2$ , 1, 2, 9, 10, 12); 1,45 (2 H, p,  $\text{CH}_2$ , 13); 1,57 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 3); 2,11 (2 H, t,  $\text{CH}_2$ , 4); 3,18 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 8); 6,12 (1 H, s, NH, 6)

$^{13}\text{C}$ NMR: (100 Mhz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^{13}\text{C}$  [ppm]: 13,87 (14); 14,15 (11); 20,44 (10); 22,96 (13); 26,24 (3); 29,42 (1); 29,64 (2); 32,10 (12); 32,18 (5); 37,00 (4); 39,41 (8); 173,26 (5)

GC/MS (EI, 70 eV):

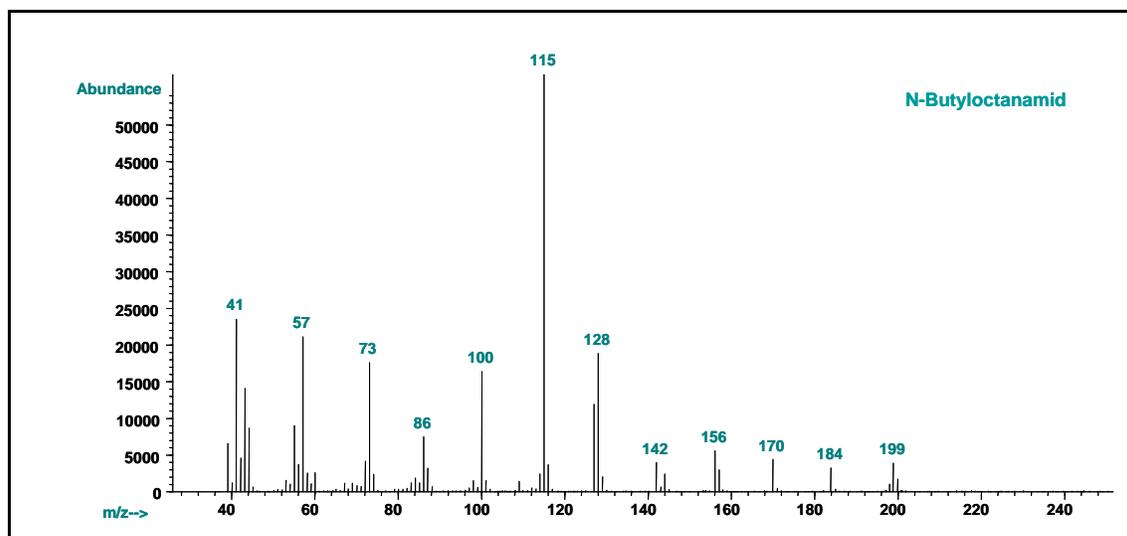
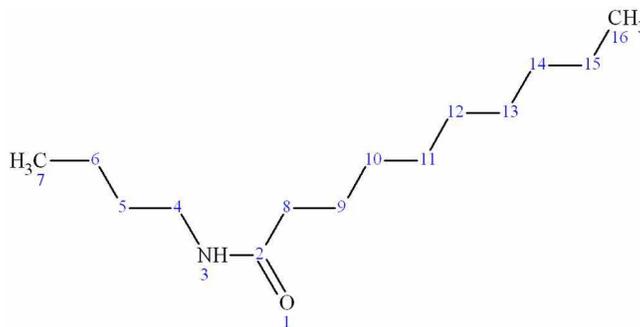


Abbildung 7-11 Massenspektrum *N*-Butyloctanamid

#### 7.7.3.2 *N*-Butyldecanamid



$^1\text{H}$ NMR: (400,13 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^1\text{H}$  [ppm]: 0,85-0,93 (6 H, dt,  $2 \times \text{CH}_3$ , 16, 7), 1,28 (14 H, m,  $7 \times \text{CH}_2$ , 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14), 1,45 (2 H, p,  $\text{CH}_2$ , 15), 1,57 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 9), 2,11 (2 H, t,  $\text{CH}_2$ , 8), 3,18 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 4), 6,11 (1 H, s, NH, 3)

$^{13}\text{C}$ NMR: (100 Mhz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^{13}\text{C}$  [ppm]: 13,88 (7); 14,20 (16); 20,45 (6); 23,02 (15); 26,25 (9); 29,65 (10); 29,70 (11); 29,78 (12); 29,86 (13); 32,19 (5); 32,25 (14); 37,25 (8); 39,41 (4); 173,17 (2)

GC/MS (EI, 70 eV):

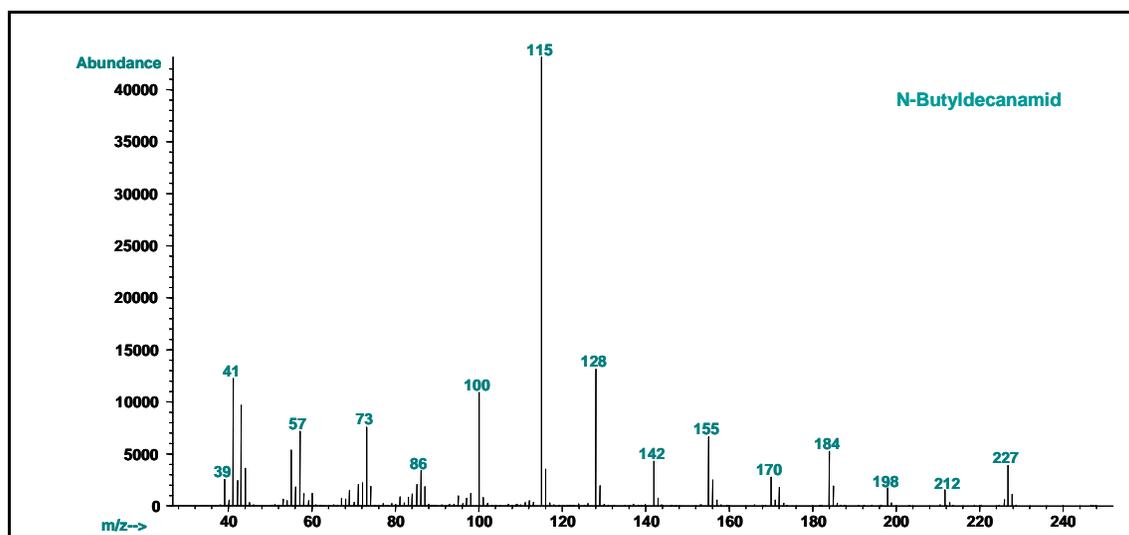
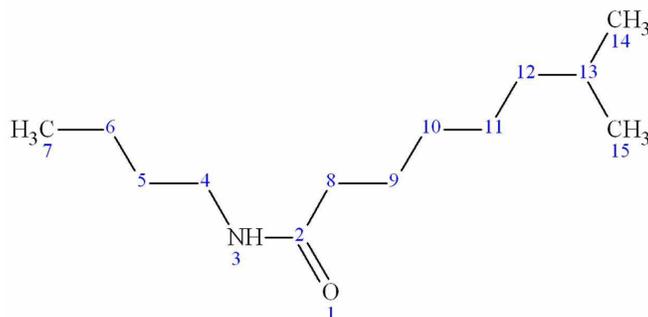


Abbildung 7-12 Massenspektrum *N*-Butyldecanamid

7.7.3.3 *N*-Butyl-7-methyloctanamid

$^1\text{H NMR}$ : (400,13 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^1\text{H}$  [ppm]: 0,85-0,93 (9 H, m,  $3\times\text{CH}_3$ , 14, 15, 7); 1,14 (2 H, m,  $1\times\text{CH}_2$ , 12); 1,20-1,37 (8 H, m,  $4\times\text{CH}_2$ , 5, 6, 10, 11); 1,45 (1 H, m, CH, 13); 1,58 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 9); 2,11 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 8); 3,19 (2 H, q,  $\text{CH}_2$ , 4); 5,86 (1 H, s, NH, 3)

$^{13}\text{C NMR}$ : (100 Mhz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^{13}\text{C}$  [ppm]: 13,88 (7); 20,44 (6); 22,70 (14, 15); 26,25 (9); 27,49 (11); 28,29 (13); 29,94 (10); 32,18 (5); 37,04 (8); 39,23 (12); 39,41 (4); 173,14 (2)

GC/MS (EI, 70 eV):

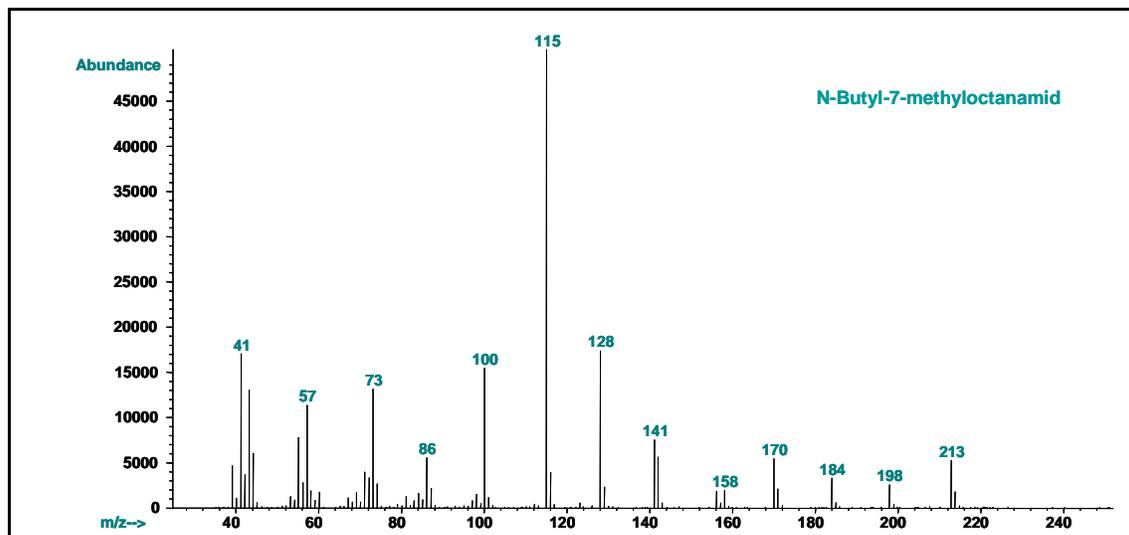
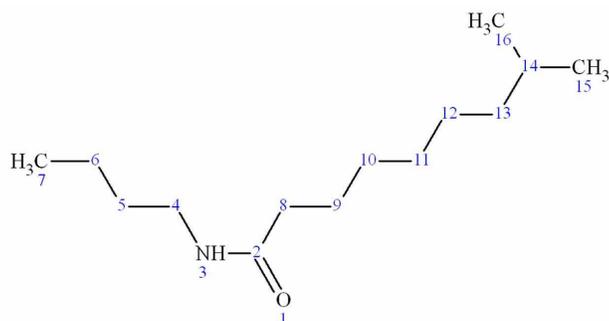


Abbildung 7-13 Massenspektrum *N*-Butyl-7-methyloctanamid

7.7.3.4 *N*-Butyl-8-methylnonanamid

$^1\text{H}$ NMR: (400,13 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^1\text{H}$  [ppm]: 0,85-0,86 (6 H, d,  $2\times\text{CH}_3$ , 16,15); 0,91 (3 H, t, 7); 1,13-1,18 (6 H, m,  $3\times\text{CH}_2$ , 11, 12, 13); 1,27 (4 H, m,  $2\times\text{CH}_2$ , 5, 6); 1,45 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 10); 1,51 (1 H, t, CH, 14); 1,57 (2 H, dt,  $\text{CH}_2$ , 9); 2,15 (2 H, t,  $\text{CH}_2$ , 8); 3,17 (2 H, q,  $\text{CH}_2$ , 4); 5,83 (1 H, s, NH, 3)

$^{13}\text{C}$ NMR: (100 Mhz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^{13}\text{C}$  [ppm]: 13,89 (7); 20,44 (6); 22,72 (15, 16); 26,23 (9); 27,63 (10); 28,32 (12); 29,71 (14); 30,03 (11); 32,20 (5); 37,06 (8); 39,34 (4); 39,40 (13); 173,14 (2)

GC/MS (EI, 70 eV):

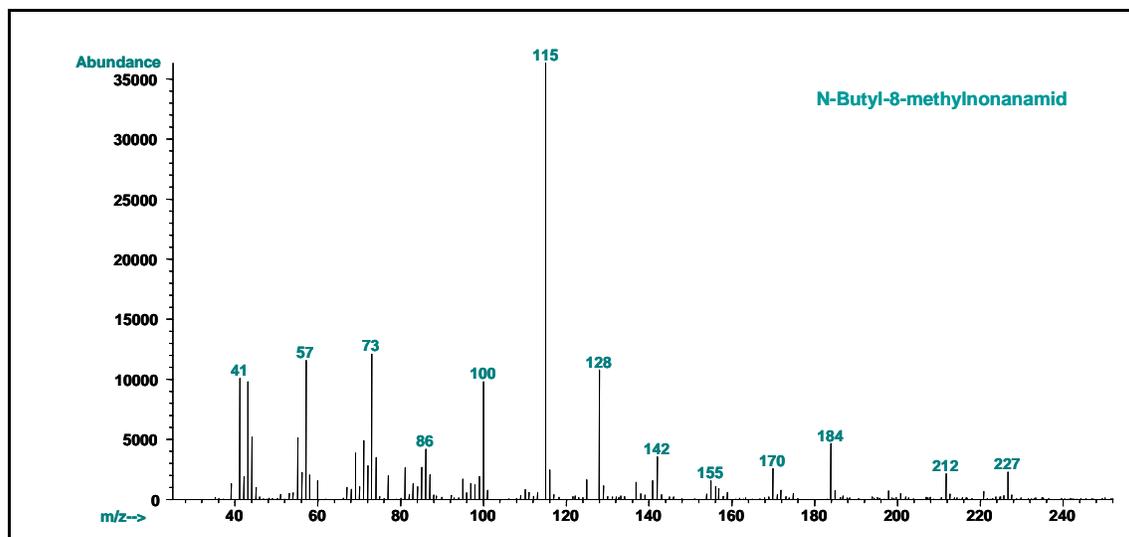
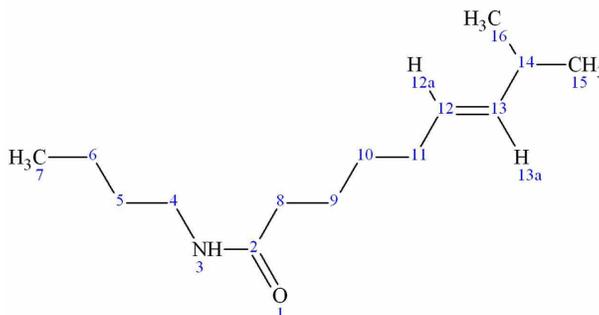


Abbildung 7-14 Massenspektrum *N*-Butyl-8-methylnonanamid

7.7.3.5 *N*-Butyl-8-methyl-6-*trans*-nonenamid

$^1\text{H}$ NMR: (400,13 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^1\text{H}$  [ppm]: 0,89-0,96 (9 H, d,  $3\times\text{CH}_3$ , 16, 15, 7); 1,13-1,30-1,39 (4 H, m,  $2\times\text{CH}_2$ , 5, 6); 1,45 (2 H, m,  $1\times\text{CH}_2$ , 9); 1,59 (2 H, m,  $1\times\text{CH}_2$ , 10); 2,02-2,13 (5 H, m,  $1\times\text{CH}$  und  $2\times\text{CH}_2$ , 14, 11, 8); 2,59 (1 H, m, CH, 14); 3,19 (2 H, q,  $\text{CH}_2$ , 4); 5,20 (2 H, d, *cis*- $\text{CH}=\text{CH}$ , 12a, 13a); 5,38 (2 H, d, *trans*- $\text{CH}=\text{CH}$ , 12a, 13a) 5,64 (1 H, s, NH, 3)

Anhand der NMR-Signale lässt sich ablesen, dass das Molekül nicht nur in der *trans*-, sondern auch in der *cis*-Konfiguration vorliegt. Integriert man die Signale der jeweiligen  $\text{CH}=\text{CH}$ -Signale so kann man daraus das Verhältnis von *cis*- zu *trans*-Isomer abschätzen. Hier ist die Zusammensetzung etwa 30 % *N*-Butyl-8-methyl-6-*trans*-nonenamid zu 70 % *N*-Butyl-8-methyl-6-*cis*-nonenamid.

$^{13}\text{C}$ NMR: (100 Mhz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$   $^{13}\text{C}$  [ppm]: 13,86 (7); 20,41 (6); 23,28 (15, 16); 25,83 (9); 26,78 (14); 27,38 (11); 29,91 (10); 32,17 (5); 36,92 (8); 39,39 (4); 127,29 (12); 138,11 (13); 173,14 (2)

GC/MS (EI, 70 eV):

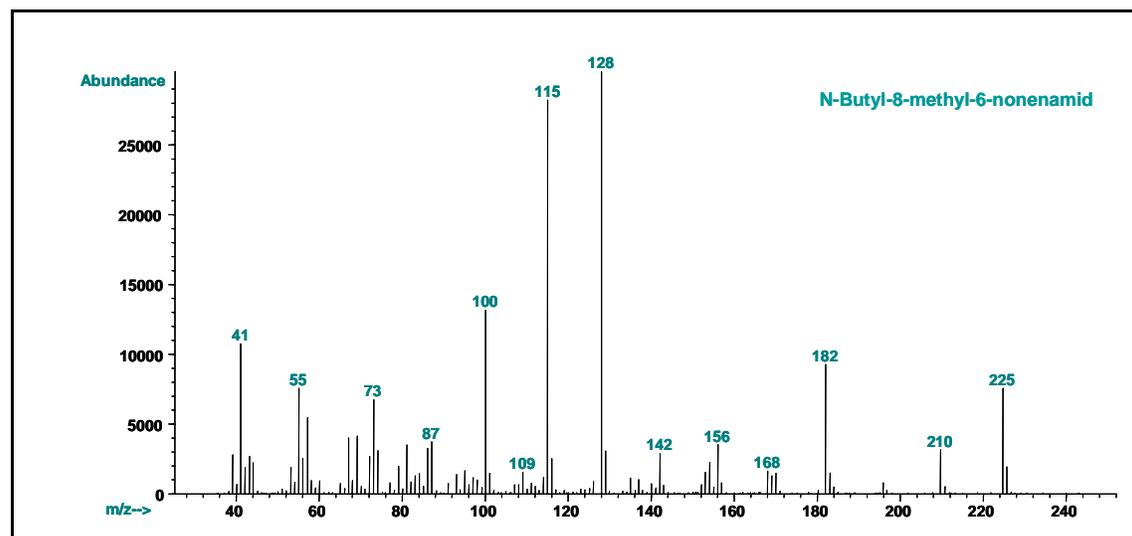


Abbildung 7-15 Massenspektrum *N*-Butyl-8-methyl-6-nonenamid

## 7.8 Pflanzenanbau im Gewächshaus

### 7.8.1 Bezugsquellen für Saatgut

Von der Fa. Rühlemanns Kräuter- und Duftpflanzen (Horstedt), wurde folgendes Saatgut bezogen:

*Capsicum annuum* var. *Jalapeno*

*Capsicum chinense* var. *Habanero Orange*

Von der Genbank des Leibniz-Institutes für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben wurden Samen von *Capsicum pubescens* Ruiz et Pav. mit folgenden Akzessionsnummern zur Verfügung gestellt:

**Tabelle 7-10 Akzessionsnummern der Genbank des IPK Gatersleben zu den gelieferten *Capsicum pubescens*-Varietäten**

Akz.-Nr:	zusätzliche Angaben	Ursprungsland
CAP 217	-	Peru
CAP 468	-	unbekannt
CAP 871	Rocoto Amarillo	Peru
CAP 1033	Yellow Tree Pepper Rocot	unbekannt
CAP 1695	NB 2258, CON-86, CAP 719, gelbfrüchtig	unbekannt

Im Lebensmitteleinzelhandel (Aldi Nord) wurden Gemüsepaprika-Früchte aus Israel (*Capsicum annuum*) bezogen, denen dann Samen zur weiteren Kultivierung entnommen wurden.

Aus dem Gartencenter des Obi-Heimwerkermarktes in Wuppertal stammt die *Capsicum*-Pflanze „Tinkerbell“ mit schärfefreien Früchten (*Capsicum annuum*).

### 7.8.2 Aussaat

Die Samen werden in eine zu einem Drittel mit Blumenerde gefüllte Saatschale (ca. 30 x 20 x 5 cm L/B/H) ausgebracht. Der Abstand der Samen beträgt mindestens 1 cm zueinander. Anschließend werden die Samen mit etwa 1,5 cm Blumenerde bedeckt. Die Erde wird angefeuchtet und stets darauf geachtet, dass diese nicht austrocknet. Im Gewächshaus (bei  $\geq 25$  °C) zeigen sich die Keimlinge nach durchschnittlich 2 Wochen.

### 7.8.3 Pikieren und Umtopfen

Nach etwa 3 bis 4 Wochen werden die Pflänzchen mit dem kräftigsten Wuchs in kleine Pflanzcontainer (ca. 5 x 5 x 8 cm L/B/H) pikiert. Nach etwa 8 Wochen werden die Pflanzen in runde Pflanzcontainer (Ø 16 cm, Volumen 2 l) umgetopft.

### 7.8.4 Bedingungen im Gewächshaus

Die Temperatur im Gewächshaus war auf 25 °C eingestellt. Das bedeutet, dass die Temperatur, bedingt durch die Mess- und Regeltechnik nicht unter 25 °C absinken konnte. Im

Gegenzug besteht im Gewächshaus keine aktive Kühlung, so dass die Temperatur unter dem Einfluss der Sonne häufig oberhalb von 25 °C lag. Spitzenwerte, die im Sommer gemessen wurden, lagen bei 40 °C.

Um die relative Luftfeuchtigkeit nicht unter 50 % sinken zu lassen, besprenkelt eine Bewässerungsanlage die Pflanzen in einem Intervall von 2 h für jeweils 2 min mit einem feinen Sprühnebel. Dieser wird durch das einmal tägliche, manuelle Gießen der Pflanzen ergänzt.

Da allein durch die natürliche, wetterbedingte Sonneneinstrahlung keine standardisierten Bedingungen vorlägen, wurden die Pflanzen zusätzlich von 6 Uhr bis 22 Uhr mit Kunstlicht beleuchtet. Hierzu sind im Gewächshaus 6 Hochdruck-Natriumdampflampen (Fa. Osram, VIALOX® NAV®, 400 W, 2000 K Farbtemperatur) installiert.

### 7.8.5 Düngung

Die eingesetzte Qualitätsblumenerde (Compo Sana®) enthielt Perlite® Atmungsflocken (aus Vulkangestein), Agrosil® Wurzelaktivator und einen Zusatz von Langzeitdünger mit allen wichtigen Haupt- und Spurennährstoffen für die ersten 4 Wochen.

Nach dem Pikieren der Pflanzen wurden zwei Arten von Dünger eingesetzt:

#### 1. Langzeitdünger

Hierbei handelt es sich um Düngestäbchen der Fa. Compo (Düngestäbchen plus Guano für Grünpflanzen), welche in die Blumenerde gesteckt werden und sich sukzessive auflösen. Dieser organisch-mineralische NPK-Dünger enthält 11% Gesamtstickstoff, 4 % Gesamtphosphat (als  $P_2O_5$ ), und 8 % Kaliumoxid. Zusätzlich sind 2% Magnesiumoxid und 6 % Schwefel enthalten. Als Spurenelemente befinden sich Kupfer (0,04 %), Eisen (0,1 %), Mangan (0,05 %), Molybdän (0,01 %) und Zink (0,04 %) in den Düngestäbchen. Insgesamt wurden 17 % Seevogel-Guano zur Herstellung verwendet.

#### 2. Schnellwirkender Dünger

Nach etwa 3 Monaten, wenn die Pflanze mit der Knospenbildung beginnt, wird ein flüssiger Dünger (Wuxal® Super, Bayer) mit anderer Zusammensetzung bei den Hauptnährstoffen verwendet. Von dem Düngerkonzentrat, mit der Zusammensetzung NPK = 8 % - 8 % - 6 %, werden 40 ml auf 10 l Gießwasser gegeben und einmal pro Woche angewendet. Laut Herstellerangabe fördert die vorliegende Dünger-Zusammensetzung die Blüten- und Fruchtbildung, was zu diesem Stadium des Pflanzenwachstums den Erfordernissen entspricht.

### 7.8.6 Pflanzenkrankheiten

Die einzige aufgetretene Pflanzenkrankheit mit gravierenden Folgen äußerte sich in einem plötzlichen Welken der Pflanzen (bei feuchter Erde) und anschließendem Austrocknen und Absterben der gesamten Pflanze. Es handelte sich wahrscheinlich um einen Befall durch den Pilz *Fusarium oxysporum*, welcher vom Boden her in die Pflanze eindringt und die Leitungsbahnen mit seinem Mycel verstopft. Dies konnte man auch gut an den braun verfärbten Wurzeln erkennen. Durch die Fusarien-Welke wurden im Zeitraum von Oktober 2006 bis März 2007 etwa 120 Pflanzen vernichtet. Die Pilzsporen können schon am Saatgut haften oder in der Blumenerde enthalten sein. Da dieses Problem nur bei den Pflanzen,

welche aus den Samen vom IPK in Gatersleben aufgezogen wurden, auftrat, war vermutlich die Blumenerde nicht die Quelle der Pilzsporen. Sicherheitshalber wurde für die nächste Aussaat die Blumenerde in einem 20 l Metalleimer für 2 h auf 120 °C im Trockenschrank erhitzt und anschließend wieder mit Wasser angefeuchtet. Zusätzlich wurden die Pflanzen beim zweiten Versuch der Kultivierung von Beginn an mit einem systemischen Fungizid prophylaktisch behandelt. Hierzu wurde eine Spritzbrühe mit 10 ml Pilzfrei Ectivo® (Wirkstoff Myclobutanil 7,5 g/l, Fa. Scotts Celaflor) auf 1 l Wasser hergestellt und derart appliziert, dass die Pflanzen durch den Sprühnebel tropfnass waren. Die Behandlung erfolgte in Intervallen von 3 Wochen.

### 7.8.7 Schädlingsbefall

Gegen den sporadisch auftretenden Blattlausbefall wurde beim ersten Auftreten an einer Pflanzengeneration das systemische Insektizid Lizetan® Combigranulat (Wirkstoff Imidacloprid 25 g/kg, Bayer) in die Blumenerde eingearbeitet. Es wirkt gegen ein breites Spektrum an saugenden Insekten und zeigt sich sowohl als Kontakt- als auch als Fraßgift wirksam. Durch die besondere Formulierung ist die Pflanze, nach Herstellerangaben, bis zu 100 Tage nach der Applikation geschützt.

### 7.8.8 Bestäubung

Nach vollständiger Öffnung der Blüten wurden diese mit einem Haarpinsel (Fa. Pelikan, Größe 2) vorsichtig bestäubt. Durch das Fehlen von Fenstern am Gewächshaus wurde Insekten, welche die Bestäubung hätten gewährleisten können, der Zugang verwehrt. Aus diesem Grund musste die Bestäubung manuell vorgenommen werden. Es zeigte sich, dass nur etwa 10 % der behandelten Blüten erfolgreich bestäubt wurden und dann zur Frucht heranreiften.

### 7.8.9 Ernte

Zur Ernte der Früchte wurde der Blütenstiel fest mit Daumen und Zeigefinger festgehalten und nach oben hin abgebrochen. Zwischen Nodium und Blütenstiel besteht eine Sollbruchstelle, wodurch sich die Frucht leicht von der Pflanze ernten lässt. Wird eine Frucht nicht geerntet, so trocknet die Beere langsam ein und wird durch die Wirkung von Phytohormonen von der Pflanze abgeworfen. Dies geschieht ebenfalls an der Sollbruchstelle zwischen Nodium und Blütenstiel.

## 7.9 Substanzen und Laborbedarf

### 7.9.1 Verwendete Chemikalien

- 2-Methylhexansäure, 95 % (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- 2-Propanol, HPLC (VWR,
- 3-Morpholinethansulfonäure (MES), 99 %, low moisture (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- 3-Morpholinpropansulfonäure (MOPS), 98 %, purum (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 7-Methyloctansäure, 97 % (Narchem, Chicago, USA)
- 8-Methyl-6-nonensäure, 97 % (Maybridge, Tintagel, Großbritannien)
- 8-Methylnonensäure, 98 % (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Acetonitril HPLC grade (Fisher Scientific, Leicestershire, Großbritannien)

- Acetyl Coenzym A, 94 %, Lithiumsalz (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Ammoniumacetat, HPLC, 99 %, puriss. p.a. (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Butylamin, 99,5 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Capsaicin (natürliches Capsaicin 65 %, Dihydrocapsaicin ~30 %) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- DEAE-Sepharose, fast flow, 20 % Ethanol (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Decansäurechlorid, 98 %, (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Dichlormethan-d<sub>2</sub>, 99,9 % (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA)
- Dihydrocapsaicin, 90 % (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- Diisopropylether, puriss. p.a., nochmals destilliert (Riedel-deHaën, Seelze, Deutschland)
- Essigsäure 100 %, p.a., (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Heptansäurechlorid, 99 %, (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Hexansäurechlorid 99 %, (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Lithiumchlorid, ultra, Molekularbiologie, 99 %, wasserfrei (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Methanol HPLC-Grade (Acros Organics, Geel, Belgien)
- *N,N*-Dimethylformamid, 99 % (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Natriumsulfat, puriss. p.a., wasserfrei (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- *N*-Ethylmaleinimid, 99 %, ultra (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Nonansäurechlorid, 97 %, (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Octansäurechlorid, 99 %, (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Ölsäurechlorid, 99 % (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Oxalsäuredichlorid, 96 %, (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Pelargonsäurevanillylamid (PSVA), purum (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Pentan, HPLC grade, Isomerenmischung (Fisher Scientific, Leicestershire, Großbritannien)
- Pentylamin, 98,5 %, purum (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Perlagonsäurevanillylamid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Propylamin, 99 % (Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Reinstwasser (Reinstwasseranlage MilliQ) (Millipore, Eschborn, Deutschland)
- Salzsäure, 37 %, p.a., rauchend (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Siliziumdioxid, LiChroprep Si 60 (40-63 µm) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Tetradecansäuremethylester, puriss. p.a. (Fluka, Steinheim, Deutschland)
- Trichloressigsäure, 99,5 %, p.a. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 7-11 Coenzym A-Derivate

<b>Acetyl-Coenzym A</b> C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S*3Li*3, 1H <sub>2</sub> O 809,57 g/mol (als freie Säure)	Sigma	~ 94 %	LC/UV LC/MS	analyt. Standard
<b>n-Octanoyl-Coenzym A</b> C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S*3Li*3, 5H <sub>2</sub> O 893,73 g/mol (als freie Säure)	Sigma	98 %	Photometrie LC/UV LC/MS	analyt. Standard
<b>n-Decanoyl-Coenzym A</b> C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S*3Li*3, 5H <sub>2</sub> O 921,73 g/mol (der freien Säure)	Sigma	≥ 90 %	-	zu große Blindwerte bei <i>N</i> - Butyldecanamid

### 7.9.2 Glasgeräte und sonstiger Laborbedarf

- Bechergläser, diverse Größen
- Büchnertrichter, Durchmesser 59mm (Größe 1)
- Dewar, diverse Größen (KGW Isotherm)
- Dichtscheibe (für Vials), rot/blau G 8 (CS-Chromatographie, Langerwehe)

- Dispenser, 5-30 ml (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Enzymtestpipetten 0.5, 1 ml
- Erlenmeyerkolben mit Normschliff 100, 200, 300 ml
- Extraktionshülse (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Faltenfilter, Ø 110 mm, 50 s (Roth "Rotilabo®", Karlsruhe)
- Festphasenextraktionseinheit, EM-6500 (Adsorbex „SPU“)
- Festphasenkartusche, leer, 75 ml (Varian „Bond Elut Reservoir“)
- Fritte, Porengröße 20 µm, Ø 1/2", Polyethylen (Varian "Bond Elut Clean Polyethylene Frits")
- Gewindeflaschen, 250, 1000 ml, GL 45 (Schott Duran®)
- Kolbenhubpipetten 10-100 µl, 100-1000 µl (Eppendorf „Reference“)
- Labor-Thermometer, -10 bis 150 °C, Normschliff
- Magnetrührfische, teflonbeschichtet, diverse Größen
- Messkolben 10, 20, 25, 50, 100, 250, 500 ml
- Messzylinder 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ml
- Mikroinsert (für Vails), G 30/5, zylindrisch, 200 µl (CS-Chromatographie, Langerwehe)
- NMR-Probenröhrchen, ultra precision, Ø 5 mm, Länge 178 mm (Promochem, Wesel)
- Pasteurpipetten, Glas, 150 mm, 230 mm
- Pipettierhilfe, Howorka-Ball®
- Plastikzentrifugenbecher 250 ml
- Rundfilter 595 Durchmesser 55 mm (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Rundkolben 50, 100, 250 ml
- Saugflaschen 250 mL
- Scheidetrichter 100, 250 ml
- Schlangenkühler u.a. für Soxhlet-Extraktion
- Schnellauftrichter, Glas, diverse Größen
- Schraubdeckeldosen, 120 ml, Polypropylen (Roth „Rotilabo®“, Karlsruhe)
- Schraubkappe (für Vails), G 8-L (CS-Chromatographie, Langerwehe)
- Skalpell (Bayha®), Klingen der Größe 11
- Soxhlet-Extraktionsaufsätze 100 ml
- Spatel, diverse Größen
- Spitzkolben 10, 25, 100 ml
- Stopfen aus Glas oder Polyethylen, diverse Normschliffe
- Tischstoppuhr (Junghans)
- Transferpettor, 0-100 µl, (Brand)
- Tropftrichter 100 ml
- Uhrgläser, diverse Größen
- Universalindikatorpapier, pH 1-14 (Macherey-Nagel, Düren)
- UV-Küvetten, Quarzglas, 1 cm
- Vial, G 1 klar, 1,5 ml (CS-Chromatographie, Langerwehe)
- Vollpipetten 1, 2, 2.5, 4, 5, 10, 20, 25, 50 ml
- Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml (Roth, Karlsruhe)

### 7.9.3 Technische Laborgeräte

- Analysenwaage Mettler AE 160
- Analysenwaage Sartorius 1702
- Dispergierantrieb Ultra Turrax (Jahnke & Kunkel, Staufen)
- Dispergierwerkzeug für Ultra Turrax Typ T 18/10 (Jahnke & Kunkel, Staufen)
- Magnet-Rühr- und Heizplatte, RCT basic, IKA Labortechnik (Janke & Kunkel, Staufen)

- Rotationsverdampfer, Rotavapor RE 111 (Büchi, Flawil, Schweiz)
- Universal- Zerkleinerer Krups Speedy plus Typ 7180-70 (Krups, Solingen)
- Universal- Zerkleinerer, Moulinette® (Moulinex-Samou, Radolfzell)
- Vakuum- Membranpumpe Typ ME2 (vacubrand, Wertheim)
- Vakuum- Membranpumpe Typ MZ 2C (vacubrand, Wertheim)
- Vibrationsmischer für Reagenzgläser, IKA Vibro-Fix VF2 (Janke & Kunkel, Staufen)
- Zentrifuge, (Kryofunktion), Kontron Instruments Centrikon H-401b (Hermle KG, Gosheim)

## 8 Literaturverzeichnis

1. Eshbaugh, W. H., Peppers: History and Exploitation of a Serendipitous New Crop Discovery. In *New Crops: Exploration, Research, Commercialization*, Janick, J.; Simon, J. E., Eds. Wiley: New York, 1993; Vol. 1, 132-139.
2. Perry, L.; Dickau, R.; Zarrillo, S.; Holst, I.; Pearsall, D. M.; Piperno, D. R.; Berman, M. J.; Cooke, R. G.; Rademaker, K.; Ranere, A. J.; Raymond, J. S.; Sandweiss, D. H.; Scaramelli, F.; Tarble, K.; Zeidler, J. A., Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* **2007**, 315, (5814), 986-988.
3. Perry, L.; Flannery, K. V., Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, (29), 11905-11909.
4. Pickersgill, B., Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. *Ann Bot (Lond)* **2007**, 100, (5), 925-940.
5. Krishna De, A., *Capsicum The genus Capsicum*. 1 ed.; Taylor & Francis: London, 2003; Vol. 33,296.
6. Zoschke, H., *Das Chili Pepper Buch: Anbau, Rezepte, Wissenswertes*. 1 ed.; Zoschke Data: Schönberg, 1997; 224.
7. Fuchs, L. Primi de stirpivm historia commentariorvm tomi uiuæ imagines, in exiguum angustioremq[ue] formam contractæ, ac quam fieri potest artificiosissime expressæ.Basileæ. <http://www.med.yale.edu/library/historical/fuchs/> (25.02.2008),
8. Fingerhuth, C. A., *Monographia Generis Capsici*. K.K. Mackenzie and the Horticultural Society of N.Y.: Düsseldorf, 1832; 32.
9. Irish, H. C., A Revision of the Genus *Capsicum* with Especial Reference to Garden Varieties. *Missouri Botanical Garden Annual Report* **1898**, 1898, 53-110.
10. Bailey, L. H., *Capsicum*. *Gentes Herbarum* **1923**, 1, 128-129.
11. Smith, P. G.; Heiser, C. B. J., Taxonomic and Genetic Studies on the Cultivated Peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. *American Journal of Botany* **1951**, 38, (5), 362-368.
12. Smith, P. G.; Heiser, C. B. J., Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the Geographic Distribution of the Cultivated *Capsicum* Species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **1957**, 84, (6), 413-420.
13. Charles B. Heiser Jr., C. B.; Pickersgill, B., Names for the Cultivated *Capsicum* Species (Solanaceae). *Taxon* **1969**, 18, (3), 277-283.
14. Eshbaugh, W. H., The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). *Phytologia* **1980**, 47, 153-166.
15. Heiser Jr., C. B.; Pickersgill, B., Names for the Cultivated *Capsicum* Species (Solanaceae). *Taxon* **1969**, 18, (3), 277-283.
16. Fingerhuth, C. A. *Monographia Generis Capsici*. 1832 <http://www.chilicult.com/texts/fingerhuth/monographia/index.html>, Gerald Schmidt (25.02.2008), Digitalisierung: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen, [http://gdz.sub.uni-goettingen.de/no\\_cache/dms/load/img/?IDDOC=309482](http://gdz.sub.uni-goettingen.de/no_cache/dms/load/img/?IDDOC=309482)
17. DeWitt, D.; Bosland, P. W., *Peppers of the World: An Identification Guide*. Ten Speed Press: 1997; 219.
18. Smith, P. G.; Heiser, C. B. J., The cultivated *Capsicum* peppers. *Econ. Botany* **1953**, 7, 214-227.
19. Walsh, B. M.; Hoot, S. B., Phylogenetic Relationships of *Capsicum* (Solanaceae) Using DNA Sequences from Two Noncoding Regions: The Chloroplast *atpB-rbcL*

- Spacer Region and Nuclear waxy Introns. *International Journal of Plant Sciences* **2001**, 162, (6), 1409-1418.
20. Zewdie, Y.; Bosland, P. W., Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for Capsicum species. *Biochem Syst Ecol* **2001**, 29, (2), 161-169.
  21. McLeod, M. J.; Guttman, S. I.; Eshbaugh, W. H., Early evolution of chili peppers (Capsicum). *Econ. Bot.* **1982**, 36, 361-368.
  22. Onus, A. N.; Pickersgill, B., Unilateral incompatibility in Capsicum (Solanaceae): occurrence and taxonomic distribution. *Ann Bot (Lond)* **2004**, 94, (2), 289-295.
  23. Baral, J. B.; Bosland, P. W., Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **2004**, 129, (6), 826-832.
  24. Bosland, P. W.; Votava, E. J., *Peppers: Vegetable and Spice Capsicums (Crop Production Science in Horticulture)*. CABI Publishing: 1999; 250.
  25. Purseglow, J. W.; Brown, E. G.; Green, C. L.; Robbins, S. R. J., *Spices*. 2 ed.; Longman Inc.: New York, 1981; Vol. 1, 813.
  26. Zoschke, H., *Das Chili Pepper Buch 2.0: Anbau, Rezepte, Wissenswertes*. 2 ed.; Suncoast Peppers GmbH: Kressbronn, 2007; 316.
  27. Suzuki, T.; Iwai, K., Constitution of Red Pepper Species: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology, and Food Science of the Pungent Principle of Capsicum Species. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Brossi, A., Ed. Academic Press: Orlando, FL, 1984; Vol. 13, 227-299.
  28. Suzuki, T.; Fujiwake, H.; Iwai, K., Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in Capsicum fruit I. Microscopic investigation of the structure of the placenta of Capsicum annum var. annum cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol.* **1980**, 21, (5), 839-853.
  29. Fujiwake, H.; Suzuki, T.; Iwai, K., Intracellular localization of capsaicin and its analogues in Capsicum fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of Capsicum fruit. *Plant Cell Physiol.* **1980**, 21, (6), 1023-1030.
  30. Tresh, J. C., Capsaicin, the Active Principle of Capsicum Fruits. *Pharmaceutical Journal and Transactions* **1876**, (7), 21.
  31. Micko, K., Über den wirksamen Bestandtheil des Cayennepfeffers. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **1899**, 2, (5), 411.
  32. Micko, K., Zur Kenntniss des Capsaicins. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **1898**, 1, (12), 818.
  33. Nelson, E. K., The constitution of Capsaicin, the pungent principle of Capsicum. *J. Am. Chem. Soc.* **1919**, 41, (7), 1115-1121.
  34. Kosuge, S.; Inagaki, Y.; Uehara, K., *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1958**, 32, 578.
  35. Bennet, D. J.; Kirby, G. W., Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J Chem Soc (C)* **1968**, 4, 442-446.
  36. Masada, Y.; Hashimoto, K.; Inoue, T.; Suzuki, M., Analysis of The Pungent Principles of Capsicum annum by Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Food Science* **1971**, 36, (6), 858-860.
  37. Jurenitsch, J.; David, M.; Heresch, F.; Kubelka, W., Nachweis und Identifizierung neuer Scharfstoffe in Capsicum-Früchten. *Planta Medica* **1979**, 36, 61-67.
  38. Thompson, R. Q., Homocapsaicin: nomenclature, indexing and identification. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**, 22, (4), 243-248.
  39. Heresch, F.; Jurenitsch, J., Off-line mass spectrometric monitoring of HPLC effluents - an improved identification and quantitation method for mixtures of similar compounds: Natural capsaicinoids. *Chromatographia* **1979**, 12, (10), 647.

40. Kopp, B.; Jurenitsch, J., Biosynthese der Capsaicinoide in *Capsicum annum* L. var. *annuum* II. Bildung des Säurerestes der Capsaicinoide aus L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin. *Planta Medica* **1981**, 43, 272-279.
41. Jurenitsch, J.; Wöginger, R., Isolierung und Struktur von Homodihydrocapsaicin II. *Scientia Pharmaceutica* **1982**, 50, (2), 111-114.
42. Collins, M.; Bosland, P. W., Rare and Novel Capsaicinoid Profiles in *Capsicum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter* **1994**, 13, 48-51.
43. Maillard, M.-N.; Giampaoli, P.; Richard, H. M. J., Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour and Fragrance Journal* **1997**, 12, (6), 409-413.
44. Thompson, R. Q.; Phinney, K. W.; Welch, M. J.; White, E. t., Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2005**, 381, (7), 1441-1451.
45. Thompson, R. Q.; Phinney, K. W.; Sander, L. C.; Welch, M. J., Reversed-phase liquid chromatography and argentation chromatography of the minor capsaicinoids. *Anal Bioanal Chem* **2005**, 381, (7), 1432-1440.
46. Thompson, R. Q.; Pennino, M. J.; Brenner, M. J.; Metha, M. A., Isolation of individual capsaicinoids from a mixture and their characterization by [<sup>13</sup>C] NMR spectrometry. *Talanta* **2006**, 70, (2), 315-322.
47. Kobata, K.; Todo, T.; Yazawa, S.; Iwai, K.; Watanabe, T., Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 sweet, of pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (5), 1695-1697.
48. Kobata, K.; Sutoh, K.; Todo, T.; Yazawa, S.; Iwai, K.; Watanabe, T., Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annum*. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, (2), 335-336.
49. Yazawa, S.; Watanabe, T.; Fushiki, T.; Kobata, K.; Imai, M.; Setoguchi, Y.; Hashizume, S. Capsaicinoid-Like Substances Having Ester Bond. 2007.
50. Kobata, K.; Tate, H.; Iwasaki, Y.; Tanaka, Y.; Ohtsu, K.; Yazawa, S.; Watanabe, T., Isolation of coniferyl esters from *Capsicum baccatum* L., and their enzymatic preparation and agonist activity for TRPV1. *Phytochemistry* **2008**, 69, (5), 1179-1184.
51. Hänsel, R.; Pertz, H., Alkaloide. In *Pharmakognosie — Phytopharmazie*, 8. ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007; 1315-1492.
52. Loschky, A. Zahl der Woche Nr. 12 vom 20.03.2007.  
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse>
53. Gavva, N. R.; Bannon, A. W.; Surapaneni, S.; Hovland, D. N., Jr.; Lehto, S. G.; Gore, A.; Juan, T.; Deng, H.; Han, B.; Kliensky, L.; Kuang, R.; Le, A.; Tamir, R.; Wang, J.; Youngblood, B.; Zhu, D.; Norman, M. H.; Magal, E.; Treanor, J. J.; Louis, J. C., The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* **2007**, 27, (13), 3366-3374.
54. Padilla, M.; Clark, G. T.; Merrill, R. L., Topical medications for orofacial neuropathic pain: a review. *J Am Dent Assoc* **2000**, 131, (2), 184-195.
55. Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **1997**, 389, (6653), 816-824.
56. Greffrath, W., The capsaicin receptor. Ein TRP zur Transduktion schmerzhafter Reize. *Schmerz* **2006**, 20, (3), 219-225.
57. Mori, A.; Lehmann, S.; O'Kelly, J.; Kumagai, T.; Desmond, J. C.; Pervan, M.; McBride, W. H.; Kizaki, M.; Koeffler, H. P., Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res* **2006**, 66, (6), 3222-3229.

58. Araldi, E. M.; Dell'aica, I.; Sogno, I.; Lorusso, G.; Garbisa, S.; Albini, A., Natural and synthetic agents targeting inflammation and angiogenesis for chemoprevention of prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **2008**, 8, (2), 146-155.
59. Ito, K.; Nakazato, T.; Yamato, K.; Miyakawa, Y.; Yamada, T.; Hozumi, N.; Segawa, K.; Ikeda, Y.; Kizaki, M., Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res* **2004**, 64, (3), 1071-1078.
60. Kim, J. D.; Kim, J. M.; Pyo, J. O.; Kim, S. Y.; Kim, B. S.; Yu, R.; Han, I. S., Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett* **1997**, 120, (2), 235-241.
61. Bhutani, M.; Pathak, A. K.; Nair, A. S.; Kunnumakkara, A. B.; Guha, S.; Sethi, G.; Aggarwal, B. B., Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6-inducible STAT3 activation. *Clin Cancer Res* **2007**, 13, (10), 3024-3032.
62. Kopelman, P. G., Obesity as a medical problem. *Nature* **2000**, 404, (6778), 635-643.
63. Kopelman, P., Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev* **2007**, 8 Suppl 1, 13-17.
64. Kawada, T.; Hagihara, K.; Iwai, K., Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J Nutr* **1986**, 116, (7), 1272-1278.
65. Kawada, T.; Watanabe, T.; Takaishi, T.; Tanaka, T.; Iwai, K., Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc Soc Exp Biol Med* **1986**, 183, (2), 250-256.
66. Hsu, C. L.; Yen, G. C., Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, (5), 1730-1736.
67. Yoshioka, M.; Lim, K.; Kikuzato, S.; Kiyonaga, A.; Tanaka, H.; Shindo, M.; Suzuki, M., Effects of red-pepper diet on the energy metabolism in men. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **1995**, 41, (6), 647-656.
68. Lim, K.; Yoshioka, M.; Kikuzato, S.; Kiyonaga, A.; Tanaka, H.; Shindo, M.; Suzuki, M., Dietary red pepper ingestion increases carbohydrate oxidation at rest and during exercise in runners. *Med Sci Sports Exerc* **1997**, 29, (3), 355-361.
69. Yoshioka, M.; St-Pierre, S.; Suzuki, M.; Tremblay, A., Effects of red pepper added to high-fat and high-carbohydrate meals on energy metabolism and substrate utilization in Japanese women. *Br J Nutr* **1998**, 80, (6), 503-510.
70. Yoshioka, M.; Imanaga, M.; Ueyama, H.; Yamane, M.; Kubo, Y.; Boivin, A.; St-Amand, J.; Tanaka, H.; Kiyonaga, A., Maximum tolerable dose of red pepper decreases fat intake independently of spicy sensation in the mouth. *Br J Nutr* **2004**, 91, (6), 991-995.
71. Ohnuki, K.; Haramizu, S.; Oki, K.; Watanabe, T.; Yazawa, S.; Fushiki, T., Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **2001**, 65, (12), 2735-2740.
72. Stewart, C., Jr.; Mazourek, M.; Stellari, G. M.; O'Connell, M.; Jahn, M., Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *J Exp Bot* **2007**, 58, (5), 979-991.
73. Leete, E.; Loudon, M. C. L., Biosynthesis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J Am Chem Soc* **1968**, 90, 6837-6841.
74. Mc, C. D.; Neish, A. C., Metabolism of phenylpropanoid compounds in *Salvia*. I. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine. *Can J Biochem Physiol* **1959**, 37, (4), 531-536.

75. Mc, C. D.; Neish, A. C., Metabolism of phenylpropanoid compounds in *Salvia*. II. Biosynthesis of phenolic cinnamic acids. *Can J Biochem Physiol* **1959**, 37, (4), 537-547.
76. Rangoonwala, R., On the biosynthesis of capsaicin. *Pharmazie* **1969**, 24, (3), 177.
77. Fujiwake, H.; Suzuki, T.; Iwai, K., Capsaicinoid Formation in the Protoplast from the Placenta of Capsicum Fruits. *Agric Biol Chem* **1982**, 46, (10), 2591-2592.
78. Fry, S. C., Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochem J* **1982**, 203, (2), 493-504.
79. Stafford, H. A., The Metabolism of Aromatic Compounds. *Annual Review of Plant Physiology* **1974**, 25, (1), 459-486.
80. Sukrasno, N.; Yeoman, M. M., Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. *Phytochemistry* **1993**, 32, (4), 839-844.
81. Nultsch, W., *Allgemeine Botanik*. 10 ed.; Thieme: Stuttgart, 1996; 313-316.
82. Aluru, M. R.; Mazourek, M.; Landry, L. G.; Curry, J.; Jahn, M.; O'Connell, M. A., Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas, in Capsicum fruit. *J Exp Bot* **2003**, 54, (388), 1655-1664.
83. Curry, J.; Aluru, M.; Mendoza, M.; Nevarez, J.; Melendrez, M.; O'Connell, M. A., Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent Capsicum spp. *Plant Science* **1999**, 148, (1), 47-57.
84. Stewart, C., Jr.; Kang, B. C.; Liu, K.; Mazourek, M.; Moore, S. L.; Yoo, E. Y.; Kim, B. D.; Paran, I.; Jahn, M. M., The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J* **2005**, 42, (5), 675-688.
85. Ohlrogge, J.; Browse, J., Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* **1995**, 7, (7), 957-970.
86. Koo, A. J.; Ohlrogge, J. B.; Pollard, M., On the export of fatty acids from the chloroplast. *J Biol Chem* **2004**, 279, (16), 16101-16110.
87. Richter, G., *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen - Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels*. 6 ed.; Thieme: Stuttgart, 1998; 305-314.
88. Post-Beittenmiller, D.; Roughan, G.; Ohlrogge, J. B., Regulation of Plant Fatty Acid Biosynthesis: Analysis of Acyl-Coenzyme A and Acyl-Acyl Carrier Protein Substrate Pools in Spinach and Pea Chloroplasts. *Plant Physiol* **1992**, 100, (2), 923-930.
89. Post-Beittenmiller, D.; Jaworski, J. G.; Ohlrogge, J. B., In vivo pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach. Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *J Biol Chem* **1991**, 266, (3), 1858-1865.
90. Shorosh, B. S.; Roesler, K. R.; Shintani, D.; van de Loo, F. J.; Ohlrogge, J. B., Structural analysis, plastid localization, and expression of the biotin carboxylase subunit of acetyl-coenzyme A carboxylase from tobacco. *Plant Physiol* **1995**, 108, (2), 805-812.
91. Harwood, J. L., Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1996**, 1301, (1-2), 7-56.
92. Kopka, J.; Robers, M.; Schuch, R.; Spener, F., Acyl carrier proteins from developing seeds of *Cuphea lanceolata* Ait. *Planta* **1993**, 191, (1), 102.
93. Jaworski, J. G.; Clough, R. C.; Barnum, S. R., A Cerulenin Insensitive Short Chain 3-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase in *Spinacia oleracea* Leaves. *Plant Physiol* **1989**, 90, (1), 41-44.
94. Ohlrogge, J. B., Design of New Plant Products: Engineering of Fatty Acid Metabolism. *Plant Physiol* **1994**, 104, (3), 821-826.
95. Topfer, R.; Martini, N.; Schell, J., Modification of Plant Lipid-Synthesis. *Science* **1995**, 268, (5211), 681-686.
96. Guerra, D. J.; Ohlrogge, J. B.; Frentzen, M., Activity of Acyl Carrier Protein Isoforms in Reactions of Plant Fatty Acid Metabolism. *Plant Physiol* **1986**, 82, (2), 448-453.

97. Kroumova, A. B.; Xie, Z.; Wagner, G. J., A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (24), 11437-11441.
98. Szamosi, I.; Shaner, D. L.; Singh, B. K., Identification and Characterization of a Biodegradative Form of Threonine Dehydratase in Senescing Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Leaf. *Plant Physiol* **1993**, 101, (3), 999-1004.
99. Samach, A.; Hareven, D.; Gutfinger, T.; Ken-Dror, S.; Lifschitz, E., Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, (7), 2678-2682.
100. Alexander, F. W.; Sandmeier, E.; Mehta, P. K.; Christen, P., Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  families. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 219, (3), 953-960.
101. Singh, B. K.; Shaner, D. L., Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *Plant Cell* **1995**, 7, (7), 935-944.
102. Szamosi, I. T.; Shaner, D. L.; Singh, B. K., Inhibition of Threonine Dehydratase Is Herbicidal. *Plant Physiol* **1994**, 106, (4), 1257-1260.
103. Wolff, R. L.; Laviaille, O.; Pedrono, F.; Pasquier, E.; Deluc, L. G.; Marpeau, A. M.; Aitzetmuller, K., Fatty acid composition of Pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* **2001**, 36, (5), 439-451.
104. van der Hoeven, R. S.; Steffens, J. C., Biosynthesis and elongation of short- and medium-chain-length fatty acids. *Plant Physiol* **2000**, 122, (1), 275-282.
105. Markai, S.; Marchand, P. A.; Mabon, F.; Baguet, E.; Billault, I.; Robins, R. J., Natural deuterium distribution in branched-chain medium-length fatty acids is nonstatistical: a site-specific study by quantitative  $^2\text{H}$  NMR spectroscopy of the fatty acids of capsaicinoids. *Chembiochem* **2002**, 3, (2-3), 212-218.
106. Ohlrogge, J. B.; Kuo, T. M., Plants have isoforms for acyl carrier protein that are expressed differently in different tissues. *J Biol Chem* **1985**, 260, (13), 8032-8037.
107. Bonaventure, G.; Ohlrogge, J. B., Differential regulation of mRNA levels of acyl carrier protein isoforms in Arabidopsis. *Plant Physiol* **2002**, 128, (1), 223-235.
108. Schutt, B. S.; Brummel, M.; Schuch, R.; Spener, F., The role of acyl carrier protein isoforms from *Cuphea lanceolata* seeds in the de-novo biosynthesis of medium-chain fatty acids. *Planta* **1998**, 205, (2), 263-268.
109. Suh, M. C.; Schultz, D. J.; Ohlrogge, J. B., Isoforms of acyl carrier protein involved in seed-specific fatty acid synthesis. *Plant J* **1999**, 17, (6), 679-688.
110. Schuch, R.; Brummel, M.; Spener, F.,  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III in *Cuphea lanceolata* seeds: identification and analysis of reaction products. *J. plant physiol* **1994**, 143, 556-560.
111. Leonard, J. M.; Knapp, S. J.; Slabaugh, M. B., A *Cuphea* beta-ketoacyl-ACP synthase shifts the synthesis of fatty acids towards shorter chains in Arabidopsis seeds expressing *Cuphea* FatB thioesterases. *Plant J* **1998**, 13, (5), 621-628.
112. Brück, F. M.; Brummel, M.; Schuch, R.; Spener, F., In-vitro evidence for feed-back regulation of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in medium-chain fatty acid biosynthesis. *Planta* **1996**, 198, (2), 271.
113. Schutt, B. S.; Abbadi, A.; Loddenkotter, B.; Brummel, M.; Spener, F., Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase IV: a key enzyme for regulation of medium-chain fatty acid synthesis in *Cuphea lanceolata* seeds. *Planta* **2002**, 215, (5), 847-854.
114. Dehesh, K.; Edwards, P.; Fillatti, J.; Slabaugh, M.; Byrne, J., KAS IV: a 3-ketoacyl-ACP synthase from *Cuphea* sp. is a medium chain specific condensing enzyme. *Plant J* **1998**, 15, (3), 383-390.

115. Abbadi, A.; Brummel, M.; Spener, F., Knockout of the regulatory site of 3-ketoacyl-ACP synthase III enhances short- and medium-chain acyl-ACP synthesis. *Plant J* **2000**, 24, (1), 1-9.
116. Yasuno, R.; von Wettstein-Knowles, P.; Wada, H., Identification and molecular characterization of the beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase component of the Arabidopsis mitochondrial fatty acid synthase. *J Biol Chem* **2004**, 279, (9), 8242-8251.
117. Mekhedov, S.; Cahoon, E. B.; Ohlrogge, J., An unusual seed-specific 3-ketoacyl-ACP synthase associated with the biosynthesis of petroselinic acid in coriander. *Plant Mol Biol* **2001**, 47, (4), 507-518.
118. Dehesh, K.; Tai, H.; Edwards, P.; Byrne, J.; Jaworski, J. G., Overexpression of 3-ketoacyl-acyl-carrier protein synthase III in plants reduces the rate of lipid synthesis. *Plant Physiol* **2001**, 125, (2), 1103-1114.
119. Choi, K. H.; Heath, R. J.; Rock, C. O., beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol* **2000**, 182, (2), 365-370.
120. Prasad, B. C.; Gururaj, H. B.; Kumar, V.; Giridhar, P.; Ravishankar, G. A., Valine pathway is more crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* mill. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, (18), 6660-6666.
121. Jones, A.; Davies, H. M.; Voelker, T. A., Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell* **1995**, 7, (3), 359-371.
122. Dormann, P.; Frentzen, M.; Ohlrogge, J. B., Specificities of the Acyl-Acyl Carrier Protein (ACP) Thioesterase and Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase for Octadecenoyl-ACP Isomers (Identification of a Petroselinoyl-ACP Thioesterase in Umbelliferae). *Plant Physiol* **1994**, 104, (3), 839-844.
123. Bonaventure, G.; Salas, J. J.; Pollard, M. R.; Ohlrogge, J. B., Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell* **2003**, 15, (4), 1020-1033.
124. Davies, H. M., Medium-Chain Acyl-Acp Hydrolysis Activities of Developing Oilseeds. *Phytochemistry* **1993**, 33, (6), 1353-1356.
125. Voelker, T. A.; Jones, A.; Cranmer, A. M.; Davies, H. M.; Knutzon, D. S., Broad-range and binary-range acyl-acyl-carrier protein thioesterases suggest an alternative mechanism for medium-chain production in seeds. *Plant Physiol* **1997**, 114, (2), 669-677.
126. Fuhrmann, J.; Johnen, T.; Heise, K. P., Compartmentation of Fatty-Acid Metabolism in Zygotic Rape Embryos. *Journal of Plant Physiology* **1994**, 143, (4-5), 565-569.
127. Schnurr, J. A.; Shockey, J. M.; de Boer, G. J.; Browse, J. A., Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis. *Plant Physiol* **2002**, 129, (4), 1700-1709.
128. Shockey, J. M.; Fulda, M. S.; Browse, J., Arabidopsis contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases. *Plant Physiol* **2003**, 132, (2), 1065-1076.
129. Orchard, S. G.; Anderson, J. W., Substrate specificity of the short chain fatty acyl-coenzyme a synthetase of *Pinus radiata*. *Phytochemistry* **1996**, 41, (6), 1465-1472.
130. Lee, S. J.; Suh, M. C.; Kim, S.; Kwon, J. K.; Kim, M.; Paek, K. H.; Choi, D.; Kim, B. D., Molecular cloning of a novel pathogen-inducible cDNA encoding a putative acyl-CoA synthetase from *Capsicum annuum* L. *Plant Mol Biol* **2001**, 46, (6), 661-671.
131. Fujiwake, H.; Suzuki, T.; Oka, S.; Iwai, K., Formation and Metabolism of Pungent Principle of *Capsicum* Fruits. 7. Enzymatic Formation of Capsaicinoid from

- Vanillylamine and Iso-Type Fatty-Acids by Cell-Free-Extracts of Capsicum-Annuum Var Annuum Cv Karayatsubusa. *Agric Biol Chem* **1980**, 44, (12), 2907-2912.
132. Shanklin, J.; Cahoon, E. B., Desaturation And Related Modifications Of Fatty Acids I. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **1998**, 49, 611-641.
133. Schultz, D. J.; Cahoon, E. B.; Shanklin, J.; Craig, R.; Cox-Foster, D. L.; Mumma, R. O.; Medford, J. I., Expression of a delta 9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega 5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (16), 8771-8775.
134. Schultz, D. J.; Suh, M. C.; Ohlrogge, J. B., Stearoyl-acyl carrier protein and unusual acyl-acyl carrier protein desaturase activities are differentially influenced by ferredoxin. *Plant Physiol* **2000**, 124, (2), 681-692.
135. Suh, M. C.; Schultz, D. J.; Ohlrogge, J. B., What limits production of unusual monoenoic fatty acids in transgenic plants? *Planta* **2002**, 215, (4), 584-595.
136. Murphy, D.; Piffanelli, P., 5. Fatty acid desaturases: structure, mechanism and regulation. In *Plant Lipid Biosynthesis - Fundamentals and Agricultural Applications*, Harwood, J. L., Ed. Cambridge University Press: Cambridge, 1998; Vol. 67, 95-130.
137. Mekhedov, S.; de Ilarduya, O. M.; Ohlrogge, J., Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiol* **2000**, 122, (2), 389-402.
138. Gray, G. R.; Ivanov, A. G.; Krol, M.; Williams, J. P.; Kahn, M. U.; Myscich, E. G.; Huner, N. P., Temperature and Light modulate the trans-delta3-hexadecenoic acid content of phosphatidylglycerol: light-harvesting complex II organization and non-photochemical quenching. *Plant Cell Physiol* **2005**, 46, (8), 1272-1282.
139. Whitaker, B. D., Glycerolipid-Fatty-Acid Desaturase Deficiencies in Chloroplasts from Fruits of Capsicum-Annuum-L. *Planta* **1992**, 187, (2), 261-265.
140. Dormann, P.; Voelker, T. A.; Ohlrogge, J. B., Accumulation of palmitate in Arabidopsis mediated by the acyl-acyl carrier protein thioesterase FATB1. *Plant Physiol* **2000**, 123, (2), 637-644.
141. Aitzetmuller, K.; Tsevegsuren, N., Seed Fatty-Acids, Front-End-Desaturases and Chemotaxonomy - a Case-Study in the Ranunculaceae. *Journal of Plant Physiology* **1994**, 143, (4-5), 538-543.
142. Tsevegsuren, N.; Aitzetmuller, K.; Bruhl, L.; Werner, G., Seed oil fatty acids of Mongolian Compositae: The trans-fatty acids of *Heteropappus hispidus*, *Asterothamnus centrali-asiaticus* and *Artemisia palustris*. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **2000**, 23, (5), 360-366.
143. Iwai, K.; Suzuki, T.; Fujiwake, H., Formation and Accumulation of Pungent Principle of Hot Pepper Fruits, Capsaicin and Its Analogs, in Capsicum-Annuum Var Annuum Cv Karayatsubusa at Different Growth-Stages after Flowering. *Agric Biol Chem* **1979**, 43, (12), 2493-2498.
144. Kopp, B.; Jurenitsch, J., Biosynthesis of Capsicum annuum L. var annuum. III Problem of the formation of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Scientia Pharmaceutica* **1982**, 50, (2), 150-157.
145. Blum, E.; Mazourek, M.; O'Connell, M.; Curry, J.; Thorup, T.; Liu, K. D.; Jahn, M.; Paran, I., Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in Capsicum. *Theoretical and Applied Genetics* **2003**, 108, (1), 79-86.
146. Prasad, B. C.; Kumar, V.; Gururaj, H. B.; Parimalan, R.; Giridhar, P.; Ravishankar, G. A., Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, (36), 13315-13320.

147. Kim, M.; Kim, S.; Kim, S.; Kim, B. D., Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Molecules and Cells* **2001**, 11, (2), 213-219.
148. Sutoh, K.; Kobata, K.; Yazawa, S.; Watanabe, T., Capsinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 sweet. *Biosci Biotechnol Biochem* **2006**, 70, (6), 1513-1516.
149. Tewksbury, J. J.; Nabhan, G. P., Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chilies. *Nature* **2001**, 412, (6845), 403-404.
150. Jordt, S. E.; Julius, D., Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **2002**, 108, (3), 421-430.
151. Tewksbury, J. J.; Manchego, C.; Haak, D. C.; Levey, D. J., Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *J Chem Ecol* **2006**, 32, (3), 547-564.
152. Blum, E.; Liu, K.; Mazourek, M.; Yoo, E. Y.; Jahn, M.; Paran, I., Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* **2002**, 45, (4), 702-705.
153. Loaiza-Figueroa, F.; Ritland, K.; Cancino, J. A. L.; Tanksley, S. D., Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* **1989**, 165, (3), 159.
154. Ben-Chaim, A.; Borovsky, Y.; Falise, M.; Mazourek, M.; Kang, B. C.; Paran, I.; Jahn, M., QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet* **2006**, 113, (8), 1481-1490.
155. Garcés-Claver, A.; Fellman, S.; Gil-Ortega, R.; Jahn, M.; Arnedo-Andrés, M., Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **2007**, 115, (7), 907.
156. Lee, C. J.; Yoo, E.; Shin, J. H.; Lee, J.; Hwang, H. S.; Kim, B. D., Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Molecules and Cells* **2005**, 19, (2), 262-267.
157. Votava, E. J.; Bosland, P. W., Novel Sources of Non-Pungency in *Capsicum* Species. *Capsicum and Eggplant Newsletter* **2002**, 21, 66-68.
158. Del Rosario Abraham-Juarez, M.; Del Carmen Rocha-Granados, M.; Lopez, M. G.; Rivera-Bustamante, R. F.; Ochoa-Alejo, N., Virus-induced silencing of Comt, pAmt and Kas genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta* **2008**, 227, (3), 681-695.
159. Hiepler, C. Capsaicinoide in *Capsicum*-Früchten definierter Herkunft und ihre Stabilität bei Verarbeitung und Lagerung. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal, Wuppertal, 2004.
160. Kopka, J.; Ohlrogge, J. B.; Jaworski, J. G., Analysis of in vivo levels of acyl-thioesters with gas chromatography/mass spectrometry of the butylamide derivative. *Anal Biochem* **1995**, 224, (1), 51-60.
161. Kingston, D. G. I.; Bursey, J. T.; Bursey, M. M., Intramolecular hydrogen transfer in mass-spectra II McLafferty rearrangement and related reactions. *Chem Rev* **1974**, 74, (2), 215-242.
162. Peusch, M. Methoden zur Capsaicinoidbestimmung in schärfearmen *Capsicum*-Gewürzen und capsicumhaltigen Lebensmitteln. Bergische Universität-GH Wuppertal, Wuppertal, 1997.
163. Schulte, E.; Weber, K., Rapid Preparation of Fatty-Acid Methyl-Esters from Fats with Trimethylsulfoniumhydroxide or Sodium Methylate. *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology* **1989**, 91, (5), 181-183.

164. Zewdie, Y.; Bosland, P. W.; Steiner, R., Combining ability and heterosis for capsaicinoids in *Capsicum pubescens*. *HortScience* **2001**, 36, (7), 1315-1317.
165. Prasad, B. C.; Gururaj, H. B.; Kumar, V.; Giridhar, P.; Parimalan, R.; Sharma, A.; Ravishankar, G. A., Influence of 8-methyl-nonenoic acid on capsaicin biosynthesis in in-vivo and in-vitro cell cultures of *Capsicum* spp. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, (5), 1854-1859.
166. Yao, J.; Nair, M. G.; Chandra, A., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Scotch Bonnet (*Capsicum annum*) and Quantification of Capsaicin and Dihydrocapsaicin. *J Agric Food Chem* **1994**, 42, (6), 1303-1305.
167. Peusch, M.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M.; Mueller, A.; Anklam, E., Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens* L) and paprika (*Capsicum annum* L) using supercritical fluids and organic solvents. *Z Lebensm Unters Forsch A - Food Research and Technology* **1997**, 204, (5), 351-355.
168. Rock, C. O.; Garwin, J. L., Preparative enzymatic synthesis and hydrophobic chromatography of acyl-acyl carrier protein. *J Biol Chem* **1979**, 254, (15), 7123-7128.
169. Guerra, D. J.; Dziewanowska, K.; Ohlrogge, J. B.; Beremand, P. D., Purification and characterization of recombinant spinach acyl carrier protein I expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1988**, 263, (9), 4386-4391.
170. Cronan, J. E., Jr.; Klages, A. L., Chemical synthesis of acyl thioesters of acyl carrier protein with native structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, 78, (9), 5440-5444.
171. Ray, T. K.; Cronan, J. E., Jr., Activation of long chain fatty acids with acyl carrier protein: demonstration of a new enzyme, acyl-acyl carrier protein synthetase, in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **1976**, 73, (12), 4374-4378.
172. Gao, L.; Chiou, W.; Tang, H.; Cheng, X.; Camp, H. S.; Burns, D. J., Simultaneous quantification of malonyl-CoA and several other short-chain acyl-CoAs in animal tissues by ion-pairing reversed-phase HPLC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, 853, (1-2), 303-313.
173. Chemical analysis; decision limit; detection limit and determination limit; estimation in case of repeatability; terms, methods, evaluation. In *DIN 32645*, Normung, D. I. f., Ed. Beuth: Berlin, 1994.
174. Kasuya, F.; Oti, Y.; Tatsuki, T.; Igarashi, K., Analysis of medium-chain acyl-coenzyme A esters in mouse tissues by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **2004**, 325, (2), 196-205.
175. Becker, H.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewalt, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G., *Organikum*. 15 ed.; VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften: Berlin, 1977; 513-514.