

**Chemie und Folgeprodukte von  
1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie und Physik  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker Michael Voigt  
geb. am 14. März 1978 in Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus Glomb  
2. Gutachterin: Prof. Dr. Monika Pischetsrieder

Halle (Saale), 06. Mai 2010



## Abstract

Michael Voigt

Chemie und Folgeprodukte von 1-Desoxy-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose

Die Maillard-Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren oder Proteinen ist von großer Bedeutung sowohl in der Lebensmittelchemie als auch in der medizinischen Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Chemie von 1-Desoxy-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose (1-Desoxyhexo-2,3-diulose, 1-DG), einem zentralen Intermediat der Maillard-Reaktion, in wässrigen Maillard-Modellsystemen in Anwesenheit von L-Alanin untersucht. Für den Nachweis der verschiedenen Folgeprodukte wurden zahlreiche analytische Methoden wie die GC-MS, GC-FID und die HPLC-UV angewendet. Als Folgeprodukte von 1-DG konnten die Carbonsäuren Essigsäure, Glycerinsäure und Milchsäure identifiziert werden, die stabile Endprodukte der Reaktion darstellten. Zusätzlich wurden reaktive Fragmentierungsprodukte wie die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen Threoson, 1-Desoxytetro-2,3-diulose, 3-Desoxy-2-tetrosulose und Methylglyoxal, die Hydroxycarbonylverbindungen Erythrose und Acetol, sowie die Aldehyde Acetaldehyd, Glycerinaldehyd und Glykolaldehyd verifiziert. Schließlich wurden mit 3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4*H*-pyran-4-on ( $\gamma$ -Pyranon) und 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-furan-3(2*H*)-on Folgeprodukte mit intaktem Kohlenstoffskelett nachgewiesen.

Quantitative Betrachtungen erlaubten Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen. Die Ergebnisse bestätigten, dass die hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung der isomeren 1-Desoxy-2,4-diulose eine entscheidende Rolle beim Abbau von 1-DG und damit für die Chemie der Hexosen in der Maillard-Reaktion spielt. Daneben laufen weitere Reaktionen wie Oxidation, Enolisierung und Dehydratisierung ab.

Es konnte auch nachgewiesen werden, dass es bei der Reaktion von 1-DG mit der  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin durch  $\beta$ -Dicarbonylspaltung zur Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin kommt, einer stabilen Modifizierung der Lysinseitenkette.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### Publikationen

Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Reactivity of 1-Deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose: A Key Intermediate in the  
Maillard Chemistry of Hexoses.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57, 4765-4770.

Voigt, M., Smuda, M., Pfahler, C., Glomb, M. A.,  
Oxygen dependent fragmentation reactions during the degradation of 1-deoxy-D-  
erythro-hexo-2,3-diulose.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 5685–5691.

### Tagungsvorträge:

Glomb, M. A., Voigt, M.,  
Role of 1-Deoxy-2,3-hexodiulose during the Degradation of Hexoses.  
9<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard Reaction, 01.-05.09.2007, Munich

Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Bildung kurzkettiger Carbonsäuren in Maillard-Modellsystemen.  
18. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen  
Gesellschaft der GDCh, 03.-04.04.2008, Jena

### Posterbeiträge

Schubert, M., Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Untersuchungen zur Bildung eines neuartigen Furanons aus 1-Desoxy-2,3-  
glucodiulose.  
35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 18.-20.09.2006, Dresden  
(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2007**, 61, 76-77)

Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Folgeprodukte von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose  
36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12.09.2007, Erlangen-Nürnberg  
(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2008**, 62, 71)

Keuth, O., Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Untersuchung organischer Säuren in Maillard-Modellsystemen mit der  
Gaschromatographie.  
36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12.09.2007, Erlangen-Nürnberg  
(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2008**, 62, 71)

Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Dicarbonylverbindungen und Aldehyde aus 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose.  
37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 08.-10.09.2008, Kaiserslautern  
(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2009**, 63, 100)

Heymann, T., Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Reaktivität von Methylglyoxal unter lebensmitteltypischen Bedingungen.  
38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin  
(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2010**, 64, 26)

Rudolph, H. M., Voigt, M., Glomb, M. A.,  
Untersuchungen zur Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin in wässrigen Maillard-  
Modellsystemen.  
38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin  
(Abstract in: *Lebensmittelchemie* in Druck)

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand im Bereich Lebensmittelchemie und Umweltchemie am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Marcus Glomb in der Zeit von Juni 2005 bis Mai 2009.

Zu allererst möchte ich herzlich Herrn Professor Dr. Marcus Glomb für die Überlassung des interessanten Themas zur selbstständigen Bearbeitung danken. Ebenso gilt ihm mein Dank für das stets entgegengebrachte Vertrauen, die kompetente fachliche Betreuung und die vielen anregenden Diskussionen und Überlegungen zu den erhaltenen Ergebnissen und den dargestellten Reaktionsmechanismen.

Frau Professorin Dr. Monika Pischetsrieder gilt mein Dank für die Übernahme der Begutachtung der Arbeit.

Allen anderen Mitarbeitern im Arbeitskreis gilt ebenfalls mein Dank für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die immer vorhandene Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Frau Dr. Jenny Gobert für vier Jahre gute Tischnachbarschaft und ihre Anregungen zur schriftlichen Ausfertigung dieser Arbeit. Frau Karin Hengmith danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des lebensmittelchemischen Praktikums.

Frau DLC Heidi Maria Rudolph, Herrn DLC Martin Schubert, Herrn DLC Oliver Keuth und Herrn DLC Thomas Heymann danke ich für ihren, im Rahmen der betreuten Diplomarbeiten, geleisteten Beitrag zu dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich während dieser Arbeit und das ganze Studium hindurch so wunderbar unterstützt und mich stets mit Verständnis und Ermutigungen begleitet haben.

Schließlich danke ich auch dem Rest meiner Familie und allen Freunden, die mir ebenfalls fortwährend zur Seite standen und deren Hilfe ich mir in jedem Moment sicher sein konnte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>2. THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>11</b>
2.1 DIE ANFANGSPHASE DER MAILLARD-REAKTION .....	11
2.1.1 Bildung des Amadoriprodukts.....	11
2.1.2 Bildung von Desoxyosonen.....	12
2.1.3 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose .....	14
2.1.4 Reaktionen der Dicarbonylstruktur.....	18
2.2 MAILLARD-REAKTION IN VIVO .....	20
2.2.1 N <sup>ε</sup> -ACETYL-L-LYSIN ALS MAILLARD-REAKTIONSPRODUKT .....	24
2.3 ANALYTISCHE ARBEITSTECHNIKEN.....	26
2.3.1 Silylierung für die Gaschromatographie .....	26
2.3.2 In-situ-Derivatisierung für Carbonsäuren.....	27
2.3.3 O-Benzylloxim-Trimethylsilylierung.....	28
2.3.4 Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin für α-Dicarbonylverbindungen.....	28
2.3.5 Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin für Aldehyde.....	30
2.3.6 post-column-Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd.....	31
<b>3. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>32</b>
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
4.1 ABBAU VON 1-DESOXY-D-ERYTHRO-HEXO-2,3-DIULOSE.....	33
4.1.1 Bildung von Carbonsäuren.....	33
4.1.2 Bildung von Hydroxycarbonyl- und Dicarbonylverbindungen.....	36
4.1.3 Bildung von Aldehyden .....	43
4.2 ABBAU VON 3,5-DIHYDROXY-6-METHYL-2,3-DIHYDRO-4H-PYRAN-4-ON .....	46
4.3 BILDUNG VON N <sup>ε</sup> -ACETYL-L-LYSIN AUS 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE .....	50
4.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON N <sup>ε</sup> -CARBOXYETHYLLYSIN .....	56
4.4.1 Darstellung von N <sup>ε</sup> -Carboxyethyllysin (Standard).....	56
4.4.2 Darstellung von 2- <sup>13</sup> C-Methylglyoxal.....	60
4.4.3 Bildung von <sup>13</sup> C-N <sup>ε</sup> -Carboxyethyllysin.....	60
4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON 4-HYDROXY-5-HYDROXYMETHYL-3-METHYL-5(H)-FURAN-2-ON .....	61
4.5.1 Strukturanalyse.....	61
4.5.2 Inkubation von α-D-Glucosaccharino-γ-lacton .....	62
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
5.1 ABBAU VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE .....	64
5.2 BILDUNG NEUARTIGER AMIDSTRUKTUREN AUS 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	74

5.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON N <sup>ε</sup> -CARBOXYETHYLLYSIN .....	77
5.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR BILDUNG VON BILDUNG VON 4-HYDROXY-5-HYDROXYMETHYL-3-METHYL-5(H)-FURAN-2-ON .....	81
5.5 BILANZIERUNG DER NACHGEWIESENEN FOLGEPRODUKTE .....	83
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>7. EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>90</b>
7.1 ABBAU VON 1-DESOXY-D-ERYTHRO-HEXO-2,3-DIULOSE.....	90
7.2 ANAEROBE INKUBATIONEN .....	90
7.3 INKUBATIONEN VON 1-DG MIT N <sup>α</sup> -t-BOC-LYSIN.....	90
7.4 ISOLIERUNG VON N <sup>ε</sup> -ACETYL-L-LYSIN.....	91
7.5 INKUBATIONEN VON 2- <sup>13</sup> C-METHYGLYOXAL MIT N <sup>α</sup> -t-BOC-LYSIN.....	91
7.6 DERIVATISIERUNGSREAKTIONEN.....	92
7.6.1 Trimethylsilylierung.....	92
7.6.2 Decylchloroformat Derivat von Essigsäure.....	92
7.6.3 Chinoxalin-Derivate .....	93
7.6.4 O-Benzoyloxim Trimethylsilylierung .....	93
7.7 PRÄPARATIVE ARBEITEN.....	94
7.7.1 Darstellung von 1-Desoxy-2-O-ethyl-4,5-O-isopropyliden-D-erythro-hex-1-en-3-ulose .....	94
7.7.2 Darstellung von 1-Desoxy-4,5-isopropyliden-D-erythro-hexo-2,3-diulose .....	94
7.7.3 Darstellung von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose.....	95
7.7.4 Isolierung von 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-furan-3(2H)-on .....	95
7.7.5 Darstellung von 3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-on.....	96
7.7.6 Inkubation α-D-Glucosaccharino-γ-lacton/Alanin .....	96
7.7.7 Abspaltung der t-BOC-Schutzgruppe.....	97
7.7.8 Derivatisierung von Amininen zur Bestimmung mittels Gas-Chromatographie.....	97
7.7.9 Herstellung Derivatisierungsreagenz o-Phthaldialdehyd.....	98
7.7.10 Darstellung von N <sup>ε</sup> -Carboxyethyllysin (Standard).....	98
7.7.11 Synthese von 2- <sup>13</sup> C-Methylglyoxal (2-Oxo-[2- <sup>13</sup> C]propanal].....	99
<b>8. CHEMIKALIEN UND GERÄTE.....</b>	<b>100</b>
8.1 CHEMIKALIEN.....	100
8.2 Geräte .....	102
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>106</b>
9.1 LITERATURVERZEICHNIS .....	106
9.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	112
9.3 LEBENS LAUF .....	115
9.4 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	117



## 1. Einleitung

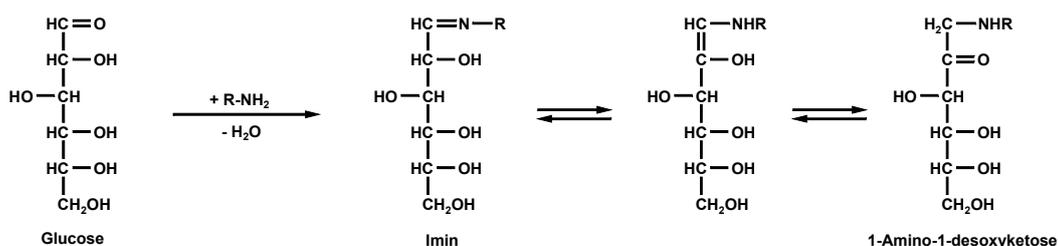
Die thermische Behandlung von Lebensmitteln, wie sie z.B. beim Backen von Brot, beim Braten von Fleisch oder auch beim Rösten von Kaffee geschieht, ist oftmals mit deutlichen Veränderungen in Geschmack und Aroma der Produkte verbunden. Ebenso weisen die so prozessierten Lebensmittel meist eine mehr oder weniger intensive Braunfärbung auf. Diese Veränderungen sind dabei oft auf einen Komplex chemischer Reaktionen zurückzuführen, der heute unter dem Überbegriff Maillard-Reaktion bekannt ist. Der algerisch-französische Chemiker Louis Camille Maillard untersuchte zu Anfang des 20. Jahrhunderts die Möglichkeiten einer Proteinsynthese und erhitze zu diesem Zweck freie Aminosäuren in Glycerin. Im Verlauf seiner Studien ging er zu komplexeren Alkoholen über, um schließlich die Reaktionen von Aminosäuren mit Zuckern zu untersuchen. Im Jahre 1912 berichtete er über die Reaktion, die er beim Erhitzen eines Gemisches von D-Glucose und Glycin beobachtete (1). Er beschrieb die Bildung von  $\text{CO}_2$ , die bei dieser Reaktion auftretende Braunfärbung des Reaktionsgemisches und äußerte darüber hinaus Vermutungen über einige Details der chemischen Abläufe der Reaktion, die sich später als erstaunlich zutreffend erweisen sollten. So vermutete er zum Beispiel, dass das gebildete Kohlendioxid der Carboxylfunktion der Aminosäure entstammte, dass es im Zuge der Reaktion zur Dehydratisierung des Zuckers unter Ausbildung von Doppelbindungen kommt und dass die für die Braunfärbung verantwortlichen Verbindungen stickstoffhaltige polycyclische Verbindungen sein könnten. In den Jahren 1912-1917 veröffentlichte Maillard insgesamt sieben Artikel über seine Reaktion, die jedoch viele Jahre nicht beachtet wurden (2).

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1 Die Anfangsphase der Maillard-Reaktion

#### 2.1.1 Bildung des Amadoriprodukts

Die zu Beginn der Maillard-Reaktion ablaufenden Reaktionen sollen am Beispiel der D-Glucose dargestellt werden<sup>1</sup>. Abbildung 1 zeigt die Reaktion des reduzierenden Zuckers mit einer Aminogruppe, die zum Beispiel aus einer Aminosäure stammen kann.



**Abb. 1:** Bildung des Amadori-Produkts von D-Glucose

Dabei entsteht unter Wasserabspaltung zunächst das entsprechende Imin (Schiffsche Base), das in einer als Amadori-Umlagerung bezeichneten Reaktion über ein intermediär auftretendes 1,2-Enaminol zur 1-Amino-1-desoxyketose, dem Amadori-Produkt, reagiert (3). Das Amadori-Produkt ist wie eine normale Ketose in der Lage Hemiketale auszubilden und weist daher eine im Vergleich zu den Iminen erhöhte Stabilität auf (4). Analytisch kann es unter bestimmten Voraussetzungen als Marker für die thermische Behandlung von Lebensmitteln z.B. Milchprodukten herangezogen werden (Furosine-Methode (5, 6)).

Aus Ketosen entstehen bei der Umsetzung mit Aminkomponenten in einer entsprechenden Reaktion (Abbildung 2) Aminoaldosen, die Heyns-Produkte (7).

<sup>1</sup> Es sei darauf hingewiesen, dass die in den folgenden Abbildungen verwendeten offenkettigen Strukturen eine Vereinfachung darstellen; in Lösung liegen überwiegend die Halbacetal- bzw. Hemiketalformen vor

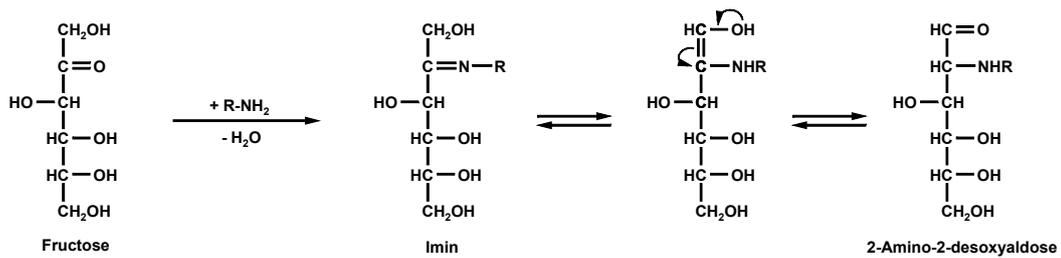


Abb. 2: Bildung des Heyns-Produktes am Beispiel der Fructose

### 2.1.2 Bildung von Desoxyosonen

Trotz der partiellen Stabilität stellen die Amadori-Verbindungen nur Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion dar. Durch die Säuren/Basen-Katalyse der Aminogruppe reagieren sie bereits im pH-Bereich 4-7 und moderaten Temperaturen zu verschiedenen Produkten weiter. So entsteht auf dem Weg der 1,2-Enolisierung nach Wasserabspaltung das 3-Desoxyoson, im Beispiel (Abbildung 3) das 3-Desoxyglucoson (3-DG).

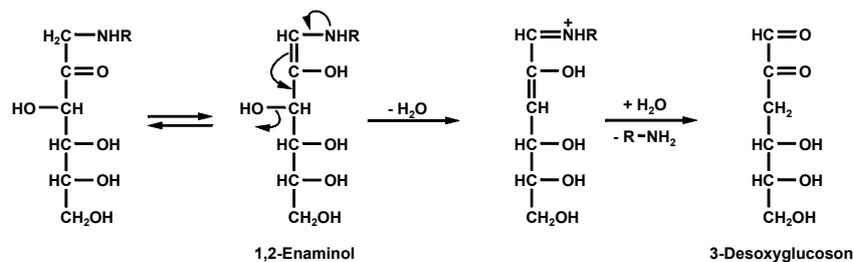
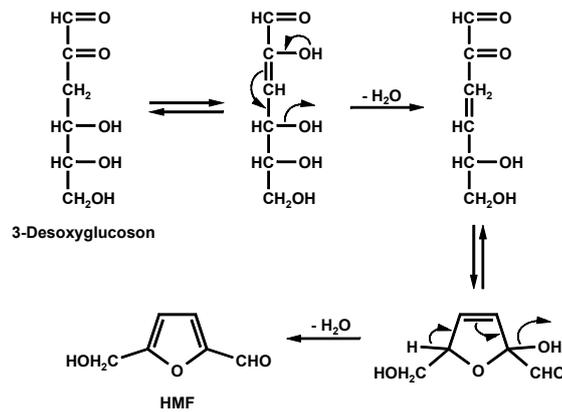


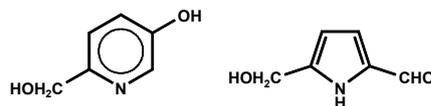
Abb. 3: Bildung von 3-Desoxyglucoson

Ein wichtiges Folgeprodukt des 3-Desoxyosons von Hexosen ist 5-Hydroxymethylfurfural, kurz HMF (Abbildung 4), das analytisch als Indikator einer Hitzebehandlung von Lebensmitteln (z.B. zum Nachweis einer technologisch vermeidbaren Überhitzung bei Fruchtsaft) herangezogen werden kann (8).



**Abb. 4:** Entstehung von HMF aus 3-Desoxyglucoson

Dabei ist jedoch zu beachten, dass vor allem unter sauren Bedingungen die Wasserabspaltung auch ohne Beteiligung des Amins direkt aus dem Zucker erfolgen kann. In einer entsprechenden Reaktion entsteht aus Pentosen Furfural. Die Bildung von HMF kann ausbleiben, wenn höhere Konzentrationen an Aminosäuren, Aminen oder auch Ammoniak vorhanden sind. Dann entstehen verschiedene Pyridin- bzw. Pyrrolderivate, zum Beispiel die in Abbildung 5 gezeigten Strukturen, die bei der Herstellung von Zuckercouleur durch Reaktion mit Ammoniak gebildet werden (4).



**Abb. 5:** Pyridin- und Pyrrolstrukturen aus 3-Desoxyglucoson

Ein weiterer Reaktionsweg der Amadori-Verbindung ist die 2,3-Enolisierung. Die entstehende Struktur wird leicht dehydratisiert (Abbildung 6), da die Hydroxylgruppe am C-4 allylständig zur Endiolgruppe ist. Bei dieser Reaktion verbleibt die Aminogruppe entsprechend im Molekül und es entsteht 1-Amino-1,4-didesoxyoson, im Beispiel für Glucose 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson.

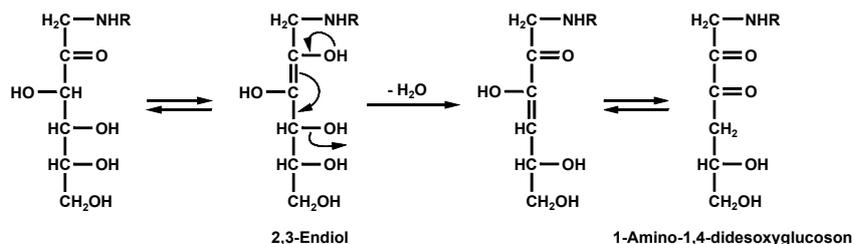


Abb. 6: Bildung von 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson

### 2.1.3 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose

Alternativ zur Dehydratisierung am C-4 kann die Aminogruppe am C-1 aus dem 2,3-Endiol eliminiert werden, da diese ebenfalls allylständig zur Endiolfunktion ist und das Amin eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt. Die in dieser Reaktion gebildete Verbindung wird als 1-Desoxyoson bezeichnet, im Beispiel (Abbildung 7) 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose (1-Desoxyhexo-2,3-diulose, 1-Desoxyglucoson, 1-DG)<sup>2</sup>.

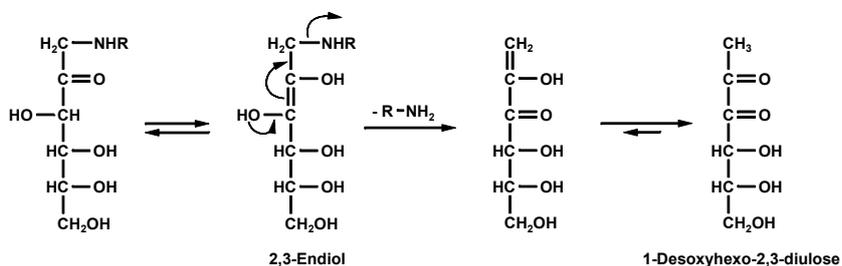
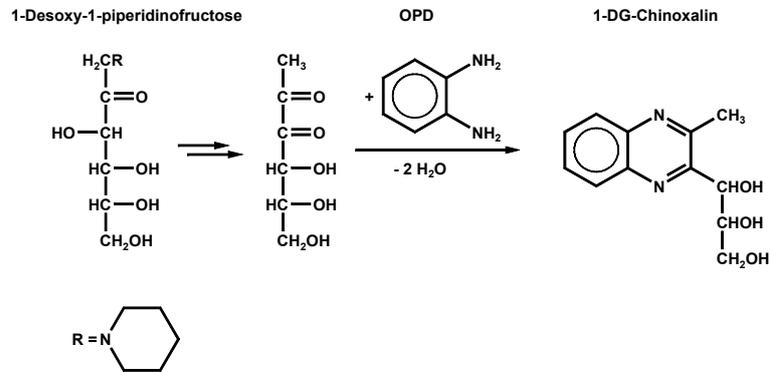


Abb. 7: Bildung von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

Die Beteiligung von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose an der Maillard-Chemie der Hexosen wurde schon früh von Hodge postuliert. Er formulierte darüber die Bildung von Essigsäure (9). Jedoch erfolgte der experimentelle Nachweis von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose erst über 30 Jahre später durch Beck et al. mit Hilfe eines Abfangreagenzes (*o*-Phenylendiamin, OPD) in Form des Chinoxalins als stabilem Derivat. In diesen Versuchen wurde die Amadori-Verbindung 1-Desoxy-1-

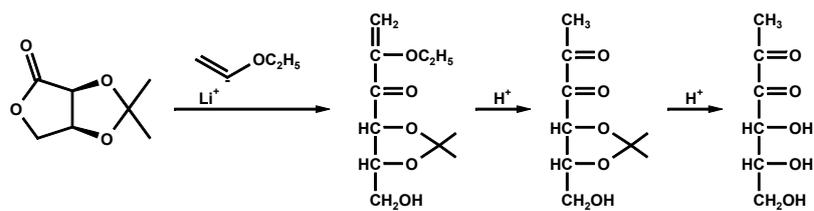
<sup>2</sup> Im folgenden Text wird anstelle der ausführlichen Bezeichnung „1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose“, die verkürzte Bezeichnung „1-Desoxyhexo-2,3-diulose“ oder die Abkürzung „1-DG“ verwendet.

piperidinofructose in Gegenwart von OPD erhitzt, wobei gebildete 1-Desoxyhexo-2,3-diulose sofort in großen Ausbeuten zum Chinoxalin weiter reagierte (Abbildung 8).



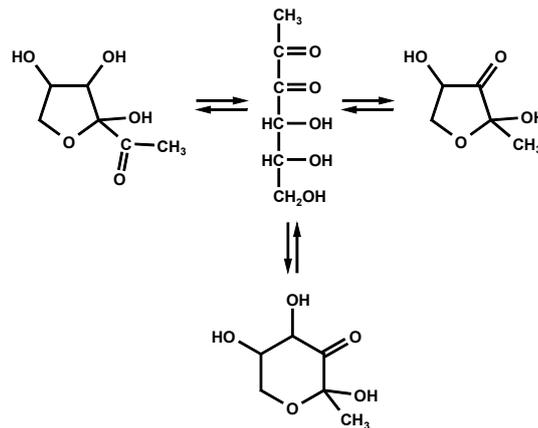
**Abb. 8:** Beck et al. - Nachweis von 1-DG mittels OPD aus einer Amadori-Verbindung (10)

Die unabhängige Synthese von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose war lange Zeit ein Problem, gelang Glomb und Pfahler (11) aber schließlich vor wenigen Jahren. Dabei gingen sie von 2,3-O-Isopropyliden-D-(–)-erythronolacton als chiraalem Grundbaustein aus, durch den die Stereochemie des Produkts festgelegt wurde. Durch Reaktion des Lactons mit Ethoxyvinylolithium wurde der C<sub>6</sub>-Körper aufgebaut, der säurekatalysiert leicht in die ungeschützte 1-Desoxyhexo-2,3-diulose überführt werden konnte (Abbildung 9).



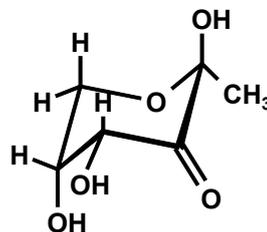
**Abb. 9:** Synthese von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose

Die dargestellte offenkettige Struktur konnte in Lösung nicht nachgewiesen werden. Ursprünglich wurde vermutet, dass ein Gleichgewicht zwischen allen theoretisch möglichen Ringisomeren vorliegt (Abbildung 10).



**Abb. 10:** Ringisomerie von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

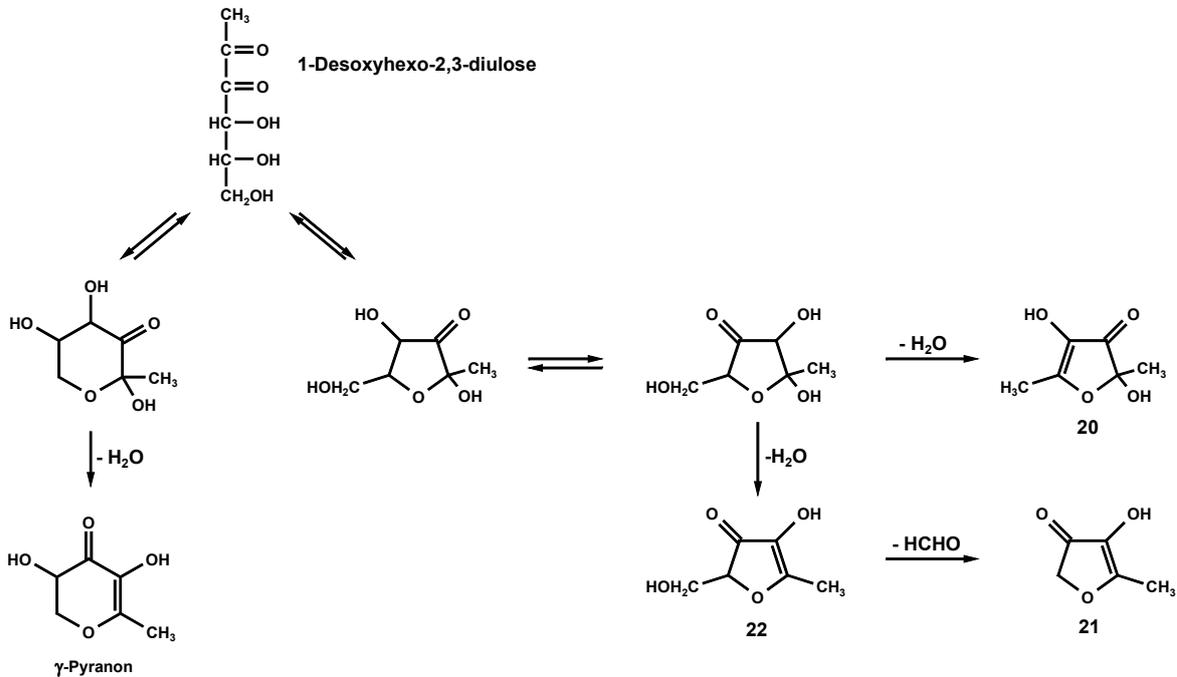
In den Untersuchungen von Glomb und Pfahler (11) an der authentischen Referenzsubstanz konnte mittels NMR-Korrelationsexperimenten jedoch nachgewiesen werden, dass der  ${}^2C^5$ -Sessel der  $\beta$ -Pyrano-Form (Abbildung 11) die bevorzugte Konformation bzw. Konfiguration des Moleküls darstellt, die gegenüber den anderen Isomeren um einen Faktor von etwa zehn überwiegt.



**Abb. 11:**  ${}^2C^5$ -Sessel-Konformation des  $\beta$ -Pyrano-Isomers von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

Glomb und Tschirnich konnten zeigen, dass 1-Desoxyhexo-2,3-diulose im Vergleich zu 3-Desoxyglucoson eine vielfach höhere Reaktivität zeigt (12). So wurden in Inkubationen von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose (300  $\mu$ M) mit oder ohne  $N^\alpha$ -t-BOC-Lysin (1 mM) nach 24 Stunden (bei 37 °C, Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4) keine mit Abfangreagenz (OPD oder Aminoguanidin) umsetzbaren Folgeprodukte mehr nachgewiesen. Dagegen wurde 3-Desoxyglucoson in entsprechenden Inkubationen in Abwesenheit von Amin praktisch nicht abgebaut und selbst in Anwesenheit von Lysin lediglich zu 20 %. Weitere Untersuchungen zeigten, dass 1-Desoxyhexo-2,3-diulose eine Halbwertszeit von ca. 30 Minuten besitzt (bei 37 °C, Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4 ohne Amin).

Zahlreiche postulierte Reaktionswege der Maillard-Reaktion wurden bereits früh über 1-Desoxyhexo-2,3-diulose formuliert, um die Entstehung bekannter Maillard-Produkte zu erklären (Abbildung 12).



**Abb. 12:** Folgeprodukte von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

So entsteht durch Dehydratisierung der pyranoiden Hemiketalform von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose 3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4*H*-pyran-4-on ( $\gamma$ -Pyranon) (13-15). Diese Verbindung ist ein mengenmäßig bedeutendes Maillard-Produkt, das beim Erhitzen von Lebensmitteln in ppm-Mengen gebildet wird. Da Hexosen in nahezu allen Lebensmitteln vorkommen, wird  $\gamma$ -Pyranon als universelle Indikatorsubstanz zum Nachweis der Maillard-Reaktion angesehen (16).

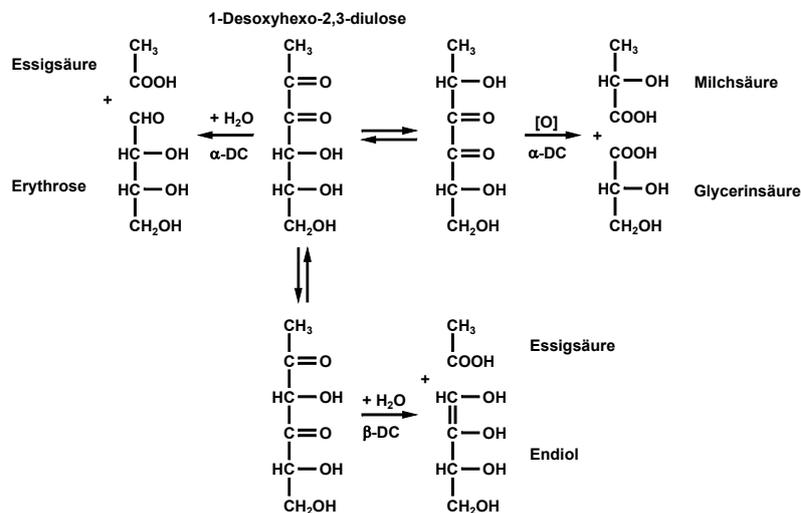
Nach Wasserabspaltung am C-6 der furanoiden Form von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose, lässt sich die Bildung von Acetylformoin **20** formulieren. Acetylformoin ist ebenfalls eine reaktive Verbindung, die zum Beispiel nach Reaktion mit Aminosäuren sogenannte Aminoredukone (Pyrrolinone) liefert (17).

Auch die nach sukzessiver Abspaltung von Wasser und Formaldehyd aus der furanoiden Form von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose zu formulierenden Furanone **21** und **22** wurden bereits in Maillard-Modellsystemen und in Lebensmitteln nachgewiesen (13, 18, 19).

## 2.1.4 Reaktionen der Dicarbonylstruktur

### 2.1.4.1 Dicarbonylspaltungen

In der Literatur finden sich Beschreibungen verschiedener, als Dicarbonylspaltungen bezeichnete Reaktionen (Abbildung 13). So wurde die Bildung von Essigsäure aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose durch eine hydrolytische  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung erklärt (20, 21).



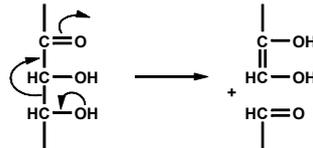
**Abb. 13:** Dicarbonylspaltungen von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose<sup>3</sup>

Davidek et al. hingegen erklärten die Entstehung großer Mengen Essigsäure bei der Umsetzung von 1-DG hingegen über eine hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung der isomeren 2,4-Diulose (22). In ihren Modelluntersuchungen mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen konnten sie hingegen den Ablauf der in der Literatur oft beschriebenen hydrolytischen  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung nicht bestätigen. Stattdessen postulierten sie als weitere Alternative eine oxidative  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung, die zur Bildung zweier Carbonsäuren aus der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen führt (23). Im Falle von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose lässt sich über diesen Mechanismus etwa die Bildung von Glycerinsäure und Milchsäure formulieren.

<sup>3</sup>  $\alpha$ -DC:  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung,  $\beta$ -DC:  $\beta$ -Dicarbonylspaltung

### 2.1.4.2 Retro-Aldol-Fragmentierung

Bei Anwesenheit benachbarter Hydroxylgruppen steht der Dicarbonylgruppe ein weiterer Fragmentierungsweg in Form der Retro-Aldol-Fragmentierung offen (Abbildung 14).

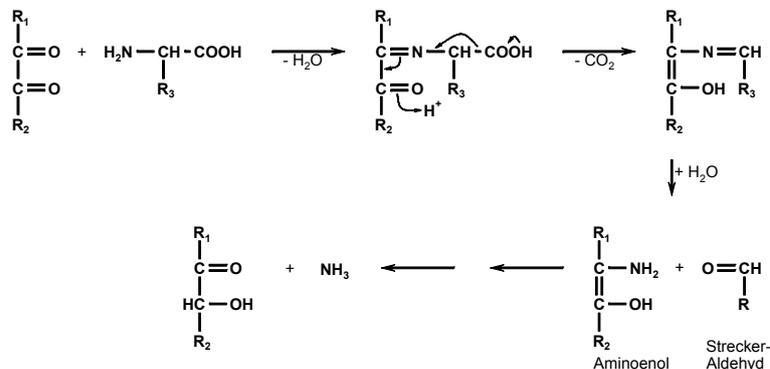


**Abb. 14:** Retro-Aldol-Fragmentierung

Die Retro-Aldol-Fragmentierung ist in der Maillard-Reaktion generell ein wichtiger Reaktionsschritt, der bereits in der frühen Phase zur Bildung hochreaktiver Fragmente der Zucker führt. Diese gehen leicht weitere Folgereaktionen ein und werden im Zusammenhang mit der Bräunung der Maillard-Reaktionsprodukte diskutiert.

### 2.1.4.3 Strecker-Abbau

Die Umsetzung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit Aminosäuren führt in einer als Strecker-Abbau bezeichneten Reaktion zur Bildung des sogenannten Strecker-Aldehyds. Die Dicarbonylverbindung reagiert zum entsprechenden  $\alpha$ -Aminoketon. (Abbildung 15).



**Abb. 15:** Strecker-Abbau

Diese Reaktion hat große Bedeutung in Lebensmitteln.  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen der Maillard-Reaktion reagieren mit freien Aminosäuren, besonders bei erhöhter Temperatur. Die Streckeraldehyde (z.B. Methional, Phenylacetaldehyd, 2- und 3-Methylbutanal, Methylpropanal) besitzen großes Aromapotential. Die Aminoketone können ihrerseits zu flüchtigen Pyrazinen weiterreagieren, die ebenfalls zum Aroma prozessierter Lebensmittel beitragen. Gleichzeitig erklärt die Reaktion auch die Freisetzung von Ammoniak (4).

#### 2.1.4.4 Redox-Reaktionen

Aus der offenkettigen Form von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose lässt sich ein Endiol in  $\alpha$ -Stellung zu der Carbonyl-Funktion formulieren. Damit gehört es, wie auch die Ascorbinsäure (Vitamin C), zu den sogenannten Reduktonen. Solche Verbindungen wirken reduzierend, schwach sauer und, aufgrund der Möglichkeit resonanzstabilisierte Radikale auszubilden, auch antioxidativ (4).

## 2.2 Maillard-Reaktion in vivo

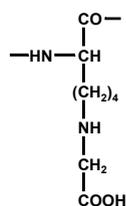
Bereits Louis C. Maillard vermutete, dass die von ihm beschriebene Reaktion in Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen stehen könnte (2). Aber erst etwa 50 Jahre später, im Jahr 1968, wurde mit dem glucosilierten<sup>4</sup> Hämoglobin zum ersten Mal ein unter physiologischen Bedingungen nichtenzymatisch gebildetes Zucker-Addukt nachgewiesen (24-26). Seit dieser Zeit hat die Maillard-Reaktion in der medizinischen Forschung große Beachtung gefunden. Von besonderem Interesse war dabei die nichtenzymatische Bildung stabiler Proteinmodifizierungen (AGE, engl. *advanced glycation end-products*). Als Reaktionspartner in Proteinen gelten vor allem Lysin- und Argininseitenketten. Ein

---

<sup>4</sup> Im medizinischen Sprachgebrauch wird meist von „Fructosylierung“ gesprochen, abgeleitet von der Bezeichnung „Fructosamin“ für die Amadori-Verbindung. Im englischsprachigen Raum findet man allgemein für die nicht-enzymatische Adduktbildung mit einem Zucker meist den Begriff *glycation* (zum Teil auch *nonenzymatic glycosylation*), in Abgrenzung zur enzymatisch gesteuerten Reaktion, die als *glycosylation* bezeichnet wird.

weiterer Angriffspunkt ist das N-terminale Ende, wie beim Hämoglobin. In langlebigen extrazellulären Proteinen akkumulieren solche Strukturen mit zunehmendem Lebensalter (27). Sie werden heute mit Arteriosklerose, den Spätfolgen von Diabetes mellitus (zum Beispiel Katarakt) und anderen altersassoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es existiert bereits eine Anzahl von Strukturen, deren Nachweis in Maillard-Modellsystemen und *in vivo* gelungen ist.

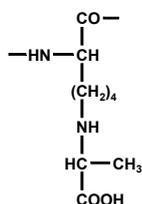
Der quantitativ wichtigste Stellvertreter ist *N*<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML). Diese Verbindung wurde zunächst *in vitro* als Folgeprodukt der glycosylierten Modellverbindung *N*<sup>α</sup>-Formyl-*N*<sup>ε</sup>-(1-desoxy-D-fructos-1yl)lysin, dann aber auch *in vivo* in menschlichem Augenlinsenprotein und im Kollagen nachgewiesen (28).



**Abb. 16:** *N*<sup>ε</sup>-(Carboxymethyl)lysin

CML korrelierte deutlich mit dem Lebensalter. So lag bei Neugeborenen die CML-Konzentration im Linsenprotein unter 0,1 mmol/mol Lysin, bei Linsen von 80 Jahre alten Menschen dagegen bei 7 mmol/mol Lysin (29).

Eine homologe Struktur, deren Entstehung durch Reaktion von Methylglyoxal (2-Oxopropanal) und Lysin zu formulieren ist, ist *N*<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)lysin (CEL).

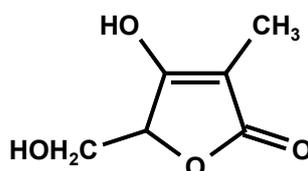


**Abb. 17:** *N*<sup>ε</sup>-(Carboxyethyl)lysin

Die Bildung von CEL wurde ebenfalls in Modellsystemen (Umsetzung von Methylglyoxal mit *N*<sup>α</sup>-Acetyllysin oder RNase) untersucht, die Struktur konnte aber auch in Kollagen und menschlichem Augenlinsenprotein nachgewiesen werden. Wiederum konnte eine deutliche Korrelation zum Lebensalter der Spender

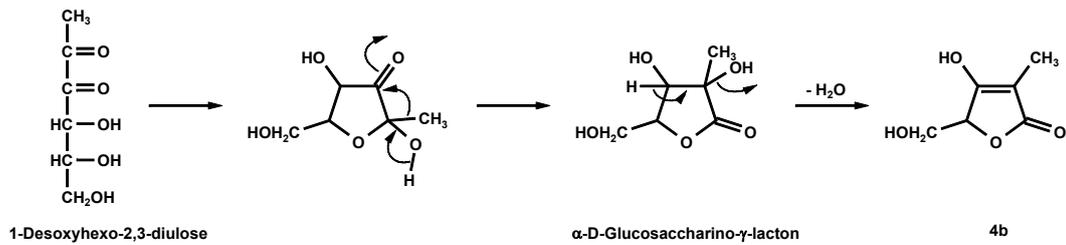
nachgewiesen werden (30). Es existieren verschiedene Möglichkeiten, die Bildung von CEL mechanistisch zu formulieren. Neben Enolisierungs- und Tautomerisierungsreaktionen sind auch Umlagerungen über Hydrid- oder Alkyl-Wanderungen denkbar, Reaktionswege, die üblicherweise nur unter drastischen Reaktionsbedingungen ablaufen. Andererseits ist bekannt, dass beim aminkatalysierten Abbau von Zuckern bereits bei moderaten pH- und Temperaturbedingungen Reaktionen stattfinden, die ansonsten nur im stark sauren oder stark basischen Milieu beobachtet werden. Es stellt sich daher allgemein die Frage, inwieweit unter Maillard-Bedingungen zunächst weniger plausibel erscheinende Reaktionen ablaufen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von stabilisotopen-markiertem Methylglyoxal versucht, den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus der CEL-Bildung aufzuklären.

Die Frage eines möglichen, im Zuge der Maillard-Reaktion auch unter moderaten Reaktionsbedingungen ablaufenden, Methyl-shifts stellte sich in der vorliegenden Arbeit noch an anderer Stelle. So berichtete Pfahler über vorläufige Ergebnisse zum Nachweis von 4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-3-methyl-5(*H*)-furan-2-on **4b** (Abbildung 18) in einem 1-DG/Alanin-Modellsystem (31).



**Abb. 18:** 4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-3-methyl-5(*H*)-furan-2-on **4b**

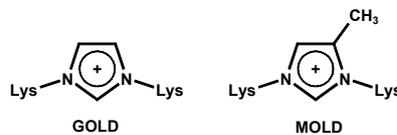
Die Bildung von **4b** sollte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Dazu wurde die Verbindung isoliert und der Strukturaufklärung zugeführt. Für die Bildung von **4b** aus 1-DG kann der in Abbildung 19 dargestellte Reaktionsmechanismus postuliert werden.



**Abb. 19:** Postulierte Bildung von **4b**

Um dies zu prüfen, wurde das intermediär auftretende  $\alpha$ -D-Glucosaccharino- $\gamma$ -lacton unabhängig synthetisiert, in Anwesenheit von Amin inkubiert und der Inkubationsansatz auf die Bildung von **4b** untersucht.

Ebenfalls zu den AGE zählen Strukturen, durch die zwei Proteinseitenketten miteinander verknüpft werden, sogenannte *cross-link*-Strukturen. Ein Beispiel dafür ist das Imidazolium-Salz GOLD (*glyoxal lysine dimer*) (32, 33).



**Abb. 20:** Imidazolium-cross-links GOLD und MOLD

In der entsprechenden Reaktion mit Methylglyoxal entsteht MOLD (*methylglyoxal lysine dimer*) (34).

Unter den AGE sind weiterhin Strukturen nachgewiesen, die Amide von Lysin darstellen. Dies ist zum einen GOLA ( $N^{\epsilon}$ -{2-[(5-amino-5-carboxypentyl)amino]-2-oxoethyl}lysin), zum anderen GALA ( $N^{\epsilon}$ -glycoloyllysin) (35).

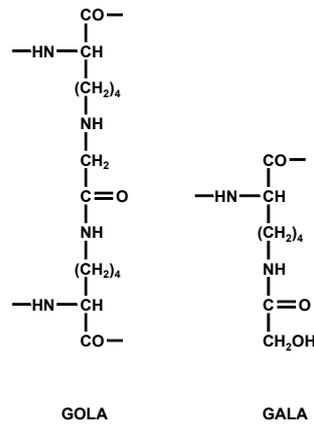


Abb. 21: Amide von Lysin als AGE-Strukturen

### 2.2.1 N<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin als Maillard-Reaktionsprodukt

Weitere Amidstrukturen lassen sich als Modifizierung der Lysinseitenkette formulieren. Greift in dem oben beschriebenen Mechanismus der β-Dicarbonylspaltung anstelle des Hydroxidions die ε-Aminogruppe von Lysin als Nucleophil an, kommt es zur Bildung entsprechender Säureamide. Abbildung 22 zeigt beispielhaft die Bildung von N<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin.

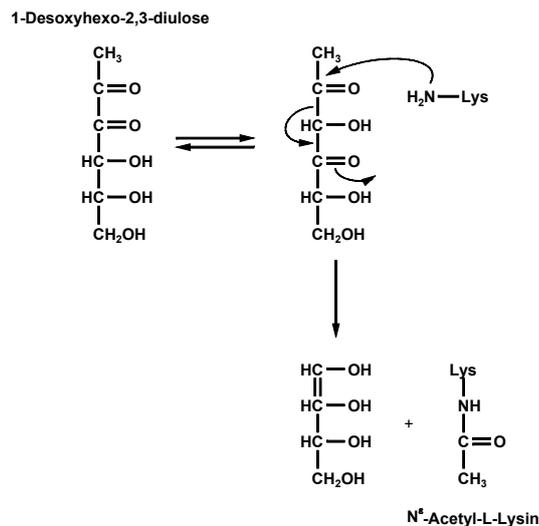


Abb. 22: Bildung von N<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin

Die Acetylierung von Lysin ist bereits als enzymatisch-post-translationale Modifizierung von Proteinen in biologischen Systemen bekannt (36). Solche Modifizierungen erfolgen durch enzymatische Übertragung der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe spezifischer Lysinreste im Protein (37). Ebenfalls beschrieben ist die Acetylierung des N-terminalen Endes von Proteinen (38). Derartige Modifizierungen dienen der funktionellen Aktivierung oder Inaktivierung des Proteins. Weiterhin werden dadurch Protein-Protein oder Protein-DNA-Interaktionen sowie die Proteinstabilität beeinflusst. Gut untersucht ist die Acetylierung von Lysin bei Histonen und anderen DNA-bindenden Proteinen, den sogenannten HMG-Proteinen (39). Die Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin im Zuge der Maillard-Reaktion ist bisher nicht beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Struktur erstmals in einem Maillard-Modellsystem (1-DG/*N*<sup>ε</sup>-t-BOC-Lysin) etabliert werden.

## 2.3 Analytische Arbeitstechniken

Wie oben dargestellt, handelt es sich bei der Maillard-Reaktion um ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Reaktionswege, die oft parallel ablaufen. Ebenso unterschiedlich sind die chemischen Eigenschaften der gebildeten Maillard-Produkte und die sich daraus ergebenden analytischen Anforderungen bei der Untersuchung von Maillard-Systemen.

### 2.3.1 Silylierung für die Gaschromatographie

Um Analyten mit polaren Funktionalitäten wie Carboxyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen der Messung mittels GC zugänglich zu machen, ist es in der Regel nötig, die Verbindungen in unpolare Derivate zu überführen. So werden intermolekulare Wechselwirkungen (vor allem Wasserstoffbrückenbindungen) blockiert und die nötige Flüchtigkeit erreicht. Eine gängige Derivatisierung für die genannten Gruppen stellt die Silylierung dar. Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Silylierungsreagenzien. In der vorliegenden Arbeit wurde *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid mit 5% Trimethylchlorsilan (BSA+TMCS) verwendet. Abbildung 23 zeigt schematisch die zugrundeliegende Derivatisierungsreaktion.

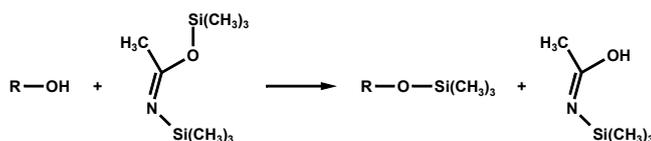


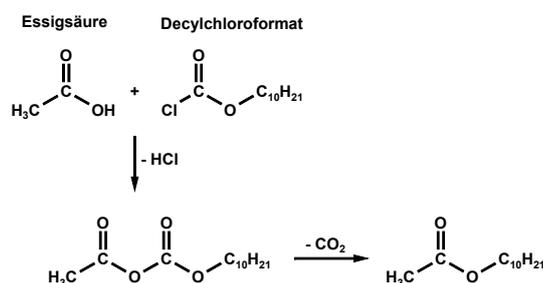
Abb. 23: Silylierung mit BSA

Der zugesetzte Anteil an Trimethylchlorsilan erhöht die Reaktivität des Reagenzes und kann sterisch gehinderte Hydroxylfunktionen silylieren, die von BSA allein nur unvollständig derivatisiert werden. Allgemein sollte das Reagenz in einem 2:1 molaren Überschuss bezogen auf „aktives H“ (also silylierbare Funktionalitäten) zur Probe gegeben werden. Ebenfalls muss zusätzlich durch Optimierung der Reaktionsbedingungen (Zeit, Temperatur, Katalysatoren) die vollständige oder zumindest reproduzierbare Umsetzung zu möglichst einem einzelnen

Derivatisierungsprodukt sichergestellt werden. Dies gilt insbesondere für quantitative Bestimmungen. Bei der Silylierung ist weiterhin zu beachten, dass das Reagenz sehr hydrolyseempfindlich ist. Daher wurde hier wasserfreies Pyridin für die Silylierung verwendet, das gleichzeitig ein nichtprotisches Lösemittel darstellt und als basischer Katalysator der Reaktion fungiert.

### 2.3.2 In-situ-Derivatisierung für Carbonsäuren

Die Bestimmung flüchtiger Carbonsäuren mittels Gaschromatographie war ein zentrales analytisches Problem, das in der vorliegenden Arbeit behandelt wurde. Die Bestimmung auf einer unpolaren Standard-GC-Säule ohne spezielle Techniken wie zum Beispiel SPME (engl. *solid phase micro extraction*) gestaltet sich problematisch, weil die Essigsäure nicht erfolgreich aus der wässrigen Probenmatrix extrahiert werden kann, und zugleich die gängigen Derivatisierungsreagenzien, wie oben beschrieben, hydrolyseempfindlich sind. Eine in der Literatur beschriebene Methode ist die Derivatisierung von Carbonsäuren direkt in der wässrigen Phase (in-situ Derivatisierung) unter Verwendung von Alkylchloroformaten. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für die Analytik von Aminosäuren und Hydroxycarbonsäuren eingesetzt (40, 41). Durch das Reagenz werden die entsprechenden Alkylester der Säure gebildet, wie beispielhaft für die Essigsäure und Decylchloroformat dargestellt (Abbildung 24).



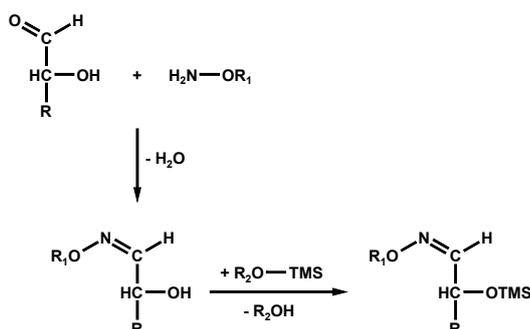
**Abb. 24:** in-situ Derivatisierung von Essigsäure

Die gebildeten Derivate sind hydrophob genug, und können aus der wässrigen Probe extrahiert werden. Die Extrakte werden dann der GC zugeführt. Durch das Reagenz werden auch Hydroxylfunktionen und Aminogruppen erfasst, die in die entsprechenden Alkylcarbonate bzw. -carbamate überführt werden. Die Methode

ist damit auch für die Bestimmung mehrfach funktionalisierter Moleküle wie Hydroxycarbonsäuren und Aminosäuren geeignet.

### 2.3.3 O-Benzylloxim-Trimethylsilylierung

Für die Bestimmung von Hydroxycarbonylverbindungen wie Zuckern mittels GC führt Silylierung allein meist nicht zum Ziel, weil entsprechend der verschiedenen in Lösung vorliegenden Formen mehrere Derivate entstehen oder instabile Enol-trimethylsilylether gebildet werden, die keine reproduzierbare Quantifizierung gestatten. Diese Probleme können vermieden werden, indem die Carbonylaktivität der Verbindungen blockiert wird. Dies kann durch Reaktion mit O-Alkyl- oder O-Arylhydroxylaminen erfolgen, die die Carbonyle zu den entsprechenden Oximen umsetzen (Abbildung 25). Die verbleibenden freien Hydroxylgruppen können anschließend trimethylsilyliert werden.



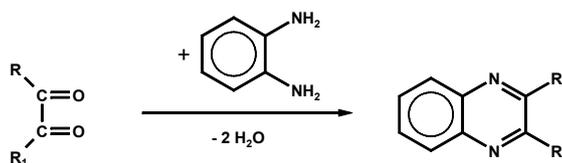
**Abb. 25:** O-Alkyl/-Aryloxim-Trimethylsilylierung von Hydroxycarbonylverbindungen

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Derivatisierung für die quantitative Bestimmung von Acetol (Hydroxypropan-2-on) verwendet. Dabei diente O-Benzylhydroxylamin als Oximierungsreagenz.

### 2.3.4 Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin für $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen

Es herrscht allgemein Übereinstimmung in der Ansicht, dass im Wissen um die Reaktionen von  $\alpha$ -Dicarbonylen der Schlüssel zum Verständnis und zur

Beeinflussung des im Zuge der Maillard-Reaktion gebildeten Produktspektrums liegt. Die Analytik dieser Verbindungen ist daher von entscheidender Bedeutung. Die analytischen Anforderungen an die quantitative Bestimmung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen werden vor allem durch die hohe Reaktivität dieser Strukturen bestimmt. In der gängigen Praxis werden die Dicarbonyle durch Verwendung von Abfangreagenzien in stabile Umsetzungsprodukte überführt. Es existiert eine Vielzahl solcher Reagenzien, wie zum Beispiel Aminoguanidin (Bildung von Triazinen), Cysteamin (Bildung von Thiazolidinen), Hydrazine (Bildung von Osazonen) oder *O*-Alkyl- bzw. *O*-Arylhydroxylamine (Bildung von Oximen). Als besonders brauchbar hat sich die Verwendung von *o*-Phenylendiamin (OPD) erwiesen (42). Durch die Reaktion mit OPD werden  $\alpha$ -Dicarbonyle in stabile Chinoxaline überführt (Abbildung 26).



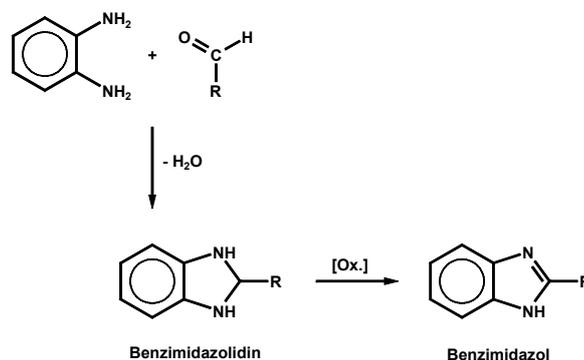
**Abb. 26:** Bildung von Chinoxalin durch Reaktion von Dicarbonyl und OPD

Die Umsetzung mit OPD verläuft im Vergleich zum Beispiel zu der mit Aminoguanidin wesentlich schneller, sodass auch sehr reaktive  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bestimmt werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass die gebildeten Chinoxaline stabile Strukturen darstellen, während zum Beispiel Triazinderivate über die Zeit wieder abgebaut werden. Ein Nachteil von OPD ist, dass ein weiteres Amin in das Inkubationssystem eingebracht wird. Außerdem kann die elektronenreiche, aromatische Struktur durch Sauerstoff zum entsprechenden Chinonimin oxidiert werden, das dann zu Reaktionen mit im System vorhandenen, reduzierend wirkenden Verbindungen führt (43). Neben der Wahl des richtigen Abfangreagenzes und der zugegebenen Menge ist auch die Durchführung der Abfangreaktion von Bedeutung für das Ergebnis. Grundsätzlich werden zwei verschiedene Möglichkeiten unterschieden. Entweder ist das Abfangreagenz von Beginn an in der Probe vorhanden (kontinuierliche Derivatisierung) oder wird an ausgewählten Zeitpunkten entnommenen Proben zugesetzt und anschließend unter definierten Bedingungen nachinkubiert (post-

Derivatisierung). Bei der kontinuierlichen Derivatisierung können sich Störungen auf das Inkubationssystem durch das Reagenz (Reaktionen der Aminofunktion, Redoxaktivität) am stärksten auswirken. Außerdem werden die gebildeten Dicarbonyl der Reaktion entzogen, sodass Reaktionen in der späten Phase der Maillard-Reaktion (Bildung von Melanoidinen) nicht mehr studiert werden können. Gut geeignet ist die kontinuierliche Derivatisierung hingegen zur Gewinnung authentischer Chinoxaline, die nach Isolierung und Aufreinigung in anderen Studien als Referenzsubstanzen verwendet werden können. Bei post-Derivatisierung kann zwar nicht mehr die Gesamtmenge an gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen erfasst werden, aber diese Durchführung erlaubt die Bestimmung der zum Zeitpunkt der Reagenzzugabe vorhandenen Konzentrationen. Die Änderung der Dicarbonylkonzentration kann über die Zeit verfolgt werden. Zusätzlich werden durch sorgfältige Wahl der Nachinkubationsbedingungen störende Reaktionen von OPD minimiert.

### 2.3.5 Abfangreaktion mit *o*-Phenylendiamin für Aldehyde

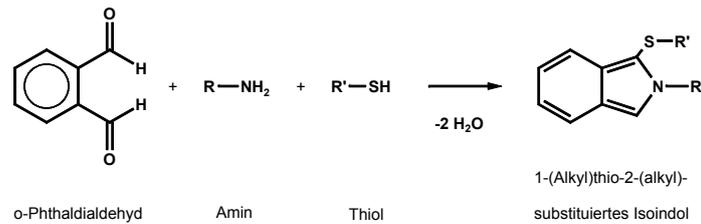
Der Nachweis von Aldehyden in Maillard-Modellsystemen gelingt ebenfalls unter Verwendung von OPD als Abfangreagenz. Primäre Reaktionsprodukte sind vermutlich Benzimidazolidine, die leicht zu den entsprechenden Benzimidazolen reagieren (Abbildung 27) (44).



**Abb. 27:** Bildung von Benzimidazol durch Reaktion von OPD und Aldehyd

### 2.3.6 post-column-Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd

Zur Detektion von Verbindungen mit primärer Aminofunktion an der HPLC eignet sich die Nachsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA). Das Reagenz setzt die Amine in Gegenwart eines Thiols, wie z.B. 2-Mercaptoethanol, zu einem fluoreszierenden Isoindol um (Abbildung 28).



**Abb. 28:** Derivatisierung von Aminen mit OPA

Dies erlaubt die empfindliche Detektion im pmol-Bereich.

### 3. Problemstellung und Zielsetzung

Trotz der zentralen Bedeutung von 1-Desoxy-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose für die Chemie der Hexosen in der Maillard-Reaktion existieren bisher nur sehr wenige Studien, die die Reaktionen und Folgeprodukte dieses hochreaktiven Intermediats ausgehend von der nativen, freien Struktur untersucht haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Wissen über Reaktivität, Reaktionswege und gebildete Folgeprodukte von 1-Desoxy-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose zu erweitern. Dazu wurde die Substanz unter definierten Bedingungen (Temperatur, pH, Ionenstärke) in einem wässrigen Maillard-Modellsystem umgesetzt. Die gebildeten Folgeprodukte wurden mit den gängigen Methoden der modernen instrumentellen Analytik (GC-MS, HPLC-UV, HPLC-MS/MS) qualitativ und quantitativ erfasst. Die entsprechenden Prozeduren wurden soweit nötig entwickelt oder modifiziert.

Aus den so gewonnenen Daten konnte auf die dem Spektrum an Folgeprodukten zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen geschlossen werden. Neben bereits bekannten Produkten aus Fragmentierungsreaktionen wurden Strukturen etabliert, die unter Einbeziehung der Aminkomponente gebildet werden und damit neue Einblicke in die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und *in vivo* eröffnen.

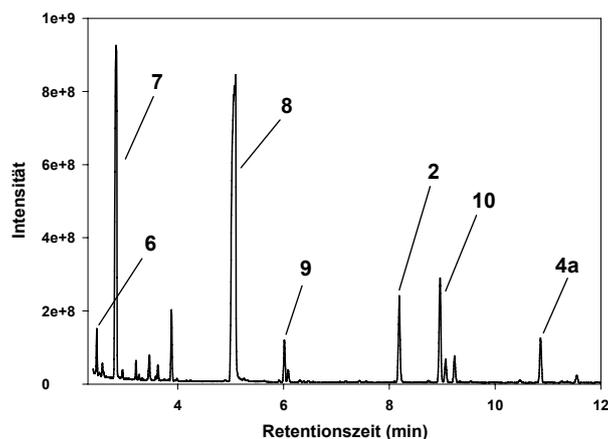
Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Frage nach dem exakten Mechanismus der zwischen Dicarbonyl und Aminofunktion ablaufenden Additionsreaktion. Dies wurde am Beispiel der Bildung von Carboxyethyllysin untersucht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Abbau von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose

#### 4.1.1 Bildung von Carbonsäuren

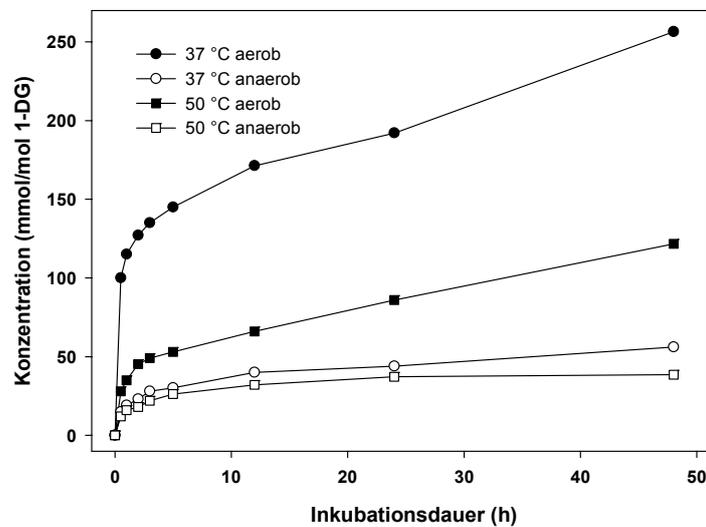
Der Abbau von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose in Gegenwart von L-Alanin führte zur Bildung zahlreicher Folgeprodukte. Ein Teil dieser Produkte konnte nach Silylierung mittels GC-MS nachgewiesen werden. Abbildung 29 zeigt beispielhaft das Totalionenchromatogramm einer derivatisierten Probe (nach 24 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen).



**Abb. 29:** Totalionenchromatogramm einer 1-DG/L-Alanin Inkubation (42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4; nach 24 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen)

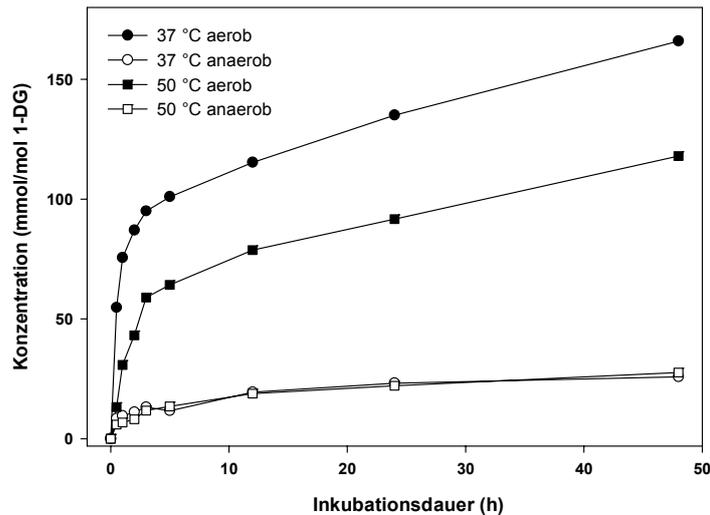
Die im Chromatogramm gekennzeichneten Peaks konnten den Trimethylsilylderivaten von Milchsäure **6**, L-Alanin **7**, Phosphorsäure **8**, Glycerinsäure **9**,  $\gamma$ -Pyranon **2**, Erythrose **10** und 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-furan-3(2H)-on (Furan-3-on) **4a** zugeordnet werden. Wie zu erwarten war, ergaben L-Alanin und Phosphorsäure die intensivsten Signale. Abbildung 30 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von Glycerinsäure unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Die Bildung verlief zunächst relativ schnell. Nach den

ersten drei Stunden war ein großer Teil der insgesamt gebildeten Menge bereits vorhanden.



**Abb. 30:** Bildung von Glycerinsäure (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

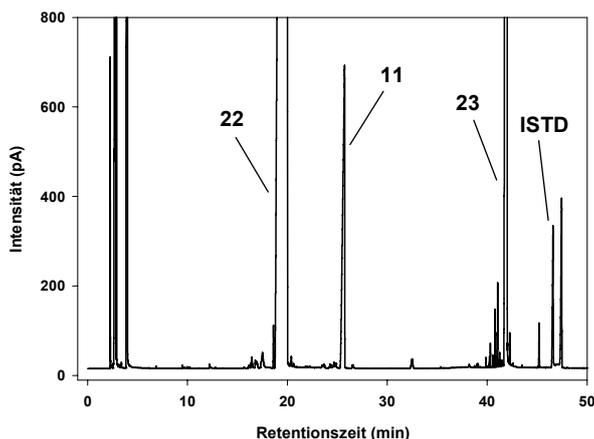
Danach war die Bildung von Glycerinsäure langsamer, verlief aber immer noch linear über den gesamten Zeitraum. Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Bildung von der Anwesenheit von Sauerstoff. So wurden z.B. bei 37 °C unter aeroben Bedingungen nach 12 Stunden 171 mmol Glycerinsäure pro mol 1-DG gebildet, während in gleicher Zeit unter anaeroben Bedingungen lediglich 40 mmol/mol 1-DG nachgewiesen wurden. Die unter aeroben Bedingungen bei 37 °C gebildete Glycerinsäure stieg im weiteren Verlauf auf einen maximalen Wert von 256 mmol/mol 1-DG an. Am Ende der anaeroben Inkubation wurde deutlich weniger Glycerinsäure gefunden (56 mmol/mol 1-DG), und auch für die bei 50 °C durchgeführten Inkubationen wurden nach 48 Stunden geringere Konzentrationen festgestellt (121 mmol/mol 1-DG unter aeroben, 39 mmol/mol 1-DG unter anaeroben Bedingungen). Es zeigte sich für die Bildung der Glycerinsäure neben dem deutlichen Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff auch ein gewisser Einfluss der Inkubationstemperatur, wobei bei 37 °C unter aeroben Bedingungen die Bildung absolut am höchsten war. Ein weiteres nach Silylierung nachgewiesenes Abbauprodukt von 1-DG war Milchsäure. Abbildung 31 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von Milchsäure in einer 1-DG/L-Alanin Inkubation über eine Dauer von 48 Stunden bei 37 °C oder 50 °C unter aeroben und anaeroben Bedingungen.



**Abb. 31:** Bildung von Milchsäure (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Auch die Bildung von Milchsäure war unter aeroben Bedingungen signifikant bevorzugt. So wurden beispielsweise nach 48 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bis zu 165 mmol Milchsäure pro mol 1-DG gebildet, während im gleichen Zeitraum unter aeroben Bedingungen weniger als ein Drittel (53 mmol/mol 1-DG) dieser Menge entstand. Die 165 mmol/mol 1-DG war gleichzeitig die absolut höchste Konzentration an Milchsäure, die in den verschiedenen Inkubationen gemessen wurde. Die bei 37 °C durchgeführte Inkubation (aerob) zeigte darüber hinaus besonders deutlich, dass sich auch die Bildung von Milchsäure in der Anfangsphase besonders schnell vollzog. Nach nur zwei Stunden war bereits rund die Hälfte (87 mmol/mol 1-DG) der Menge an Milchsäure gebildet. Im weiteren Verlauf nahm die Milchsäure-Konzentration langsamer, aber stetig zu. Auch die bei 50 °C durchgeführten Inkubationen bestätigten die sauerstoffabhängige Bildung von Milchsäure. Nach 48 Stunden wurden unter aeroben Bedingungen 118 mmol/mol 1-DG gebildet, während mit 53 mmol/mol 1-DG unter anaeroben Bedingungen lediglich eine knapp halb so große Konzentration erreicht wurde.

Die dritte Carbonsäure, die beim Abbau von 1-DG nachgewiesen wurde, war Essigsäure. Abbildung 32 zeigt ein GC-FID-Chromatogramm einer mit Decylchloroformat derivatisierten Essigsäure-Standardlösung.

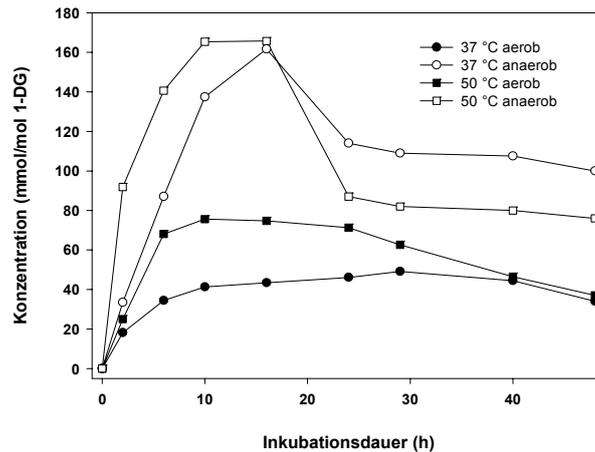


**Abb. 32:** Nachweis von Essigsäure mittels GC-FID (nach Derivatisierung mit Decylchloroformat)

Neben dem Peak des gebildeten Essigsäuredecylesters **11** und dem entsprechenden Derivat der als interner Standard verwendeten Chlorbernsteinsäure (**ISTD**) zeigt das Chromatogramm noch große Peaks von nicht umgesetztem Derivatisierungsmittel **23** und seinem Hydrolyseprodukt Decanol **22**. Essigsäure war quantitativ ein sehr bedeutendes Abbauprodukt von 1-DG, selbst unter den relativ moderaten Bedingungen, die in der vorliegenden Arbeit für die Inkubationen gewählt wurden. Nach 24 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen wurde eine Konzentration von 650 mmol/mol 1-DG (entsprechend 65 mol % bezogen auf 1-DG) gemessen. Die bei derselben Temperatur unter aeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen lieferten etwas geringere Mengen Essigsäure (550 mmol/mol 1-DG nach 24 Stunden).

### 4.1.2 Bildung von Hydroxycarbonyl- und Dicarbonylverbindungen

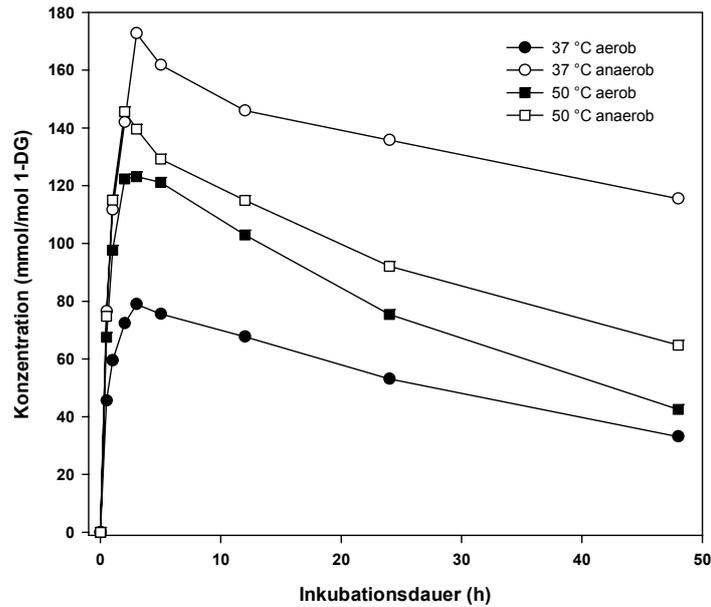
Neben Carbonsäuren wurden beim Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose verschiedene Hydroxycarbonyl- und Dicarbonylverbindungen nachgewiesen. Erythrose wurde nach Silylierung mittels GC-MS bestimmt. Die Bildung dieses C<sub>4</sub>-Zuckers war deutlich bevorzugt unter anaeroben Bedingungen. Eine beinahe viermal so große Konzentration (162 mmol/mol 1-DG vs. 43 mmol/mol 1-DG) wurde nach 16 Stunden bei 37 °C gemessen.



**Abb. 33:** Bildung von Erythrulose (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die bei 50 °C unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen ergaben nach derselben Zeit mit 166 mmol Erythrulose pro mol 1-DG ebenfalls hohe Konzentrationen dieses Folgeprodukts. Diese stellte auch die maximale Konzentration an Erythrulose in den durchgeführten Inkubationen dar. Die Bildung von Erythrulose lief zu Beginn der Inkubationen relativ schnell ab, was vor allem bei den Konzentrations-Zeit-Kurven für die anaeroben Inkubationen deutlich wurde. In den bei 50 °C-Inkubationen war hier bereits nach ca. zwei Stunden die Hälfte der Peakkonzentration erreicht, bei den 37 °C-Inkubationen etwas später nach ca. fünf Stunden. Nach Durchschreiten der maximalen Konzentration nahm die Erythrulosekonzentration in den zu späteren Zeitpunkten genommenen Proben dann wieder ab. In den bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurden am Ende der betrachteten Inkubationsdauer mit 100 mmol/mol 1-DG noch knapp zwei Drittel der Peakkonzentration gemessen. In den entsprechenden 50 °C-Inkubationen wurde nach 48 Stunden mit 76 mmol/mol 1-DG dagegen nur noch knapp die Hälfte der maximalen gemessenen Konzentration gemessen.

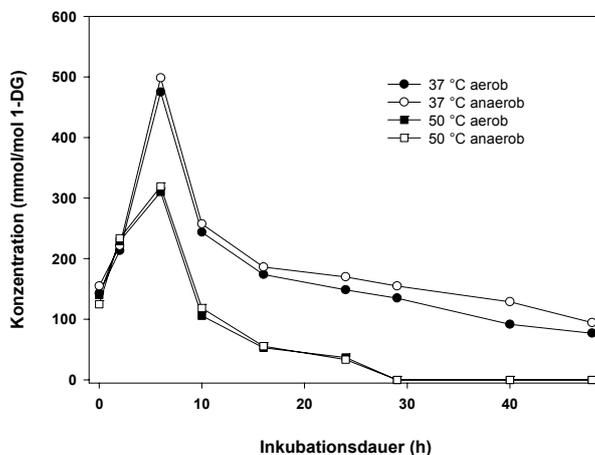
Auch  $\gamma$ -Pyranon wurde bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet (Abbildung 34).



**Abb. 34:** Bildung von  $\gamma$ -Pyranon (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die größten Unterschiede wiesen die bei 37 °C durchgeführten Inkubationen auf. Nach drei Stunden wurde unter anaeroben Bedingungen mit 173 mmol/mol 1-DG eine Konzentration gemessen, die mehr als doppelt so hoch war wie in der entsprechenden aeroben Inkubation (79 mmol/mol 1-DG). Die bei 50 °C durchgeführten Inkubationen zeigten geringere, aber dennoch deutliche Unterschiede in ihren maximalen Konzentrationen. In den unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde nach zwei Stunden eine Peakkonzentration von 146 mmol/mol 1-DG erreicht (aerob 122 mmol/mol 1-DG). Die Bildung von  $\gamma$ -Pyranon verlief unter allen betrachteten Inkubationsbedingungen schnell in der Anfangsphase der Inkubation und erreichte nach zwei bis drei Stunden eine maximale Konzentration. Diese nahm anschließend wieder ab, bevorzugt in den unter aeroben Bedingungen inkubierten Ansätzen. In diesen war nach einer Inkubationsdauer von etwa 30 Stunden nur noch eine etwa halb so große Konzentration an  $\gamma$ -Pyranon vorhanden. In den bei 50 °C unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde dagegen erst am Ende der Inkubationsdauer nach 48 Stunden die Halbierung der Peakkonzentration erreicht. Bei 37 °C (anaerob) blieb die Konzentration an  $\gamma$ -Pyranon sogar über den ganzen folgenden Inkubationsverlauf hinweg über diesem Schwellenwert.

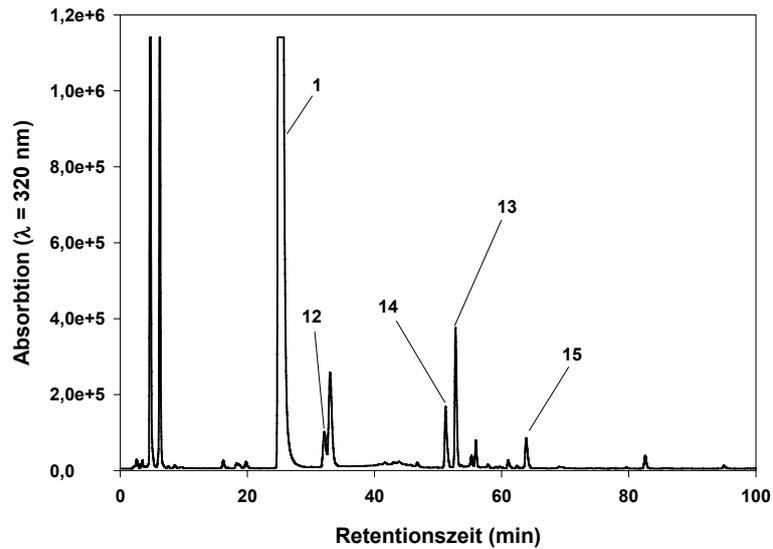
Neben  $\gamma$ -Pyranon wurde mit Furan-3-on noch ein weiteres 1-DG Folgeprodukt mit intaktem Kohlenstoffskelett nachgewiesen. Abbildung 35 zeigt, dass Furan-3-on auch quantitativ von Bedeutung ist.



**Abb. 35:** Bildung von Furan-3-on (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

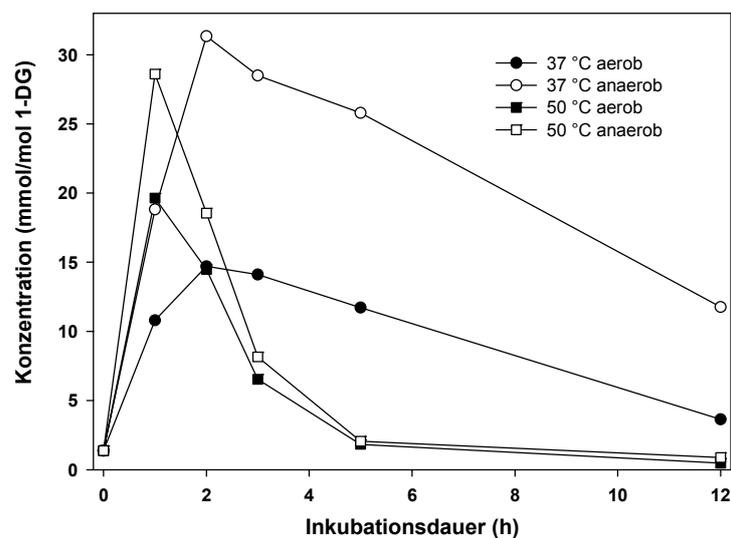
Die Konzentration erreichte nach sechs Stunden einen maximalen Wert von 498 mmol/mol 1-DG (37 °C, anaerob). Nach Erreichen der Peakkonzentration wurde Furan-3-on in relativ kurzer Zeit stark abgereichert. Die Bildung erfolgte unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff. Die Ergebnisse zeigen dagegen einen deutlichen Einfluss der Inkubationstemperatur. Die in den 37 °C-Inkubationen gemessenen Gehalte liegen dabei stets über denen der 50 °C-Ansätze.

Dieses Verhalten einer zunächst bis zu einem Maximum ansteigenden Konzentration gefolgt von einer Abnahme im weiteren Inkubationsverlauf wurde auch für die beim Abbau von 1-DG nachgewiesenen Dicarbonylverbindungen festgestellt. Mittels authentischer Referenzsubstanzen wurden anhand der Retentionszeiten im HPLC-UV-Chromatogramm die Chinoxaline von 1-DG **1**, Threoson (3,4-Dihydroxy-2-oxo-butanal) **12**, 1-Desoxytetro-2,3-diulose (1-DT, 1-Hydroxy-2-oxo-butanal) **13**, 3-Desoxy-2-tetrosulose (3-DT, 4-Hydroxy-2-oxo-butanal) **14** und Methylglyoxal (2-Oxo-propanal) **15** identifiziert (Abbildung 36). Die für diese Verbindungen gemessene Konzentration erreichte in den bei 50 °C durchgeführten Inkubationen ein Maximum nach etwa einer Stunde. Die anfängliche Zunahme der Konzentration bei 37 °C verlief etwas langsamer, hier wurden nach zwei Stunden die höchsten Konzentrationen festgestellt.



**Abb. 36:** HPLC-UV-Chromatogramm einer mit OPD nachinkubierten Inkubationslösung (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die für die betrachteten Dicarbonyle gemessenen Konzentrationen waren generell deutlich geringer als die der nachgewiesenen Säuren oder der von Erythrose. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei für 1-Desoxytetra-2,3-diulose gemessen (Abbildung 37).

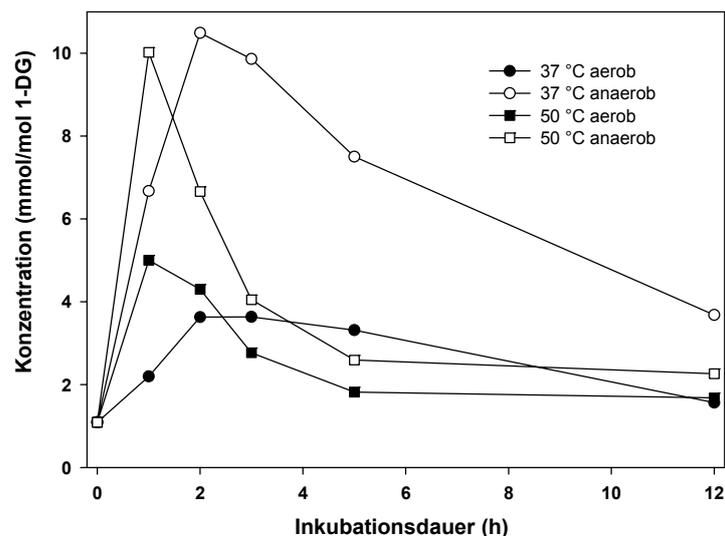


**Abb. 37:** Bildung von 1-DT (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die Bildung von 1-Desoxytetra-2,3-diulose fand bevorzugt unter anaeroben Bedingungen statt. Nach zwei Stunden bei 37 °C wurde eine maximale Konzentration von 31 mmol 1-DT pro mol 1-DG gemessen, während die bei 50 °C

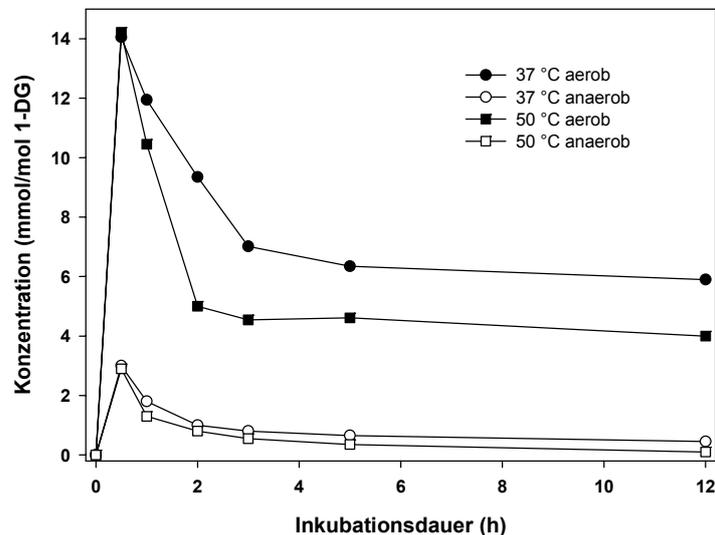
durchgeführten Inkubationen bereits nach einer Stunde eine maximale Konzentration aufwiesen, die im Mittel geringfügig (29 mmol/mol 1-DG) kleiner war. Auch für die unter aeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde ein früheres Erreichen der Peakkonzentration bei 50 °C festgestellt. Die maximalen Konzentrationen an 1-Desoxytetro-2,3-diulose betragen bei diesen Ansätzen 15 mmol/mol 1-DG (37 °C) bzw. 20 mmol/mol 1-DG (50 °C). Nach Durchschreiten des Konzentrationsmaximums wurde 1-DT vor allem bei 50 °C relativ schnell wieder abgebaut. Bereits die nach drei Stunden entnommenen Proben wiesen weniger als die Hälfte der maximal gebildeten Konzentration an 1-Desoxythreoson auf (anaerob: 8 mmol/mol 1-DG, aerob: 7 mmol/mol 1-DG). Nach einer Inkubationsdauer von fünf Stunden lagen schon annähernd die minimalen Konzentrationen vor, die am Ende der Inkubationsdauer von zwölf Stunden gefunden wurden. In den bei 37 °C inkubierten Proben verlief die Abnahme der gebildeten Menge von 1-Desoxythreoson dagegen langsamer. Hier wurde auch in den am Ende der Inkubationen nach zwölf Stunden entnommenen Proben noch etwa die Hälfte der maximalen Konzentrationen (aerob: 4 mmol/mol 1-DG, anaerob: 12 mmol/mol 1-DG) gemessen.

Die Bildung von 3-Desoxy-2-tetrosulose zeigte einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf (Abbildung 38).



**Abb. 38:** Bildung von 3-DT (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Threoson (3,4-Dihydroxy-2-oxobutanal) konnte als weitere Dicarbonylverbindung im betrachteten Modellsystem nachgewiesen werden. Die Bildung verlief stark abhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff (Abbildung 39).



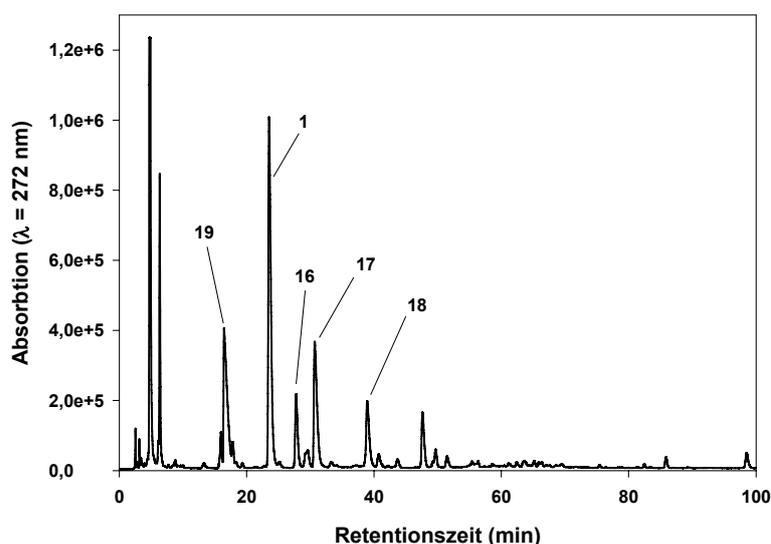
**Abb. 39:** Bildung von Threoson (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Dabei wurde nur in der ersten halben Stunde der Inkubation eine Zunahme der Konzentration beobachtet. Nach 0,5 Stunden war unter aeroben Bedingungen sowohl in den bei 50 °C als auch in den bei 37 °C durchgeführten Inkubationen eine maximale Konzentration erreicht, die etwa viermal so hoch war, wie die unter anaeroben Bedingungen gemessene Höchstmenge (14 mmol/mol 1-DG vs. 3 mmol/mol 1-DG). Im weiteren Verlauf nahm die Konzentration stetig ab, nach weniger als zwei Stunden war in den bei 50 °C durchgeführten Inkubationen nur noch etwa die Hälfte der maximalen Konzentration vorhanden, in den bei 37 °C durchgeführten Inkubationen nach etwa drei Stunden (aerobe Bedingungen).

In ähnlich geringen Konzentrationen wurde auch Hydroxypropan-2-on (Acetol) nachgewiesen. Diese Hydroxycarbonylverbindung wurde in Form des O-Benzylhydroxyloxim-Trimethylsilyl-Derivats mittels GC-MS vermessen. Die gemessenen Acetolgehalte waren etwas erhöht unter anaeroben Bedingungen. Nach zwölf Stunden bei 50 °C betrug die Acetolkonzentration 38 mmol/mol 1-DG (aerob 28mmol/mol 1-DG). Für die 37 °C-Inkubationen wurde ein Gehalt von 18 mmol/mol 1-DG gemessen (vs. 10 mmol/mol 1-DG aerob).

### 4.1.3 Bildung von Aldehyden

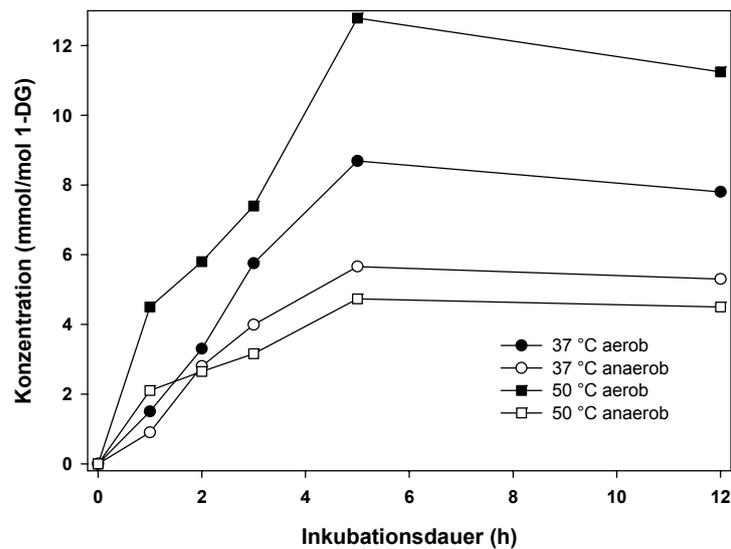
Aldehyde waren eine weitere Klasse von Verbindungen, die beim Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose als Produkte erwartet wurden. Durch post-Derivatisierung mit OPD wurden die Aldehyde zu den korrespondierenden Benzimidazolen umgesetzt und mittels RP-HPLC vermessen. Der Nachweis erfolgte mittels UV-Detektion bei 272 nm. Abbildung 40 zeigt ein Chromatogramm einer Inkubationsprobe.



**Abb. 40:** HPLC-UV-Chromatogramm einer Inkubationsprobe (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4) nach Umsetzung mit OPD

Die erhaltenen Signale konnten durch Vergleich der Retentionszeiten von authentischen Referenzsubstanzen den Benzimidazolen von Glycerinaldehyd **16**, Glykolaldehyd **17** und Acetaldehyd **18** zugeordnet werden. Daneben zeigte das Chromatogramm Signale für OPD **19** sowie das Chinoxalin von 1-DG **1**, da auch die Chinoxaline bei der verwendeten Wellenlänge noch eine gewisse Absorption zeigen (die Signale sind im Vergleich zur Messung bei 320 nm, dem Absorptionsmaximum, etwa halb so groß).

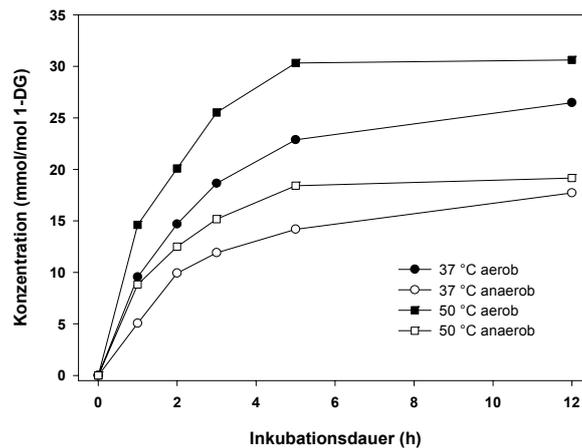
Die Konzentrationen für die Aldehyde waren etwa in der Größenordnung der Chinoxaline, also wiederum deutlich kleiner als die für die nach Silylierung detektierbaren Produkte wie Milchsäure, Glycerinsäure oder Erythrose. In Abbildung 41 ist der zeitliche Verlauf der Bildung von Glycerinaldehyd dargestellt.



**Abb. 41:** Bildung von Glycerinaldehyd (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Wie schon bei den Dicarbonylen beobachtet, wurde auch Glycerinaldehyd in der Anfangsphase der Inkubation relativ schnell gebildet. In den nach fünf Stunden entnommenen Proben wurden jeweils die höchsten Konzentrationen gemessen. Dabei zeigte sich vor allem in den bei 50 °C durchgeführten Inkubationen ein deutlicher Unterschied zwischen den aeroben und anaeroben Ansätzen (13 vs. 5 mmol/mol 1-DG). Dieser Unterschied war auch in den bei 37 °C durchgeführten Inkubationen vorhanden, wenn auch weniger stark ausgeprägt (9 vs. 6 mmol/mol 1-DG). Im Gegensatz zu den betrachteten Dicarbonylverbindungen änderte sich die Konzentration an Glycerinaldehyd im weiteren Inkubationsverlauf nur noch langsam. Unter den verschiedenen Bedingungen wurden nach zwölf Stunden Konzentrationen gemessen, die sich nur gering von den Peakkonzentrationen unterschieden.

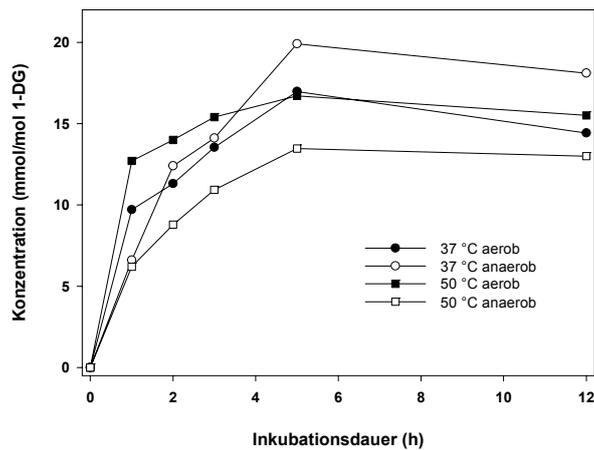
Ein ähnliches Bild konnte für den zeitlichen Verlauf der Bildung von Acetaldehyd beobachtet werden (Abbildung 42).



**Abb. 42:** Bildung von Acetaldehyd (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Hier wurden in den bei 50 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen die höchsten Konzentrationen an Acetaldehyd erhalten. Die dabei maximal erreichte Konzentration von 31 mmol/mol 1-DG (vs. 19 mmol/mol 1-DG anaerob) lag dabei in einem deutlich höheren Konzentrationsbereich als die Peakkonzentration für Glycerinaldehyd. Auch bei 37 °C fiel der Unterschied der Konzentration an Acetaldehyd zwischen den unter aeroben und anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen deutlich aus. Nach zwölf Stunden wurde (aerob) eine Konzentration von 26 mmol/mol 1-DG gemessen (vs. 18 mmol/mol 1-DG anaerob). Eine Abnahme der Konzentration an Acetaldehyd war über die Gesamt-Inkubationsdauer nicht erkennbar.

Ein nicht eindeutiges Bild ergab sich für den zeitlichen Verlauf der Bildung von Glykolaldehyd (Abbildung 43).

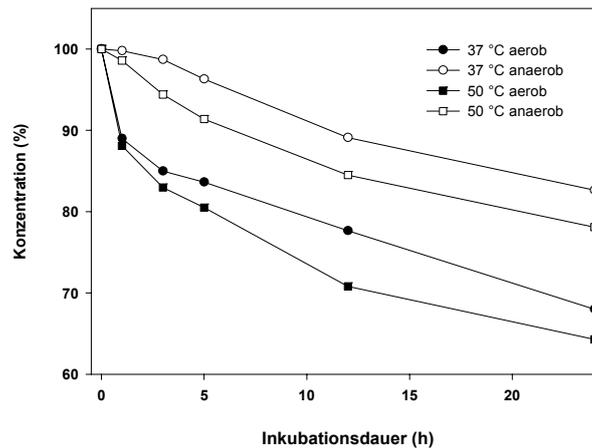


**Abb. 43:** Bildung von Glykolaldehyd (1-DG/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Hier wurden unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen generell sehr ähnliche Konzentrationen gemessen. In den bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde nach fünf Stunden mit 20 mmol/mol 1-DG die absolut höchste Konzentration an Glykolaldehyd bestimmt (17 mmol/mol 1-DG aerob). In den bei 50°C durchgeführten Inkubationen wurde dagegen aerob eine geringfügig höhere Konzentration gemessen (16 vs. 13 mmol/mol 1-DG). Wie zuvor beim Glycerinaldehyd beschrieben, nahm die Konzentration von Glykolaldehyd nach Erreichen des Maximums langsam ab.

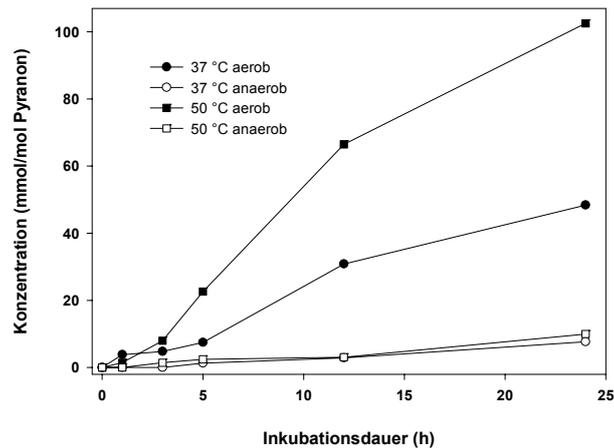
#### **4.2 Abbau von 3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-on**

Der Abbau von  $\gamma$ -Pyranon zeigte sich sowohl von Temperatur als auch von der Anwesenheit von Sauerstoff beeinflusst (Abbildung 44).



**Abb. 44:** Abbau von  $\gamma$ -Pyranon ( $\gamma$ -Pyranon/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

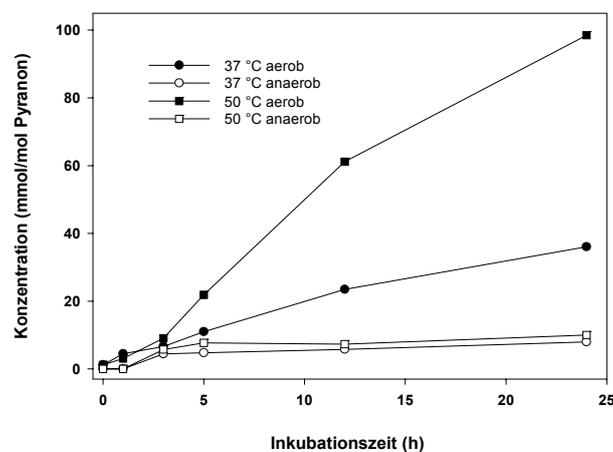
Die Verbindung wurde in den bei 50 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen am stärksten abgereichert. Am Ende der 24stündigen Inkubationsdauer war die Konzentration auf rund zwei Drittel (64 %  $\gamma$ -Pyranon) der Ausgangskonzentration gesunken. In den entsprechenden bei 37 °C durchgeführten Inkubationen betrug die Konzentration noch 68 %  $\gamma$ -Pyranon. Auch in den unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde  $\gamma$ -Pyranon bei 50 °C stärker abgereichert als bei 37 °C (78 vs. 83 %  $\gamma$ -Pyranon). Insgesamt zeigte die Verbindung unter den betrachteten moderaten Versuchsbedingungen eine vergleichsweise niedrige Reaktivität. Die Halbwertszeit von  $\gamma$ -Pyranon liegt unter diesen Bedingungen deutlich über 24 Stunden. Analog dem Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose wurden für  $\gamma$ -Pyranon Glycerinsäure, Milchsäure, Erythulose und Furan-3-on nachgewiesen.



**Abb. 45:** Bildung von Glycerinsäure ( $\gamma$ -Pyranon/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Glycerinsäure wurde bevorzugt unter aeroben Bedingungen gebildet (Abbildung 45). Die deutlichsten Unterschiede wiesen die bei 50 °C durchgeführten Inkubationen auf. Unter aeroben Bedingungen wurde am Ende der Inkubation eine Konzentration von 103 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon gemessen (vs. 10 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon bei 50 °C unter anaeroben Bedingungen). Die bei 37 °C durchgeführten Inkubationen wiesen nach 24 Stunden mit 48 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon eine knapp halb so große Konzentration an Glycerinsäure auf. Anaerobe Bedingungen führten bei dieser Temperatur zu einer Konzentration von 8 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon.

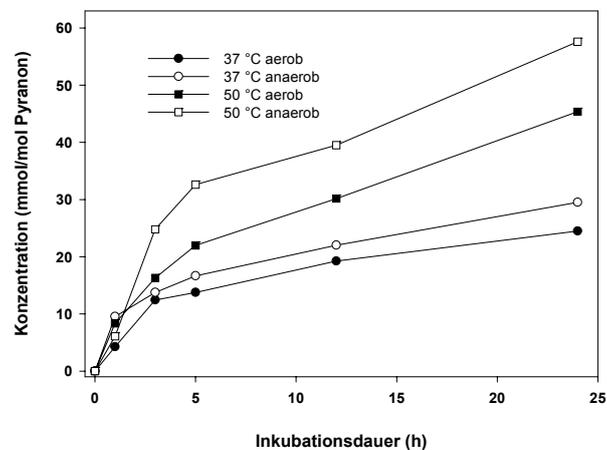
Milchsäure zeigte ein mit der Bildung von Glycerinsäure vergleichbares Bild (Abbildung 46).



**Abb. 46:** Bildung von Milchsäure ( $\gamma$ -Pyranon/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Auch bei der Bildung von Milchsäure zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Anwesenheit von Sauerstoff. In den bei 50 °C unter aeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde in 24 Stunden eine maximale Konzentration an Milchsäure von 99 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon gebildet (vs. 10 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon unter anaeroben Bedingungen). Die Bildung von Milchsäure bei 37 °C führte nach 24 Stunden zu einer Konzentration von lediglich 36 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon (vs. 8 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon unter anaeroben Bedingungen).

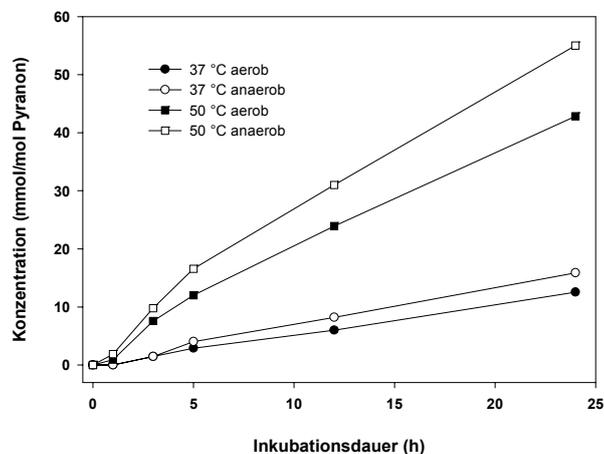
Besonders wichtig war der Nachweis von Furan-3-on als Folgeprodukt von  $\gamma$ -Pyranon (Abbildung 47).



**Abb. 47:** Bildung von Furan-3-on ( $\gamma$ -Pyranon/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Allgemein nahm die Konzentration von Furan-3-on über die gesamte Inkubationsdauer zu. Die Bildung fand sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen statt, wobei in Abwesenheit von Sauerstoff jeweils höhere Konzentrationen gemessen wurden. So wurde in den bei 50 °C durchgeführten Inkubationen nach 24 Stunden eine Konzentration von 58 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon erreicht (aerob: 45 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon). Einen stärkeren Einfluss auf die Bildung von Furan-3-on zeigte dagegen die Inkubationstemperatur. In den bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen durchgeführten Inkubationen wurde nach 24 Stunden eine Konzentration von lediglich 30 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon gemessen (vs. 24 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon unter aeroben Bedingungen).

Ein ähnliches Bild ergab sich schließlich für die Bildung von Erythrose. Die Konzentration von Erythrose stieg über den gesamten Inkubationszeitraum stetig an (Abbildung 48).

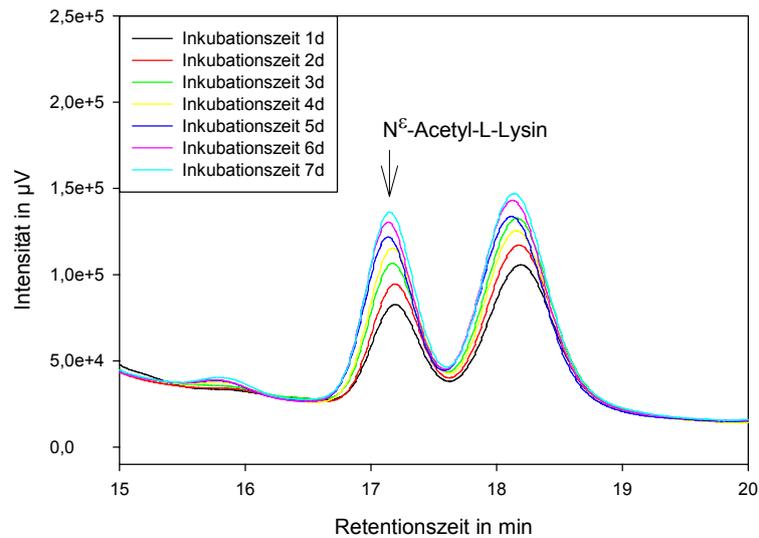


**Abb. 48:** Bildung von Erythrose ( $\gamma$ -Pyranon/L-Alanin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die Bildung war leicht bevorzugt unter anaeroben Bedingungen, wobei stärkere Unterschiede in der Konzentration bei Variation der Reaktionstemperatur beobachtet wurden. So wurde in den für 24 Stunden bei 50 °C belassenen Ansätzen (anaerob) eine Konzentration von 55 mmol Erythrose pro mol  $\gamma$ -Pyranon gemessen (43 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon aerob). Bei den unter 37 °C durchgeführten Inkubationen erreichte die Konzentration (anaerob) lediglich 16 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon (13 mmol/mol  $\gamma$ -Pyranon aerob).

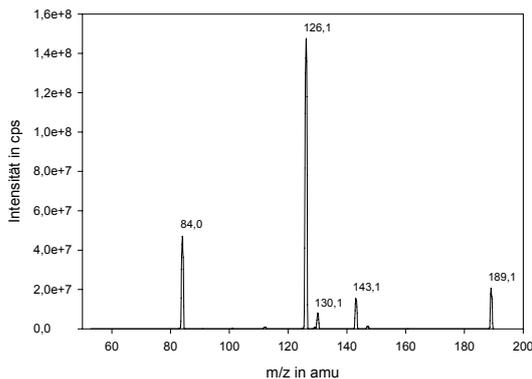
#### 4.3 Bildung von $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

Die aus den 1-DG/ $N^{\alpha}$ -t-BOC-Lysin-Inkubationen (50 °C, aerob) über die Zeit entnommenen Proben zeigten im HPLC-FLD-Chromatogramm einen Peak, der im Vergleich mit der kommerziell erhältlichen Referenzsubstanz als  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin identifiziert wurde. Abbildung 49 zeigt den entsprechenden Retentionszeitbereich und die Zunahme der Peakfläche während der betrachteten Inkubationsdauer.

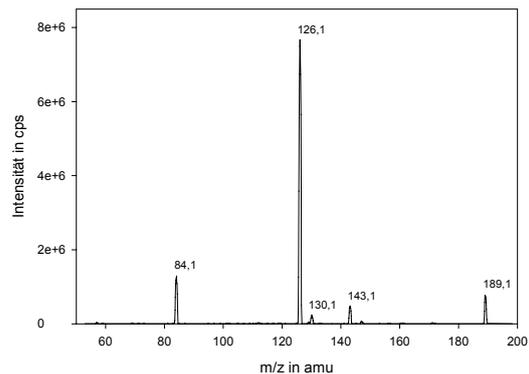


**Abb. 49:** HPLC-FLD-Signal von  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-Lysin (1-DG/ $N^\epsilon$ -t-BOC-Lysin, 50 °C, aerob)

Daneben wurde in allen Proben ein zweiter Peak detektiert, dessen Peakfläche in gleichem Maße zunahm wie der des Essigsäureamids. Der abschließende Nachweis der Bildung von  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-Lysin erfolgte mittels LC-MS/MS. Dazu wurde die Verbindung mittels präparativer HPLC aus dem Inkubationsansatz isoliert und ein  $MS^2$ -Spektrum aufgenommen, das im Vergleich mit dem  $MS^2$ -Spektrum des Standards (Abbildungen 50 und 51) eindeutig die Identität belegte.



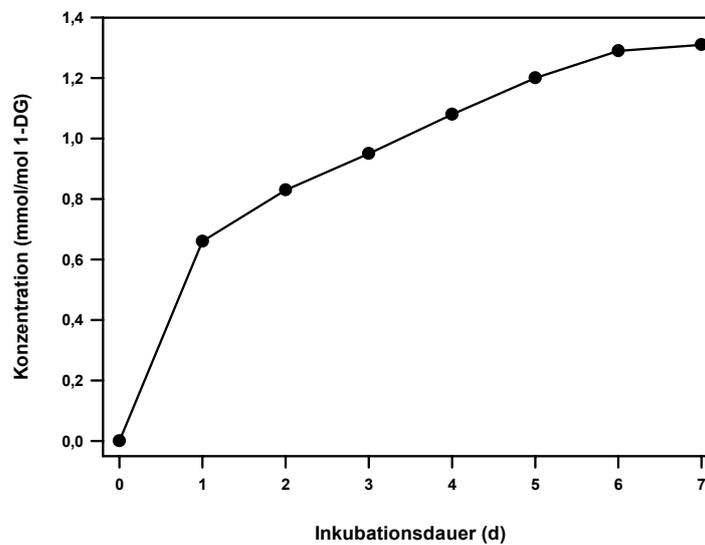
**Abb. 50:**  $MS^2$ -Spektrum von  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-Lysin



**Abb. 51:**  $MS^2$ -Spektrum der isolierten Verbindung

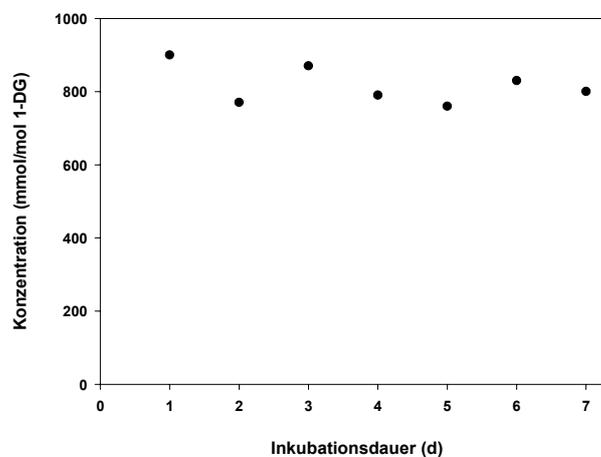
Die Bildung von  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-Lysin verlief in der Anfangsphase der Inkubation vergleichsweise schnell, nach 24 Stunden wurde eine Konzentration von 0,66 mmol Amid pro mol 1-DG gemessen. Anschließend nahm die Konzentration

stetig zu und erreichte nach sieben Tagen einen maximalen Wert von 1,31 mmol/mol 1-DG (Abbildung 52).



**Abb. 52:** Bildung von  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin (1-DG/ $N^{\epsilon}$ -t-BOC-Lysin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

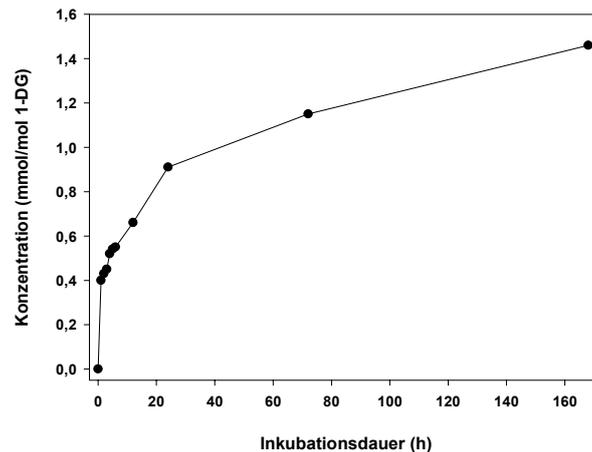
Die Bildung des Säureamids legt einen Mechanismus über die  $\beta$ -Dicarbonylspaltung nahe und sollte damit mit anderen 1-DG-Folgestrukturen (Essigsäure, Erythrose, Glycerinsäure und Milchsäure) korrelieren. Die Konzentration von Essigsäure zeigte bei 50 °C bereits nach den ersten 24 Stunden praktisch keine Änderung mehr (Abbildung 53).



**Abb. 53:** Bildung von Essigsäure (1-DG/ $N^{\epsilon}$ -t-BOC-Lysin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die gemessenen Konzentrationen lagen zwischen 760 und 900 mmol/mol 1-DG und schwankten nur im Rahmen der Präzision der Messmethode.

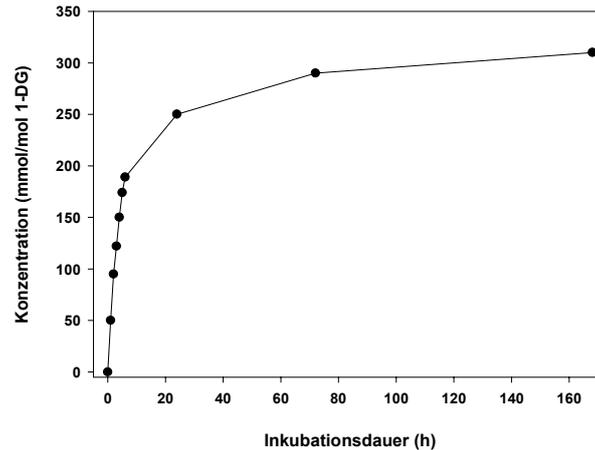
In Konsequenz wurde die Reaktionstemperatur auf 37 °C abgesenkt (Abbildung 54) und der erste Inkubationstag durch zusätzliche Proben zeitlich besser aufgelöst.



**Abb. 54:** Bildung von  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-Lysin (1-DG/ $N^\epsilon$ -t-BOC-Lysin, 42 mM in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

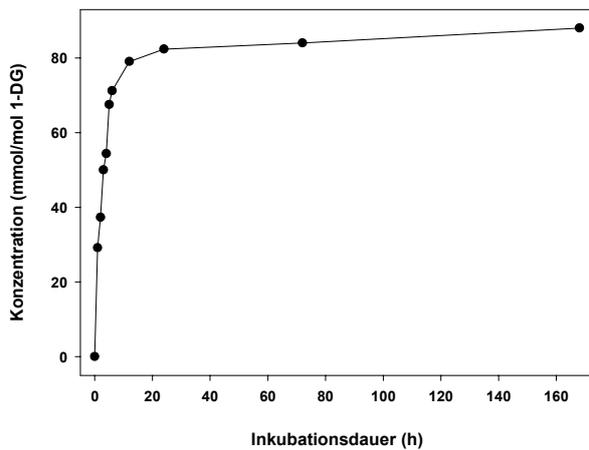
Bei der verminderten Temperatur erfolgte die Bildung von  $N^\epsilon$ -Acetyl-L-Lysin rasch in der Anfangsphase der Inkubation. Nach den ersten zwölf Stunden verlangsamte sich die Bildung, jedoch nahm die Konzentration weiterhin stetig zu. Am Ende der betrachteten Inkubationsdauer (nach 168 h) wurde eine Konzentration von 1,46 mmol/mol 1-DG erreicht.

Auch der größte Teil der Essigsäure wurde in diesen Inkubationen sehr rasch innerhalb der ersten Stunden gebildet (Abbildung 55). Nach sechs Stunden betrug die Konzentration an Essigsäure 189 mmol/mol 1-DG. Diese stieg bis zum Ende des ersten Tages der Inkubation auf 250 mmol/mol 1-DG an. Danach änderte sich die Essigsäurekonzentration nur noch langsam und erreichte bei Inkubationsende nach drei Tagen 310 mmol/mol 1-DG.

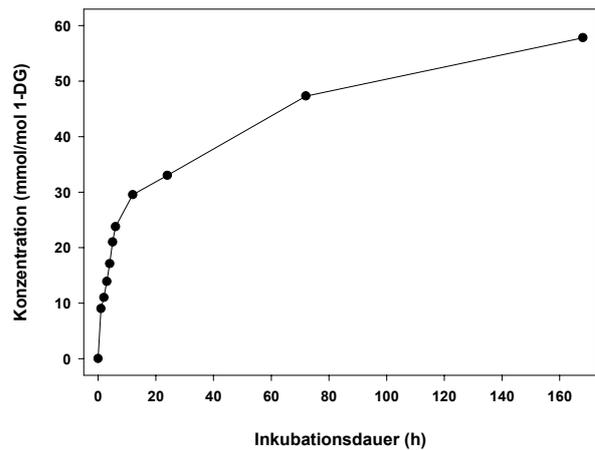


**Abb. 55:** Bildung von Essigsäure (1-DG/ $N^t$ -t-BOC-Lysin, 42 mM  
in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Für die Bildung von Glycerinsäure und Milchsäure im 1-DG/ $N^t$ -t-BOC-Lysin-System ergab sich ein ähnliches Bild wie für Essigsäure, jedoch wurden beide Produkte in wesentlich geringerem Ausmaß gebildet. Glycerinsäure wurde ebenfalls sehr rasch in den ersten Stunden der Inkubation gebildet und erreichte nach zwölf Stunden eine Konzentration von 79 mmol/mol 1-DG. Diese Konzentration änderte sich danach nur noch langsam und betrug nach drei Tagen 88 mmol/mol 1-DG. Die gemessene Konzentration an Milchsäure lag generell unter der von Glycerinsäure. Nach zwölf Stunden war sie weniger als halb so groß (30 mmol/mol 1-DG). Auch die Bildung von Milchsäure verlangsamte sich nach den ersten zwölf Stunden, wenn auch weniger deutlich als im Falle der Glycerinsäure. Am Ende der Inkubation hatte sich die Konzentration mit 58 mmol/mol 1-DG in etwa verdoppelt (Abbildungen 56 und 57).

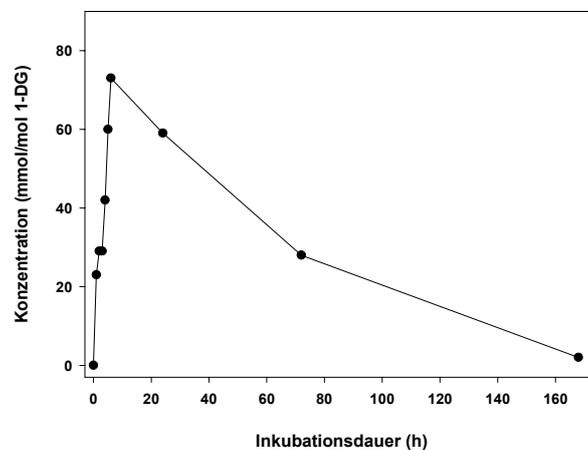


**Abb. 57:** Bildung von Glycerinsäure  
(1-DG/ $N^t$ -t-BOC-Lysin, 42 mM  
in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)



**Abb. 56:** Bildung von Milchsäure  
(1-DG/  $N^t$ -t-BOC-Lysin, 42 mM  
in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die Bildung von Erythrose zeigte ein ähnliches Bild wie im 1-DG/L-Alanin-System beobachtet (Abbildung 58).



**Abb. 58:** Bildung von Erythrose (1-DG/ $N^t$ -t-BOC-Lysin, 42 mM  
in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4)

Die Konzentration stieg innerhalb der ersten sechs Stunden rasch bis zu einer maximalen Konzentration von 73 mmol/mol 1-DG an. Im Gegensatz zu obigen stabilen Folgeprodukten verringerte sich die Konzentration bis zum Ende des dritten Tages der Inkubation jedoch auf weniger als die Hälfte (28 mmol/mol 1-DG) und betrug schließlich nach einer Woche nur noch 2 mmol/mol 1-DG.

## 4.4 Untersuchungen zur Bildung von $N^\epsilon$ -Carboxyethyllysin

### 4.4.1 Darstellung von $N^\epsilon$ -Carboxyethyllysin (Standard)

Aus der unter 7.7.10 beschriebenen Synthese konnte eine Ausbeute von 150 mg Referenzsubstanz gewonnen werden. Dabei ist zu beachten, dass die Verbindung nach der präparativen HPLC als HFBA-Salz vorlag. Die Ausbeute an CEL betrug somit 50,0 mg, dies entspricht einer Ausbeute von rund 11 %. Der synthetisierte Standard wurde über verschiedene Methoden identifiziert und charakterisiert. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Vermessung.

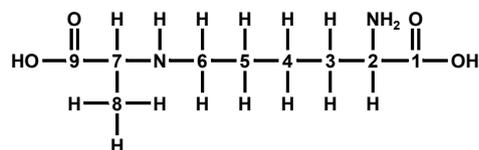


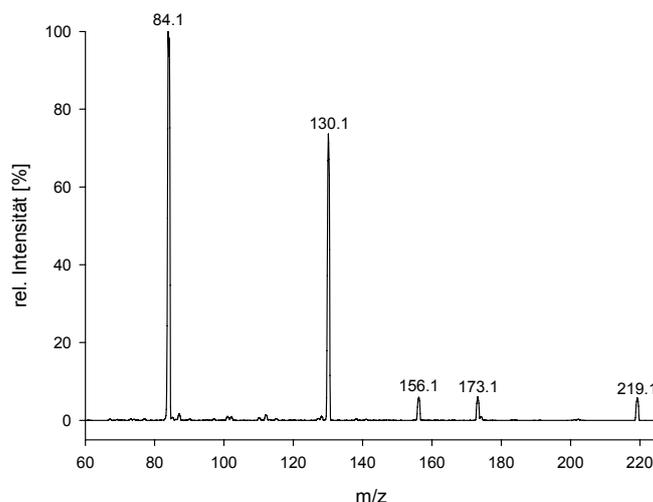
Tabelle 1: NMR-Daten von CEL

NMR-spektroskopische Daten von $N^\epsilon$ -Carboxyethyllysin (in $CD_3OD$ )		
C/H	$\delta$ $^1H$ (ppm)	$\delta$ $^{13}C$ (ppm)
1		172,0
2	3,96 (t, $^3J=6,3$ )	53,7
3		26,8
4	1,74-2,02 (m)	23,2
5		30,9
6	3,06 (t, $^3J=8,0$ )	46,7
7	4,00 (q, $^3J=7,2$ )	56,7
8	1,57 (d, $^3J=7,2$ )	15,2
9		171,7

Die erhaltenen Daten sind in guter Übereinstimmung mit den von Delatour et al. für CML beschriebenen Spektren (45).

Daneben wurde die Authentizität des Standards mittels hochauflösender Massenspektrometrie bestätigt. Das intensivste Signal wurde für  $m/z^5 = 219,13347$ , entsprechend der Summenformel  $C_9H_{19}O_4N_2$  erhalten. Dabei handelt es sich um das  $[M+H]$ -Ion von CEL (theoretische Masse: 219,13393 amu). Daneben wurden weitere intensive Signale für das Natriumaddukt  $C_9H_{18}O_4N_2Na$ ,  $m/z = 241,11562$  (theoretisch: 241,11643 amu) und das Kaliumaddukt  $C_9H_{18}O_4N_2K$ ,  $m/z = 257,08943$  (theoretisch: 257,09037 amu) erhalten.

Der Standard wurde weiterhin auch mittels LC-MS/MS vermessen, um zu klären, ob bei der Fragmentierung des Moleküls geeignete Tochterionen gebildet werden, die zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der CEL-Bildung herangezogen werden können. Dazu sind Fragmente nötig, anhand derer sich eindeutig die Markierung entweder der Carboxylfunktion oder der Ethylgruppe von CEL nachweisen lässt.



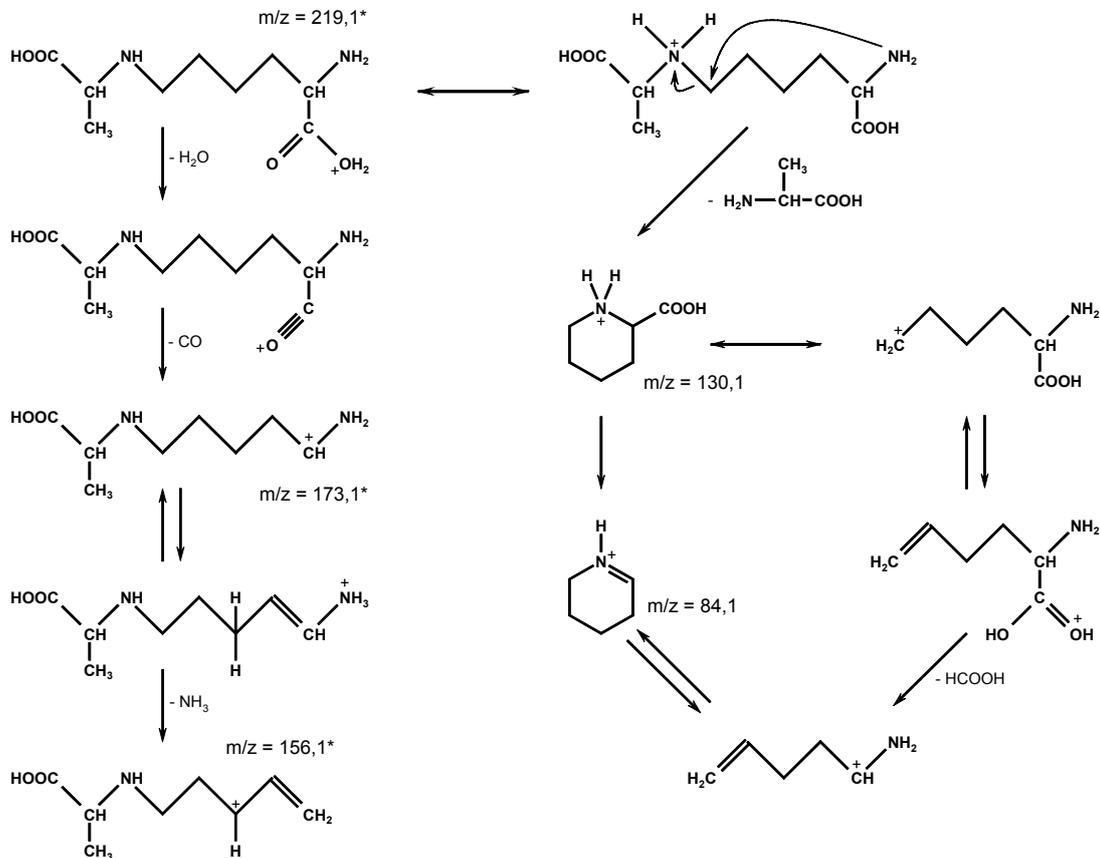
**Abb. 59:** MS<sup>2</sup>-Spektrum von *N*<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin

Das in Abbildung 59 dargestellte MS<sup>2</sup>-Spektrum von CEL weist eine Fragmentierung auf, die durch die in Abbildung 60 vorgeschlagenen Fragmentierungsreaktionen aus dem quasi-Molekülion ( $m/z = 219,1$ ) erklärt werden kann. Das Fragmentierungsverhalten entspricht dem in der Literatur

---

<sup>5</sup> Masse-zu-Ladungsverhältnis

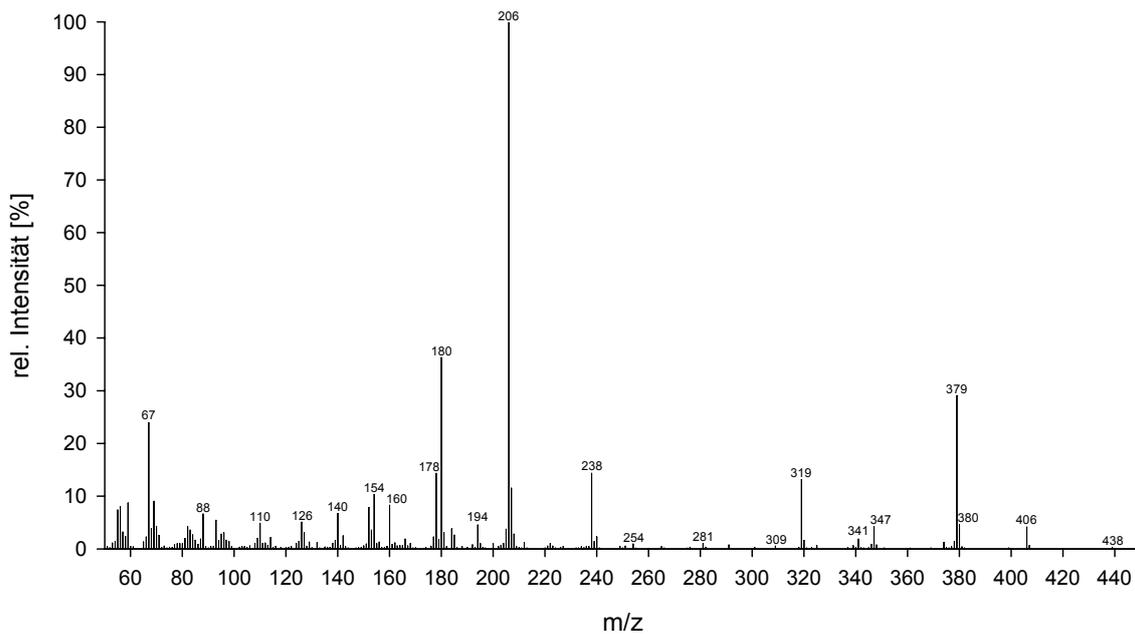
beschriebenen anderer Lysinmodifikationen (CML) bei der Tandem-Massenspektrometrie (45).



**Abb. 60:** MS<sup>2</sup>-Fragmentierung von N<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin

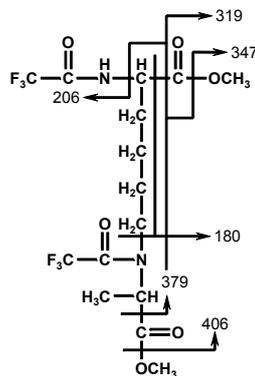
Danach ergeben sich im MS<sup>2</sup>-Spektrum von CEL keine Fragmentationen, die eine eindeutige Differenzierung des Isotopenlabels an der Carboxylfunktion oder an der Ethylgruppe zulassen. Die auftretenden Fragmente enthalten entweder beide Positionen (Fragmente m/z = 173,1 und m/z = 156,1) oder keine von beiden (Fragmenten m/z = 130,1 und m/z = 84,1). Die LC-MS/MS konnte damit nicht für die Klärung des CEL-Bildungsmechanismus herangezogen werden.

Als Methode der Wahl erwies sich die GC-MS und die damit erhaltenen Spektren. Dazu wurde CEL in Form des Trifluoracetylmethylesters der GC-MS zugeführt.



**Abb. 61:** Massenspektrum des derivatisierten CEL-Standards

Das erhaltene Massenspektrum (Abbildung 61) ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ahmed et al. (30). Aus dem Molekölion  $m/z = 438$  geht durch Abspaltung von Methanol das Fragment  $m/z = 406$  hervor. Abspaltung von CO liefert das Fragment  $m/z = 379$ , aus dem durch weitere Abspaltung von Methanol und CO die Fragmente  $m/z = 347$  bzw.  $m/z = 319$  entstehen (Abbildung 62).



**Abb. 62:** Fragmentierungsschema von derivatisiertem  $N^\epsilon$ -Carboxyethyllysin

Durch einen weiteren Fragmentierungsschritt können Fragment  $m/z = 180$  und das Basision  $m/z = 206$  gebildet werden. Damit eignen sich die Fragmente  $m/z = 206$

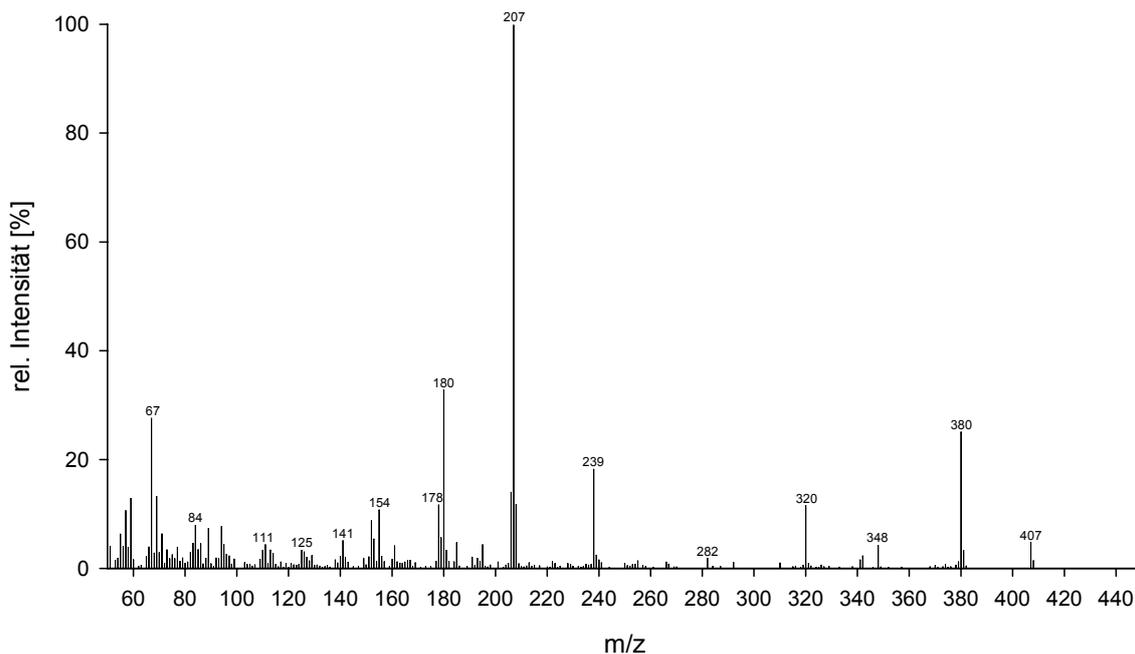
und  $m/z = 319$ , um zwischen dem Einbau des Isotopenlabels an der Carboxyl- oder Ethylgruppe zu differenzieren. In beiden Fragmenten sind jeweils beide Carboxylgruppen abgespalten. Im Falle einer Markierung der Ethylgruppe sollten sich entsprechend Fragmente bei einem  $m/z$ -Verhältnis von 207 bzw. 320 detektieren lassen, während die Markierung der Carboxylgruppe zur den Fragmenten  $m/z = 206$  und  $m/z = 319$  führt.

### 4.4.2 Darstellung von 2-<sup>13</sup>C-Methylglyoxal

2-<sup>13</sup>C-Methylglyoxal wurde durch die Umsetzung von 2-<sup>13</sup>C-Aceton mit SeO<sub>2</sub> bei den unter 7.7.10 beschriebenen Bedingungen erhalten. Zuvor durchgeführte Reaktionsansätze mit unmarkiertem Edukt bei 60 bzw. 85 °C hatten gezeigt, dass dabei jeweils schlechtere Ausbeuten als bei 70 °C erhalten wurden. Bei den unter 60 °C durchgeführten Synthesen war dies vor allem auf die schlechte Destillierbarkeit der Reaktionsgemische zurückzuführen. Die Ursache dafür konnte jedoch nicht geklärt werden. Die schlechteren Ausbeuten der bei 85 °C durchgeführten Synthesen sind möglicherweise auf Verluste an Methylglyoxal durch eine schnellere Reaktion mit Sauerstoff bedingt. Zwar wurde versucht, den Zutritt von Sauerstoff durch Begasen des Reaktionsgefäßes mit Argon zu minimieren, ganz ausschließen ließ er sich jedoch nicht. Insgesamt konnte eine Ausbeute von 9,3 % bezogen auf eingesetztes 2-<sup>13</sup>C-Aceton erhalten werden.

### 4.4.3 Bildung von <sup>13</sup>C-N<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin

Die Umsetzung von 2-<sup>13</sup>C-Methylglyoxal mit N<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin lieferte nach 17 Tagen bei den unter 7.7.11 beschriebenen Bedingungen eine Konzentration an CEL von 20,5 mmol/mol Lysin. Nach Isolierung und Derivatisierung wurde mittels GC-MS das in Abbildung 63 dargestellte Spektrum erhalten.



**Abb. 63:** GC-MS von isotopenmarkiertem CEL (derivatisiert)

Im Vergleich zum Massenspektrum des nicht markierten Standards wurden alle intensiven Signale bis zum Fragment  $m/z = 207$  bei einer um eine Einheit erhöhten nominalen Massenzahl detektiert. Der vordere Bereich des Spektrums ( $m/z \leq 180$ ) ist dagegen vergleichbar mit dem der Referenzsubstanz. Damit handelt es sich bei der isolierten Substanz eindeutig um isotopenmarkiertes CEL.

### **4.5 Untersuchungen zur Bildung von 4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-3-methyl-5(H)-furan-2-on**

#### **4.5.1 Strukturanalyse**

Die Isolierung von **4b** aus den 1-DG/L-Alanin-Inkubationen gestaltete sich schwierig. Die Verbindung war sehr empfindlich und wurde im Verlauf der Aufreinigung schnell abgebaut. Mit der unter 7.7.4 beschriebenen schonenden Vorgehensweise gelang es schließlich, genügend Material für die Strukturanalyse

zu erhalten. Die Ergebnisse der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

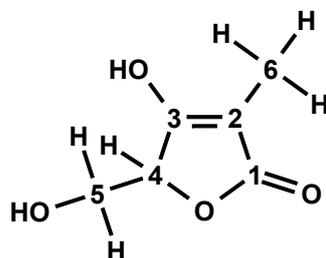


Tabelle 2: NMR-Daten von **4b**

NMR-spektroskopische Daten von <b>4b</b> (in $\text{CD}_3\text{OD}$ )		
C/H	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
1		176,9
2		136,1
3		197,5
4	4,59 (m, 1H)	85,8
5	3,78 (dd, 1H, $^3\text{J}=4,8$ ; $^2\text{J}=12,4$ )	62,1
	3,93 (dd, 1H, $^3\text{J}=3,0$ ; $^2\text{J}=12,5$ )	
6	2,22 (d, 3H, $\text{J}=0,8$ )	13,2

Die Strukturanalyse wurde durch Aufnahme eines HMBC-Spektrums ergänzt. Die entscheidenden C,H-Korrelationen werden im Diskussionsteil dargestellt. Die Verbindung wurde darüber hinaus mittels hochauflösender Massenspektrometrie vermessen. Dabei wurde eine Masse von 144,0411 amu gemessen. Das entspricht der Summenformel  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$  (theoretische Masse: 144,0422 amu).

#### 4.5.2 Inkubation von $\alpha$ -D-Glucosaccharino- $\gamma$ -lacton

Zur Überprüfung des postulierten Bildungsmechanismus von **4b** wurde  $\alpha$ -D-Glucosaccharino- $\gamma$ -lacton unabhängig synthetisiert und in Anwesenheit von L-Alanin unter den in 7.7.6 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Vermessung

## Ergebnisse

---

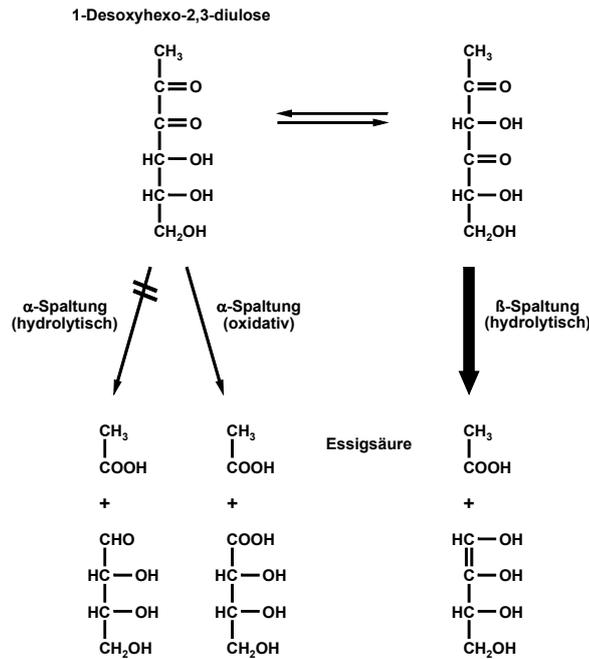
am GC-FID nach Trimethylsilylierung ergab, dass **4b** in keiner der vermessenen Proben nachzuweisen war.

## 5. Diskussion

### 5.1 Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

Die beim Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose in Anwesenheit von Amin gebildeten Produkte können in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen entstanden kurzkettige Carbonsäuren, die stabile Folgeprodukte darstellten und sich über die Zeit anreicherten. Zum anderen wurden Dicarbonyl- und Hydroxycarbonylverbindungen gebildet, die als reaktive Intermediate bis zu bestimmten Maximalkonzentrationen gebildet wurden, aber abgebaut wurden, sobald die Precursorstruktur nicht mehr vorhanden war.

Carbonsäuren wurden bereits früh als Produkte des Zuckerabbaus in Untersuchungen zur Maillard-Reaktion beschrieben. So postulierte schon Hodge die Beteiligung von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose bei der Bildung von Essigsäure. Er vermutete, dass aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose via Retro-Aldol-Reaktion Glycolaldehyd entsteht, der durch eine Saccharinsäure-Umlagerung Essigsäure bildet (9). Brands und van Boekel dagegen erklärten die Bildung von Essigsäure aus Hexosen durch eine hydrolytische  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose (46). Davidek et al. untersuchten kürzlich die Reaktionen von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose unter Kochbedingungen (100 °C), wobei sie die synthetisierte Reinsubstanz verwendeten. Sie zeigten, dass tatsächlich, selbst in Abwesenheit eines Amins, große Mengen Essigsäure (bis zu 85 mol-% bezogen auf 1-Desoxyhexo-2,3-diulose) gebildet werden. Die unter Verwendung von Modellsubstanzen durchgeführten mechanistischen Studien (22) legten jedoch nahe, dass der Hauptweg der Essigsäurebildung die hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung der tautomeren 1-Desoxyhexo-2,4-diulose ist (Abbildung 65). Zusätzlich berichteten sie, dass sie in einem Modellsystem mit Pentan-2,3-dion keinen Hinweis auf die Produkte einer hydrolytischen  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung finden konnten. Dies beweist, dass dieser in der Literatur gut etablierte Weg nicht existent ist.



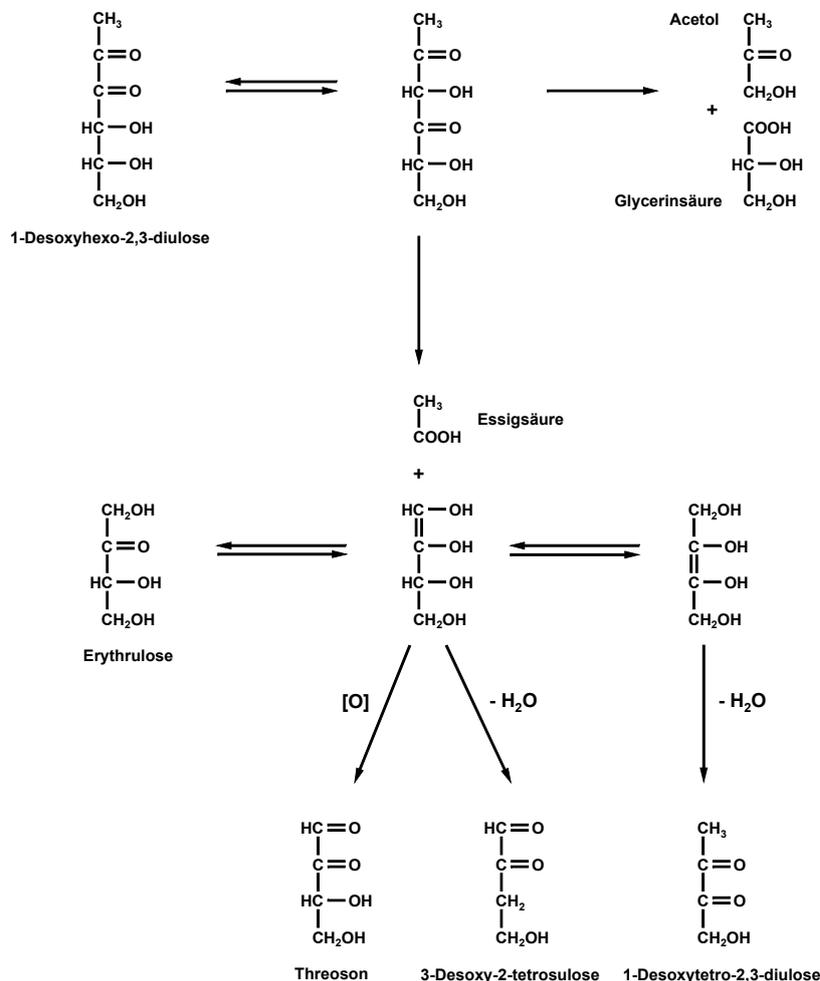
**Abb. 64:** Mechanismus des Abbaus von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dicarbonylspaltung unter Entstehung von Essigsäure

Stattdessen wurde in diesen Experimenten die Bildung nahezu gleicher Mengen an Essigsäure und Propansäure beobachtet. Dies veranlasste Davidek et al. eine zusätzliche, oxidative  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung zu postulieren, die in einer Folgestudie näher untersucht wurde (23). Die gefundenen Mengen der entsprechenden Produkte waren jedoch klein gegenüber denen der hydrolytischen  $\beta$ -Dicarbonylspaltung, sodass dieser Mechanismus nur als von geringer Bedeutung beschrieben wurde.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zum Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose wurde auch unter den verwendeten moderaten Bedingungen die Bildung großer Mengen Essigsäure beobachtet. Dies bestätigt, dass die hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung einen wichtigen Reaktionspfad beim Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose darstellt. Die geringfügig höheren Mengen an Essigsäure, die unter anaeroben Bedingungen erhalten wurden, können durch die erhöhte Stabilität von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose unter diesen Bedingungen erklärt werden. Die Bildung von Essigsäure durch eine zusätzliche oxidative  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung, die unter aeroben Bedingungen höhere Konzentrationen hätte ergeben müssen, konnte dagegen nicht bestätigt werden. Darüber hinaus konnte auch Erythronsäure, die in diesem Mechanismus das entsprechende  $C_4$ -Gegenstück darstellt, in den Inkubationsproben nicht nachgewiesen werden. Die

oxidative  $\alpha$ -Dicarbonylsplaltung ist damit nur von geringer Bedeutung oder findet unter den hier betrachteten Bedingungen gar nicht statt.

Das bei dem Mechanismus der  $\beta$ -Dicarbonylsplaltung intermediär auftretende  $C_4$ -Endiol stellt den Dreh- und Angelpunkt der Bildung einer zweiten Gruppe von Folgeprodukten aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose, den reaktiven Intermediaten, dar (Abbildung 65). Durch Keto-Enol-Tautomerie lässt sich daraus die Bildung von Erythrulose formulieren. Dieser  $C_4$ -Zucker wurde in deutlichen Ausbeuten in den Experimenten zum aminkatalysierten Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose erhalten. Interessanterweise konnten dagegen die beiden alternativen  $C_4$ -Aldosen, Threose und Erythrose, nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 65:** Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose führt zu  $C_2$ -,  $C_3$ - und  $C_4$ -Fragmenten

Die vierfach höhere Menge an Erythrulose, die unter anaeroben Bedingungen erhalten wurde, erklärt sich aus der verminderten Stabilität der direkten und indirekten Vorläuferstruktur, d.h. des  $C_4$ -Endiols und von 1-Desoxyhexo-2,3-

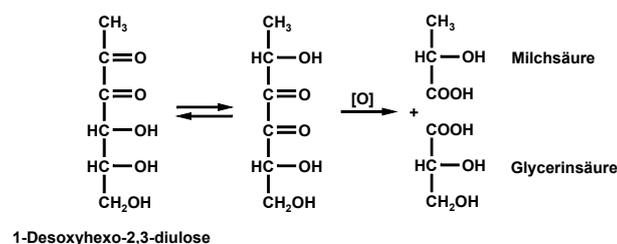
diulose, in Anwesenheit von Sauerstoff. Oxidation des Endiols führt zu Threoson, das als Folgeprodukt von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose bestätigt werden konnte. Dieser Mechanismus erklärt auch die beobachtete bevorzugte Bildung von Threoson unter aeroben Bedingungen. Threoson ist eine Verbindung, die bisher fast ausschließlich in Verbindung mit der nicht enzymatischen Bräunung von Ascorbinsäure diskutiert wurde (47). Usui et al. berichteten kürzlich auch über die Bildung von Threoson beim Abbau von Glucose und Fructose (48). Dabei erklärten sie die Entstehung jedoch ausgehend von Glucoson (D-Arabino-hexos-2-ulose) während 1-Desoxyhexo-2,3-diulose als mögliche Precursorstruktur nicht in Betracht gezogen wurde. Die Oxidation eines Endiols ist ein wohlbekannter Reaktionsschritt, etwa die Oxidation des 1,2-Endiols von Glucose zum Glucoson durch Kupfer(II)-Ionen, die beispielsweise beim qualitativen Nachweis und der quantitativen Bestimmung reduzierender Zucker mit Fehling bzw. Luffischer Lösung ausgenutzt wird (4).

Eine weitere Reaktion, die das Endiol eingehen kann, ist die Dehydratisierung am C-3 durch Eliminierung der zur Endiolgruppe allylständigen Hydroxyfunktion. Dies führt zur Bildung von 3-Desoxy-2-tetrosulose, die in den Inkubationsansätzen nach Umsetzung mit OPD in Form des korrespondierenden Chinoxalins nachgewiesen werden konnte. Aus dem isomeren 2,3-Endiol (Abbildung 65) lässt sich in einer analogen Reaktion (Dehydratisierung am C-1) die Bildung von 1-Desoxytetra-2,3-diulose formulieren, die bei den Experimenten zum Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose ebenfalls als Chinoxalin bestätigt werden konnte. Beide  $\alpha$ -Dicarbonyle wurden auch bereits von Nedvidek in Glucose/Aminosäure-Modellsystemen beschrieben (49). Davidek identifizierte mittels GC-MS ebenfalls das Chinoxalin von 1-Desoxythreoson in Glucose/Glycin-Inkubationsproben und interpretierte diese Beobachtung als weiteren Beleg für den Abbau von Hexosen auf dem Weg der 2,3-Enolisierung via 1-Desoxyhexo-2,3-diulose (22).

Der nucleophile Angriff eines Hydroxid-Ions, der für den Mechanismus der hydrolytischen  $\beta$ -Dicarbonylspaltung angenommen werden muss, kann ebenso an der C-4 Carbonylfunktion des 2,4-Tautomers von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose erfolgen. In diesem Fall führt die Fragmentierung zu zwei  $C_3$ -Körpern (Abbildung 65). Bei der entstehenden Carbonsäure handelt es sich um Glycerinsäure, bei dem Carbonyl-Gegenstück um 1-Hydroxypropan-2-on (Acetol). Die Bildung von Acetol beim Abbau von Hexosen ist bereits vor 50 Jahren untersucht worden.

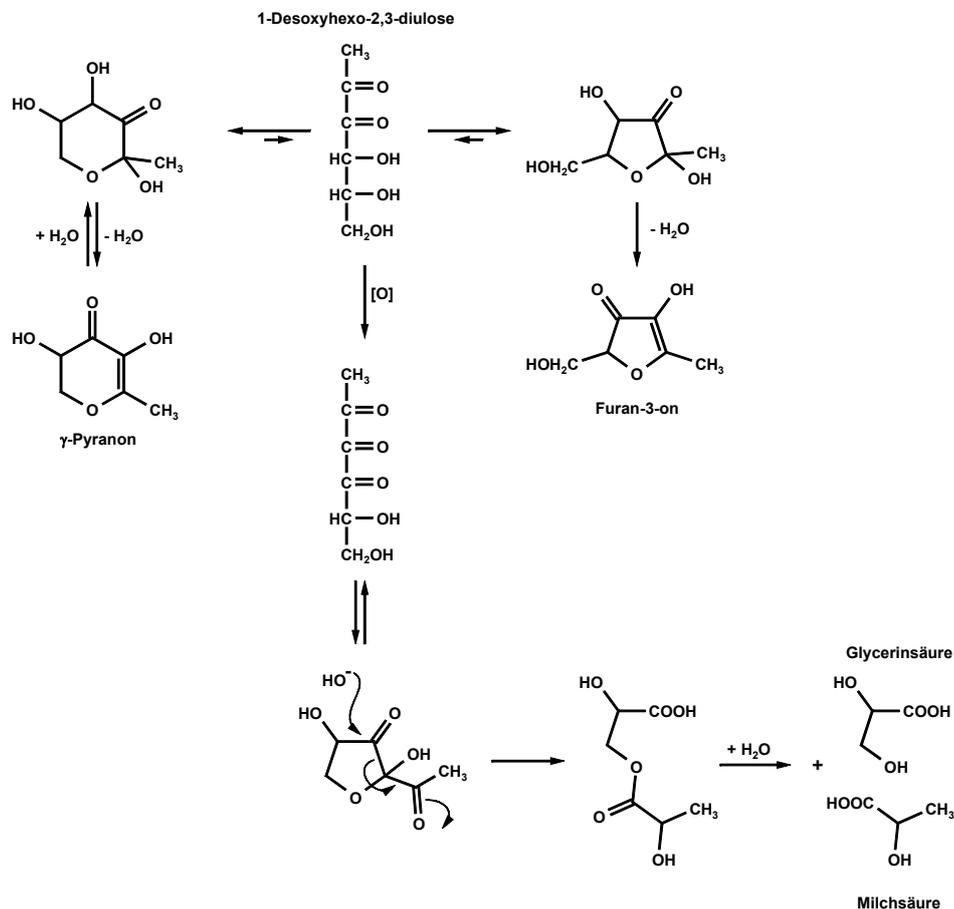
Hayami postulierte damals auch schon  $\beta$ -Dicarbonylspaltung als den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus (50, 51). Weenen beschrieb später die Bildung von Acetol aus Glucose und vermutete die Beteiligung von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose bei der Reaktion (52). Auch Yaylayan wies bei seinen Untersuchungen zur Reaktion von stabilisotopen markierter Glucose und Aminosäuren unter Pyrolysebedingungen Acetol nach. Nach seinen Berechnungen sollten 70% der entstandenen Menge an Acetol über 1-Desoxyhexo-2,3-diulose durch Retro-Aldol-Reaktion der isomeren 1-Desoxyhexo-2,5-diulose entstanden sein. Der Mechanismus der  $\beta$ -Dicarbonylspaltung erscheint jedoch vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit als ein wesentlich plausiblerer Weg. Davidek et al. untersuchten bei ihren Studien ebenfalls die Bildung von Glycerinsäure aus Glucose. Sie konnten zeigen, dass die thermische Behandlung von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Glucose- und  $[3-^{13}\text{C}]$ -Glucose-Isotopomeren ausschließlich unmarkierte Glycerinsäure liefert. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem hier dargestellten Mechanismus der  $\beta$ -Dicarbonylspaltung von 1-Desoxyhexo-2,4-diulose.

Für die Bildung von Glycerinsäure wurde aber darüber hinaus eine deutliche Abhängigkeit von der Anwesenheit von Sauerstoff beobachtet. Dies galt ebenso für die zweite in den Inkubationsansätzen nachgewiesene  $\text{C}_3$ -Carbonsäure, die Milchsäure. Dieses Ergebnis kann nicht auf der Basis einer hydrolytischen Spaltungsreaktion erklärt werden. Es liegt daher nahe, für die Bildung dieser Säuren weitere, oxidativ abhängige Bildungswege anzunehmen. Zwar berichteten Davidek et al. mit der oxidativen  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung (23) über einen solchen Weg, der unter Annahme der Isomerisierung von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose zur 1-Desoxyhexo-3,4-diulose tatsächlich die Bildung der beiden Säuren erlaubt (Abbildung 66).



**Abb. 66:** Bildung von Milchsäure und Glycerinsäure mittels oxidativer  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung

Jedoch beschrieben sie diese Reaktion als einen selbst unter Kochbedingungen nur in geringem Maß ablaufenden Weg. Dies steht im Widerspruch zu den deutlichen Mengen beider Säuren, die in der vorliegenden Arbeit schon unter den hier verwendeten moderaten Reaktionsbedingungen erhalten wurden. Zusätzlich gelang, wie oben beschrieben, in den Inkubationsproben auch kein Nachweis für die Erythronsäure, die bei der Entstehung der Essigsäure auf dem Weg der oxidativen  $\alpha$ -Dicarbonylspaltung das entsprechende C<sub>4</sub>-Gegenstück darstellt. Ein alternativer Bildungsweg wurde schon von Beck und Ledl vorgeschlagen. Sie beschrieben die Bildung beider Säuren in einem Glucose/Glycin-Modellsystem und postulierten die in Abbildung 67 dargestellte Reaktionsfolge (53).



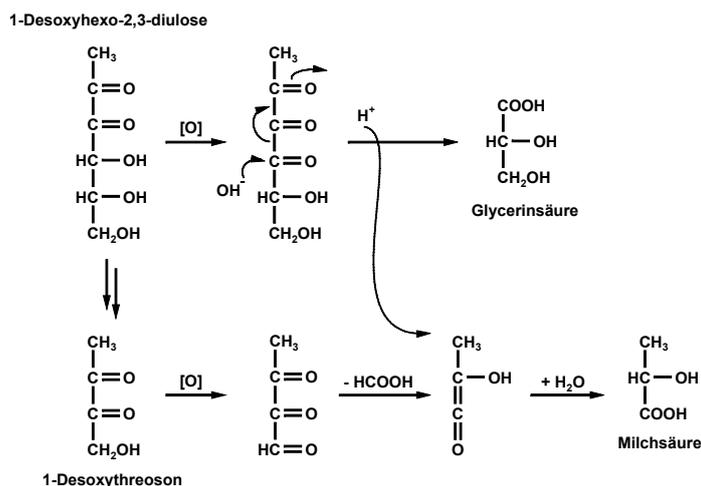
**Abb. 67:** Oxidativ abhängige Bildung von Glycerinsäure und Milchsäure aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose

In diesem Mechanismus wird 1-Desoxyhexo-2,3-diulose oder wahrscheinlicher die korrespondierende  $\alpha$ -Oxo-Endiol-Redukton-Struktur zur Tricarbonylverbindung oxidiert. Ausgehend vom zyklischem Hemiketal kann via hydrolytischer  $\beta$ -

Dicarbonylspaltung die Bildung des Glycerinsäureesters der Milchsäure formuliert werden. Hydrolyse ergibt dann die beiden Säuren. Darüber hinaus schlugen die Autoren vor, dass dieser Weg auch ausgehend vom  $\gamma$ -Pyranon eingegangen werden kann. Der postulierte Ester wurde von Beck und Ledl bei ihren Versuchen zur drastischen Oxidation von  $\gamma$ -Pyranon mit Iod identifiziert. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zum Abbau von  $\gamma$ -Pyranon. Auch hier wurden Milchsäure und Glycerinsäure als Folgeprodukte unter bevorzugt aeroben Bedingungen nachgewiesen.  $\gamma$ -Pyranon steht damit durch Hydratisierung mit 1-Desoxyhexo-2,3-diulose im Gleichgewicht, sodass sich beim Abbau von  $\gamma$ -Pyranon die bereits beim Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose nachgewiesenen Reaktionsprodukte wiederfinden.

Diese Tatsache wird insbesondere unterstützt durch den Nachweis von Furan-3-on **4a** in den Versuchen zum Abbau von  $\gamma$ -Pyranon. Dieser Wechsel von einem pyranoiden zu einem furanoiden Grundkörper kann plausibel nur über Beteiligung der offenkettigen Form von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose erklärt werden. Diese Art reversibler Hydratisierung/Dehydratisierung wurde auch früher schon von Kim und Baltés vorgeschlagen (15). Sie untersuchten die Reaktionen von  $^{13}\text{C}$ -markiertem  $\gamma$ -Pyranon unter drastischen Bedingungen (eine Stunde bei 150 °C in Phosphatpuffer pH 5,8 und Röstmodelle mit Seesand bei Temperaturen bis 220 °C). Dabei nahmen die Autoren die hydrolytische Ringspaltung von  $\gamma$ -Pyranon zu 1-Desoxyhexo-2,3-diulose an, um verschiedene Folgeprodukte zu erklären.

Ein alternativer Bildungsweg stellt die direkte hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung der offenkettigen Form der dargestellten Tricarbonylverbindung dar (Abbildung 68). Ein solcher Mechanismus erfordert jedoch ein intermediär auftretendes Keten.



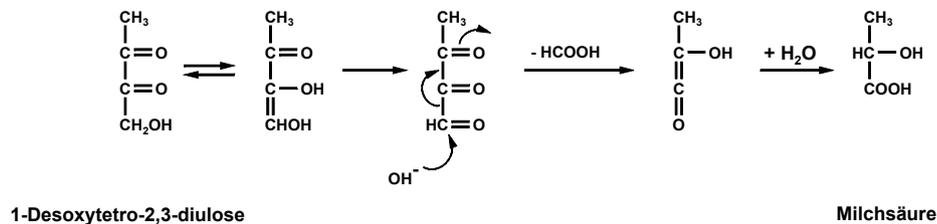
**Abb. 68:** Alternative Reaktionswege für die Bildung von Milchsäure und Glycerinsäure

Hydratisierung solcher Strukturen führt tatsächlich zu Carbonsäuren (54). Es ist jedoch unklar, ob ein so hochreaktives Produkt unter den verwendeten Reaktionsbedingungen entstehen kann. Andererseits wurde eine analoge Reaktion bereits für wässrige Systeme beschrieben. So führt die Tricarboxylstruktur von 2,3-Diketogulonsäure [(4*R*,5*S*)-4,5,6-Trihydroxy-2,3-dioxohexansäure] durch  $\beta$ -Dicarbonylspaltung zu Oxalsäure und L-Threonsäure (55). Dieser Weg ist für Ascorbinsäure allgemein anerkannt.

Beide Mechanismen haben gemeinsam, dass die Milchsäure ausschließlich dem oberen Teil des ursprünglichen Kohlenstoffgerüsts von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose (C-1 bis C-3) entstammt, während die Kohlenstoffatome C-4 bis C-6 den Grundkörper der Glycerinsäure bilden. In zusätzlichen, im Arbeitskreis von Prof. Glomb durchgeführten Untersuchungen zum Abbau verschiedener  $^{13}\text{C}$ -markierter D-Glucose Isotopomere konnte diese klare Zuordnung jedoch nur für die Glycerinsäure bestätigt werden (56). Dies ist in Übereinstimmung mit dem oben beschriebenen hydrolytischen, anaeroben Spaltungsmechanismus, der zur Bildung von Glycerinsäure und Acetol als  $\text{C}_3$ -Gegenstück führt.

Unerwartet ergab sich für die Milchsäure kein so eindeutiges Bild. Die Experimente mit  $^{13}\text{C}$ -Glucose ergaben, dass 52 % der nachgewiesenen Milchsäure aus dem unteren Teil des Kohlenstoffskeletts von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose (Kohlenstoffe C-3 bis C-6) entstammen. Dies kann mit den oben beschriebenen Mechanismen nicht erklärt werden. Es wird daher postuliert, dass lediglich 48 % der nachgewiesenen Milchsäure auf dem Weg der direkten Oxidation von 1-DG entstehen, während 36 % auf die Oxidation primär gebildeter

Folgeprodukte von 1-DG zurückzuführen sind. Eine plausible Precursorstruktur stellt 1-Desoxytetra-2,3-diulose dar. Über die Oxidation dieser Reduktonstruktur und anschließender  $\beta$ -Dicarbonylspaltung lässt sich die Bildung von Milchsäure und Ameisensäure formulieren (Abbildung 69).



**Abb. 69:** Postulierte Bildung von Milchsäure aus 1-Desoxytetra-2,3-diulose

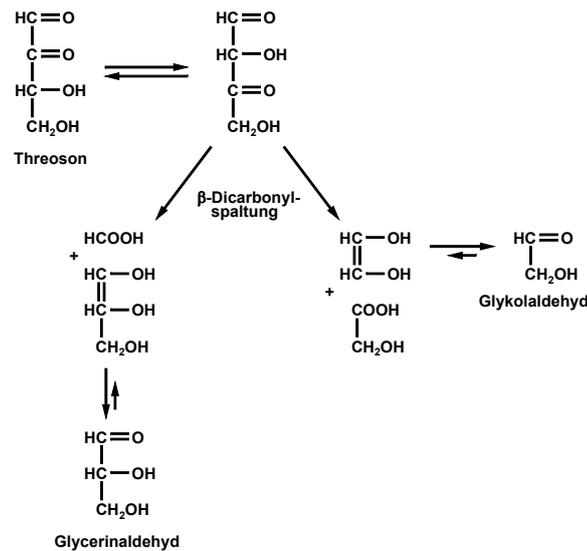
Die Carboxylfunktion der Milchsäure wird dabei am C-5 von 1-DG ausgebildet. Zur Erklärung der verbleibenden 16 % der Milchsäure müssen unbekannte Mechanismen angenommen werden, wobei auch zu beachten ist, dass die betrachteten Glucose-Modellsysteme nicht vollkommen identisch mit den 1-DG-Inkubationen sind.

Die Bildung von Aldehyden aus 1-DG über die retro-Aldol-Reaktion kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. So wurde zum Beispiel Glycerinaldehyd in Form seines korrespondierenden Benzimidazols in den Inkubationsansätzen nachgewiesen. Die Fragmentierung von 1-DG über die retro-Aldol-Spaltung würde jedoch neben Glycerinaldehyd die Bildung von Methylglyoxal als Gegenstück bedeuten. Zwar konnte das Methylglyoxal-Chinoxalin ebenfalls in den mit OPD derivatisierten Proben nachgewiesen werden, jedoch nur in vernachlässigbar kleinen Mengen, die in keinem Bezug zu den Glycerinaldehydgehalten standen.

Das Gleiche gilt für Glykolaldehyd als weitere 1-DG-Folgeverbindung. Die Bildung von Glykolaldehyd über die retro-Aldol-Spaltung von 1-DG würde zu 1-Desoxytetra-2,3-diulose führen. Der Mechanismus erforderte die Zuordnung der Kohlenstoffatome C-1 bis C-4 von 1-DG, also dem oberen Teil des Moleküls. Gobert und Glomb berichteten jedoch kürzlich, dass bei Inkubationen von [ $^{13}\text{C}$ ]Glucose ausschließlich unmarkiertes 1-Desoxytetra-2,3-diulose gebildet wird (57). Dies bedeutet, dass die Verbindung aus dem unteren Teil des

Kohlenstoffskeletts von 1-DG hervorgeht. Dies ist auch im Einklang mit dem oben beschriebenen Bildungsmechanismus für 1-Desoxytetro-2,3-diulose.

Die Bildung von Glycerinaldehyd und Glykolaldehyd erfordert daher andere Erklärungen. Eine naheliegende Alternative ist die weitere Fragmentierung primär aus 1-DG gebildeter Folgeprodukte. Abbildung 70 zeigt die postulierte Bildung der beiden Aldehyde durch  $\beta$ -Dicarbonylspaltung von Threoson.



**Abb. 70:** Bildung von Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd

Da Threoson bevorzugt unter aeroben Bedingungen gebildet wird, erklärt der Mechanismus ebenfalls die bevorzugte Bildung beider Aldehyde in Anwesenheit von Sauerstoff.

Die Bildung von Acetaldehyd beim Abbau von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose kann zumindest teilweise über einen Strecker-Abbau der eingesetzten Aminosäure Alanin erklärt werden. Experimente, die in Anwesenheit von  $\beta$ -Alanin durchgeführt wurden, zeigten tatsächlich, dass die Hälfte der gemessenen Acetaldehydkonzentration auf diese Reaktion zurückzuführen ist. Angesichts der allgemein sehr kleinen Konzentration von Acetaldehyd ist dieser Weg jedoch nur von geringer Bedeutung für den Abbau von 1-DG unter den hier betrachteten Bedingungen.

Wie in Abbildung 65 zusammenfassend dargestellt, führt der Abbau von Hexosen unter Maillard-typischen Bedingungen via 1-Desoxyhexo-2,3-diulose zur

Entstehung verschiedener C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Produkte, wobei der isomeren 1-Desoxyhexo-2,4-diulose besondere Bedeutung zukommt.

## **5.2 Bildung neuartiger Amidstrukturen aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose**

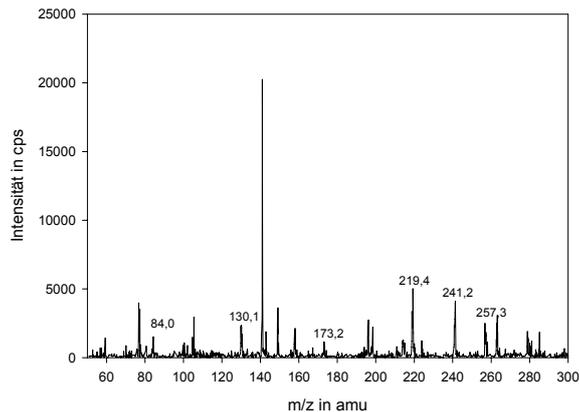
Der in dem Mechanismus der  $\beta$ -Dicarbonylspaltung ablaufende nucleophile Angriff kann auch durch eine Aminofunktion anstelle eines Hydroxidions formuliert werden. Dies kann zum Beispiel die  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin sein. Danach ergibt sich anstelle der freien Säure das entsprechende Säureamid von Lysin. In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig die Bildung von  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin in Inkubationen von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose und  $N^{\alpha}$ -t-BOC-Lysin nachgewiesen werden.

Das MS<sup>2</sup>-Spektrum der aus Inkubationsansätzen isolierten Verbindung entsprach dem der authentischen Referenzsubstanz. Die Bildung der intensivsten Produktionen ist über die bereits am Beispiel von CEL dargestellten, typischen Fragmentierungsschritte eines Lysinderivates zu formulieren (Abbildung 60).

Die Bildung von  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin erfolgte in der Anfangsphase der Inkubation schnell, während sich die Konzentration in der späten Phase der Umsetzung nur noch langsam änderte. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin in der Anfangsphase direkt aus 1-Desoxyhexo-2,3-diulose als Precursor entsteht, während zu späteren Zeitpunkten die Umsetzung bevorzugt aus primär gebildeten Folgeprodukten von 1-DG zu formulieren ist, die ebenfalls  $\beta$ -Dicarbonylspaltungen eingehen können. Auffallend sind die deutlichen Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Amide und der Säuren. Offensichtlich ist der Angriff der  $\epsilon$ -Aminofunktion bei der  $\beta$ -Dicarbonylspaltung ein wesentlich ungünstigerer Reaktionsschritt als die Reaktion eines Hydroxidions. Neben der stärkeren Nucleophilie muss dies auch auf die größere Mobilität des kleinen Ions zurückgeführt werden.

Entsprechend dem erwarteten mechanistischen Zusammenhang wurde auch für Essigsäure, Erythrose, Glycerinsäure und Milchsäure das Muster der schnellen Bildung in der Anfangsphase von Inkubationen bestätigt. Dabei reicherten sich neben dem stabilen Amid wie im zuvor untersuchten System 1-DG/L-Alanin

Essigsäure, Glycerinsäure und Milchsäure als stabile Folgeprodukte von 1-DG an. Neben *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin ist die Entstehung weiterer Säureamide von Lysin zu erwarten. So konnte der im HPLC-FLD-Chromatogramm nach dem *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin eluierende Peak isoliert und mittels LC-MS/MS vermessen werden. Abbildung 71 zeigt das Q1-Spektrum.



**Abb. 71:** Q1-Spektrum der unbekanntes Verbindung

Das Signal  $m/z = 219,4$  kann als protoniertes quasi-Molekülion angenommen werden, die Signale  $m/z = 241,2$  und  $m/z = 257,3$  als die entsprechenden Natrium- bzw. Kalium-Cluster-Ionen. Danach muss für die unbekanntes Verbindung eine nominale Molekülmasse von 218 amu angenommen werden. Diese entspricht der Molekülmasse des Milchsäureamids von Lysin. Die im LC-MS<sup>2</sup>-Spektrum der unbekanntes Verbindung (Abbildung 72) beobachteten Signale sind in guter Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsmuster von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin (Abbildung 73).

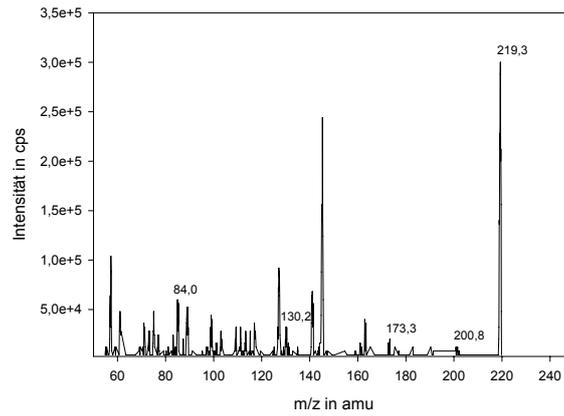


Abb. 72: MS<sup>2</sup>-Spektrum der unbekannt Verbindung

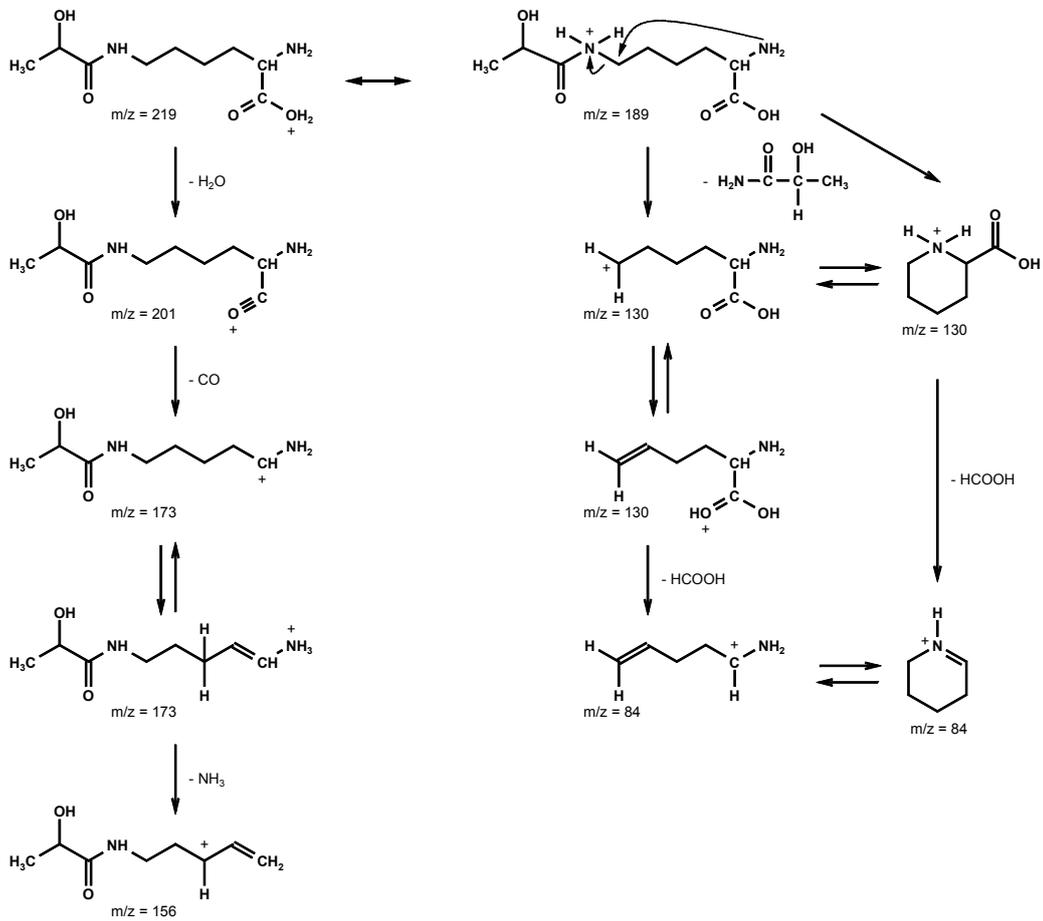


Abb. 73: Interpretation der MS-Fragmentierung als Milchsäureamid von Lysin

Zurzeit werden im Arbeitskreis von Professor Glomb die Untersuchungen fortgeführt, um nach Synthese der entsprechenden Referenzsubstanzen die Bildung weiterer stabiler Säureamide im 1-DG/ $N^{\epsilon}$ -t-BOC-Lysin-System zu bestätigen. Schon früher berichteten Hasenkopf et al. über den Nachweis des Oxalsäureamids von Lysin (58). Die Bildung dieser ursprünglich bei Umsetzungen mit Ascorbinsäure beschriebenen Struktur (59) konnte dabei mittels ELISA<sup>6</sup> auch nach Inkubation verschiedener Zucker, z.B. Ribose oder Fructose, mit Protein ( $\beta$ -Lactoglobulin) nachgewiesen werden. Ebenso gelang der Nachweis in wärmebehandelter Milch und Babynahrung.

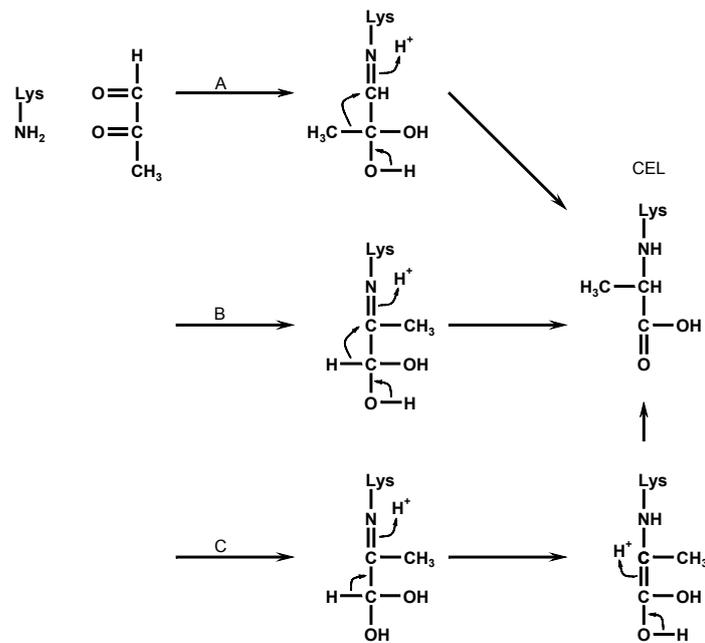
Stabile Strukturen wie die Amide werden als molekulare Marker für pathologische Prozesse im Zuge der Maillard-Reaktion *in vivo* diskutiert. Inwieweit  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin dafür geeignet ist, hängt auch davon ab, ob zwischen endogen enzymatisch post-translational acetylierten Lysin und solchem, das durch Maillard-Reaktion gebildet wurde, differenziert werden kann. Bei der Analyse ist zu beachten, dass die Amidbindungen unter den extremen Bedingungen einer sauren oder basischen Proteinhydrolyse nicht stabil sind. Alternativ empfiehlt sich hier die Verwendung enzymatischer Assays.

### **5.3 Untersuchungen zur Bildung von $N^{\epsilon}$ -Carboxyethyllysin**

Für den Mechanismus der CEL-Bildung lassen sich grundsätzlich drei Reaktionswege formulieren (Abbildung 74).

---

<sup>6</sup> *Enzyme linked immunosorbent assay*



**Abb. 74:** Theoretisch mögliche Mechanismen der Reaktion von Methylglyoxal und Lysin zum CEL

Beim Reaktionsmechanismus A greift die Aminogruppe der Lysinseitenkette an das C-1 von Methylglyoxal an. Nach Ausbildung der Schiffschen Base kommt es zur Hydratisierung. Anschließend lagert sich die so entstandene Struktur in das CEL um. Dazu wandert die Methylgruppe innerhalb des Moleküls von C-2 zu C-1. Derartige Alkyl-shifts werden sonst nur unter drastischen Bedingungen beobachtet. Ein Beispiel dafür stellt die Benzilsäure-Umlagerung dar. Beim Erhitzen in Kalilauge wird aus Benzil quantitativ die Benzilsäure gebildet. Während dieser Reaktion wandert ein Phenylrest innerhalb des Moleküls.

Ein weiteres Beispiel derartiger Reaktionen liefert das Verhalten von Zuckern im Alkalischen. Typische Reaktionsprodukte von Monosacchariden bei hohen pH-Werten sind die Saccharinsäuren. Über Alkyl- und Hydrid-shifts entstehen aus den Desoxyglucosonen die Saccharin-, Metasaccharin- und Isosaccharinsäure. Der Mechanismus erklärt sich analog der Benzilsäure-Umlagerung. Von lebensmittelchemischer Bedeutung ist dieser Prozess bei der Herstellung von Laugengebäck und bei der Gewinnung von Zucker, da hier im Alkalischen gearbeitet wird.

Auch wenn der Mechanismus A zunächst bei 37 °C und einem neutralen pH-Wert unwahrscheinlich erscheint, so sollte dieser Weg dennoch als möglicher Reaktionsweg betrachtet werden, da im Zuge der Maillard-Reaktion auch

Produkte, die sonst nur unter extremen Bedingungen beobachtet werden, unter dem katalytischen Einfluss der Amine bei wesentlich milderen Bedingungen entstehen. Somit ist der Mechanismus A durchaus denkbar.

Bei den alternativen Reaktionswegen B und C wird dagegen die Schiffsche Base am C-2 ausgebildet. Analog zum Weg A findet zunächst eine Hydratisierung statt. Ein darauf folgender Hydrid-shift im Sinne einer intramolekularen Cannizzaro-Reaktion führt beim Mechanismus B schließlich zum CEL.

Der Mechanismus C liefert das CEL durch eine Enolisierung und eine anschließende Tautomerisierung.

Tabelle 3 fasst noch einmal die wichtigsten Unterschiede der Massenspektren der CEL-Standardsubstanz und der aus den Inkubationen von isotopenmarkiertem Methylglyoxal isolierten Verbindung zusammen.

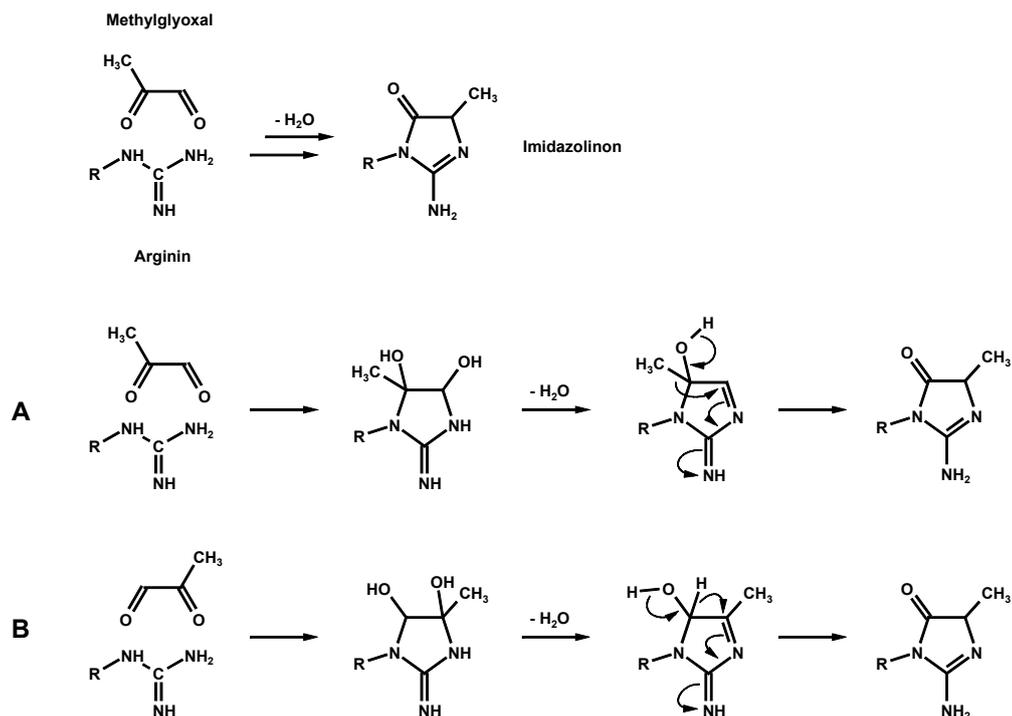
**Tabelle 3:** Vergleich der Fragmente in Massenspektren von CEL und <sup>13</sup>C-CEL

m/z CEL-Standard	m/z <sup>13</sup> C-CEL
438	439
406	407
379	380
180	180
206	207
319	320
347	348

Anhand der Fragmente  $m/z = 206$  und  $m/z = 319$  kann zwischen der Markierung der Carboxylfunktion und der Ethylgruppe von CEL differenziert werden, da in beiden Fällen die Carboxylgruppen abgespalten werden. Tabelle 3 zeigt bei Markierung in den Massenspektren die Fragmentationen  $m/z = 207$  und  $m/z = 320$ . Damit ist die Markierung des tertiären C-Atoms in der Ethylgruppe von CEL nachgewiesen. Ein Einbau des Isotopenlabels in der Carboxylfunktion ist nach diesen Ergebnissen auszuschließen. Damit kann entsprechend die Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin via Methyl-shift (Reaktionsweg A) zumindest unter den in der vorliegenden Arbeit betrachteten Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden. Die Isotopenverhältnisse der Massen 206/207 (Standard) und 207/208 entsprechen dem natürlichen Isotopenmuster, sodass auch eine teilweise nach

diesem Mechanismus ablaufende Reaktion nicht bestätigt werden konnte. Eine Differenzierung zwischen den Reaktionswegen B und C kann dagegen nicht vorgenommen werden.

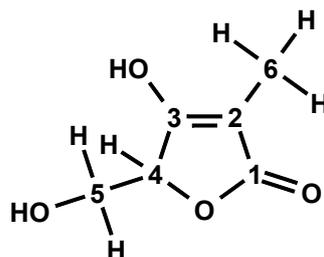
Es sollte dennoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass Reaktionswege, wie die Umlagerung einer Methylgruppe, die üblicherweise nur unter drastischen Reaktionsbedingungen beobachtet werden, bei Maillard-Reaktionen unter wesentlich moderateren Bedingungen Bedeutung erlangen können. Betrachtet man zum Beispiel die Reaktion von Arginin und Methylglyoxal zum Imidazolinon (Abbildung 75) lässt sich auch hier mechanistisch ein Methylshift (A) oder die Umlagerung eines Hydrids (B) formulieren. Eine genauere mechanistische Untersuchung dieser Reaktion könnte daher in Ergänzung der vorliegenden Arbeit lohnenswert sein.



**Abb. 75:** Mechanistische Alternativen der Bildung von Imidazolinon

#### 5.4 Untersuchungen zur Bildung von *4-Hydroxy-5-hydroxymethyl-3-methyl-5(H)-furan-2-on*

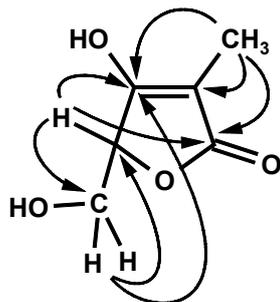
Auf den ersten Blick waren die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchung eine gute Bestätigung der postulierten Struktur von **4b** (vgl. Abbildung 76 für die Nummerierung der Struktur in der folgenden Diskussion).



**Abb. 76:** Postulierte Struktur von **4b**

Die drei im Tieffeld auftretenden Kohlenstoffresonanzen liegen in den üblichen Bereichen der chemischen Verschiebungen einer Lacton- (C-1; 176,9 ppm), einer C-C-Doppelbindung (C-2; 136,1 ppm) und einer Carbonylgruppe (C-3; 197,5 ppm). Die Verschiebung der Resonanz des C-4 (85,8 ppm), die als Resonanz eines sekundären Alkohols eher im Bereich 63-70 ppm zu erwarten wäre, ins Tieffeld bestätigt den vorhandenen Ringschluss. Die Resonanzen der Kohlenstoffatome C-5 (62,1 ppm) und C-6 (13,2 ppm) schließlich lagen ebenfalls in den üblichen Bereichen von primärem Alkohol bzw. Methylgruppe. Die im  $^1\text{H}$ -Spektrum auftretenden Multiplizitäten bestätigen die Hydroxymethylengruppe in Nachbarschaft zum stereogenen Zentrum (C-4). Die Resonanzen der damit diastereotopen Protonen am C-5 spalten zunächst durch geminale Kopplung jeweils zu Dubletts auf, die durch vicinale Kopplung zum Proton am C-4 nochmals dublettet werden. So ergibt sich das beobachtete Dublett von Dubletts. Die Dublettierung der Resonanz der Methylprotonen muss durch Fernkopplung ( $^5J$ ) mit dem Proton am C-4 erklärt werden. Dafür spricht die sehr kleine Kopplungskonstante (0,8 Hz).

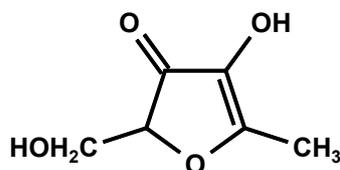
Das HMBC-Spektrum wies neben anderen die in Abbildung 77 dargestellten entscheidenden C,H-Korrelationen auf.



**Abb. 77:** Ausgewählte HMBC-Korrelationen der postulierten Struktur von **4b**

Die Korrelation der Protonen der Methylgruppe und dem Kohlenstoffatom C-3 ist die entscheidende Beobachtung für die postulierte Stellung der Methylgruppe. Wäre die Methylgruppe, wie für ein Folgeprodukt von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose zu erwarten, an das C-1 gebunden, sollte im HMBC-Spektrum keine Korrelation der Protonen zum C-3 (über vier Bindungen hinweg) erkennbar sein. Die korrekte Zuordnung des  $^{13}\text{C}$ -Signals zum C-3 wird dabei durch die entsprechenden HMBC-Korrelationen der Protonen am C-4 und C-5 zu diesem Signal abgesichert.

Das negative Ergebnis zur Bestätigung des Bildungsmechanismus von **4b** ließ jedoch Zweifel an der Korrektheit der Interpretation der Ergebnisse der Strukturanalyse aufkommen. Ausgehend von dem Ergebnis der hochauflösenden Massenspektrometrie (Summenformel:  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$ ) wurde daher eine Alternativstruktur für die aus dem 1-DG/L-Alanin-System isolierte Verbindung in Betracht gezogen (Abbildung 78).



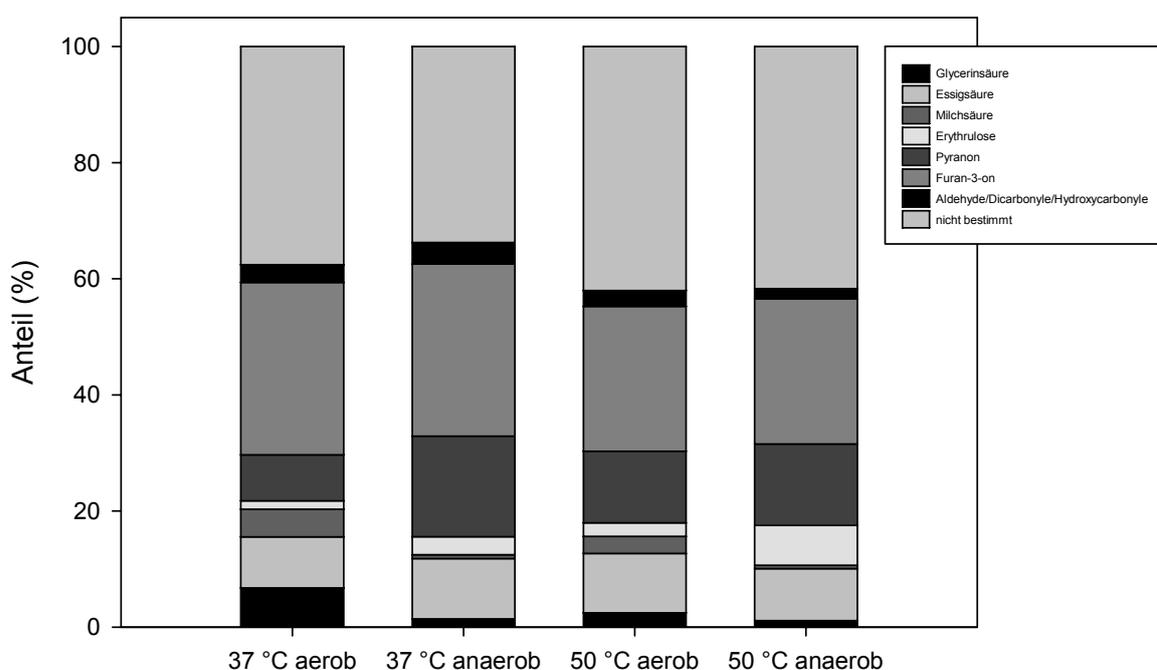
**Abb. 78:** Furan-3-on **4a**

Dabei handelt es sich um 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-furan-3(2*H*)-on (Furan-3-on) **4a**. Die beobachtete Korrelation der Methylprotonen mit dem C-3 ist dabei vermutlich durch das über den Ring und die Carbonylfunktion delokalisierte  $\pi$ -Elektronensystem erklärbar. Die übrigen Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchung sind auch mit der Alternativstruktur in Einklang.

Um zwischen beiden Strukturen eindeutig zu unterscheiden, wurde versucht, die isolierte Verbindung für eine Untersuchung mittels Röntgendiffraktometrie zu kristallisieren. Dies gelang jedoch nicht. Einen Hinweis, dass tatsächlich die Alternativstruktur die korrekte Beschreibung der Verbindung darstellt, bot die Beobachtung, dass mit  $\text{FeCl}_3$ -Lösung eine intensiv blaue Färbung erhalten wurde. Dies ist eine typische Reaktion von 4-Hydroxy-furan-3(2H)-Strukturen wie **4a**. Die Nähe der Hydroxyl- zur Carbonylfunktion erlaubt hier die Komplexierung von Metallionen.

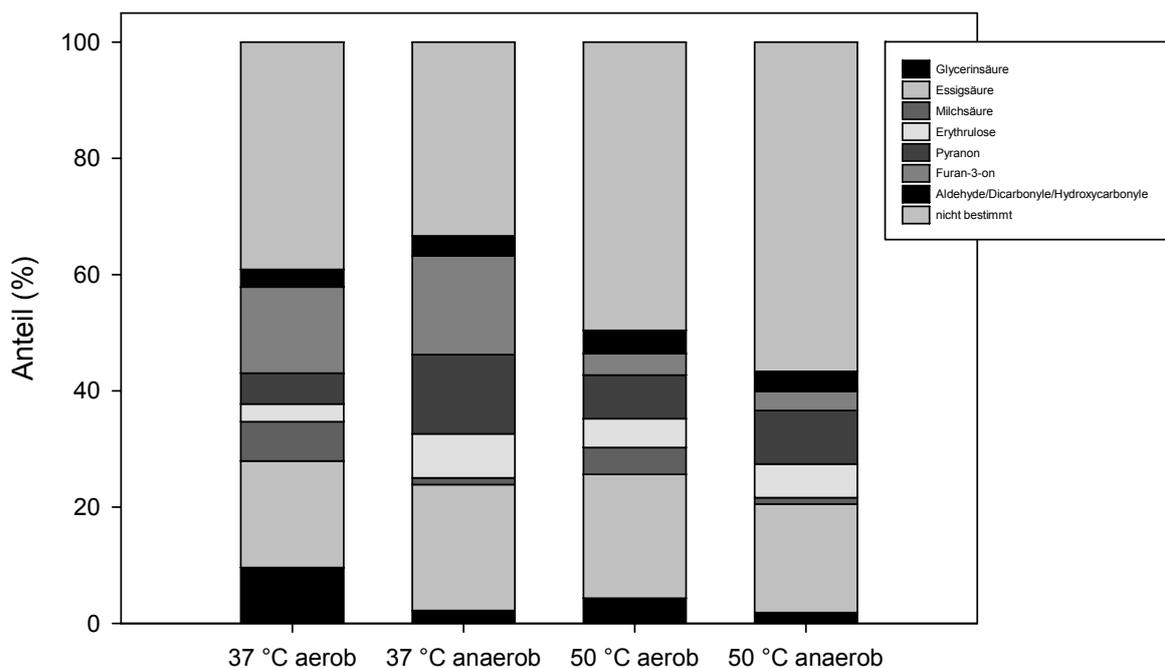
### 5.5 Bilanzierung der nachgewiesenen Folgeprodukte

Die hier nachgewiesenen Folgeprodukte von 1-Desoxyhexo-2,3-diulose spiegeln unter Umständen nicht das gesamte Spektrum der entstehenden Verbindungen wider. Eine Bilanzierung der Folgeprodukte erlaubt eine Einschätzung darüber. Die Konzentrationen der Produkte wurden unter Berücksichtigung der Anzahl der Kohlenstoffatome in den Fragmenten addiert und zum Kohlenstoffanteil der Ausgangsverbindung ins Verhältnis gesetzt. Abbildung 79 zeigt das Ergebnis der Bilanzierung nach drei Stunden Inkubationsdauer.



**Abb. 79:** Gesamtkohlenstoffbilanz der nachgewiesenen Folgeprodukte (nach 3 h Inkubationsdauer)

In den bei 37 °C durchgeführten Inkubationen konnte mit den nachgewiesenen Folgeprodukten jeweils über die Hälfte der ursprünglichen Kohlenstoffmenge erfasst wird. Etwa 40 % des Umsatzes werden damit nicht erklärt. Bei den 50 °C-Inkubationen ist dieser Anteil noch größer. Bei den erfassten Verbindungen entfällt der weitaus größte Anteil zu diesem Zeitpunkt der Inkubation auf Furan-3-on. Dies ist leicht einzusehen, da die Verbindung nicht nur in hohen Konzentrationen gebildet wurde, sondern als Produkt mit intaktem Kohlenstoffskelett auch ein entsprechend großer Anteil des Gesamtkohlenstoffs von 1-DG darin enthalten ist. Daneben sind nach drei Stunden  $\gamma$ -Pyranon und auch bereits die Essigsäure quantitativ wichtig. Der Anteil des über die Folgeprodukte nicht erfassten Umsatzes bleibt auch in der Bilanz nach 24 Stunden (Abbildung 80) bei etwa 40 %.



**Abb. 80:** Gesamtkohlenstoffbilanz der nachgewiesenen Folgeprodukte (nach 24 h Inkubationsdauer)

Deutlich zu erkennen ist der verringerte Anteil von Furan-3-on, das vor allem bei 50 °C in erheblichem Maße abgebaut wurde. Ebenso zeichnet die Bilanz den Abbau von  $\gamma$ -Pyranon, vor allem unter aeroben Bedingungen, nach. Außerdem zeigt sich deutlich der vergrößerte Anteil der stabilen Carbonsäuren, vor allem von

Essigsäure. Bei den nicht nachgewiesenen Verbindungen kann es sich z.B. um Produkte, die unter Einbeziehung der Aminkomponente gebildet werden, handeln. Bräunungsprodukte, deren Bildung bei allen Inkubationen bereits nach kurzer Zeit optisch festgestellt werden konnten, wurden ebenfalls nicht betrachtet und sind eine plausible Erklärung für die Diskrepanz in der Gesamtkohlenstoffbilanz. Weiterhin wurden flüchtige Verbindungen mit den angewandten analytischen Methoden nicht erfasst.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die chemischen Eigenschaften von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose (1-Desoxyglucoson, 1-DG), das zentrale Intermediat der Maillard-Reaktion zwischen Glucose und Verbindungen mit Aminofunktionen wie Aminosäuren oder Proteinen. Die Maillard-Reaktion besitzt große Bedeutung in der Lebensmittelchemie. So ist sie bei der thermischen Behandlung einer Vielzahl von Lebensmitteln, zum Beispiel beim Braten von Fleisch, beim Backen von Brot oder beim Rösten von Kaffee, von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung von Farbe und Aroma. Weiterhin ist bekannt, dass die Maillard-Reaktion auch unter physiologischen Bedingungen abläuft. Sie wird im Zusammenhang mit Spätfolgen von Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Arteriosklerose diskutiert. Trotz der großen Bedeutung von 1-DG für die Maillard-Reaktion gibt es bislang nur wenige Studien, die die Chemie und die Folgeprodukte ausgehend von der freien, authentischen Verbindung untersuchen. Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit dem Verhalten von 1-DG in wässrigen Maillard-Modellsystemen. Dazu wurde die Verbindung unabhängig synthetisiert und in Anwesenheit von L-Alanin inkubiert. Definierte Versuchsbedingungen wurden durch die Verwendung von Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) sichergestellt. Untersucht wurden der Einfluss von Reaktionstemperatur (37 vs. 50 °C) und Sauerstoff (aerobe vs. anaerobe Bedingungen). Für die Untersuchung des großen Spektrums an Folgeprodukten mit ihren verschiedenen chemischen Eigenschaften war es notwendig, zahlreiche analytische Techniken anzuwenden. Dies umfasste die Bestimmung von Trimethylsilyl- und O-Benzoyloxim-trimethylsilylderivaten mittels GC-MS, die Bestimmung von Essigsäure in Form des Decylesters mittels GC-FID nach *in-situ*-Derivatisierung in der wässrigen Phase und die Bestimmung von Chinoxalin- und Benzimidazolderivaten mittels HPLC-UV.

Als Folgeprodukte des Abbaus von 1-DG in Anwesenheit von L-Alanin konnten die Carbonsäuren Essigsäure, Glycerinsäure und Milchsäure, die Hydroxycarbonylverbindungen Erythrulose, 3,5-Dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-on ( $\gamma$ -Pyranon), 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-furan-3(2H)-on und Acetol, die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen Threoson, 1-Desoxytetra-2,3-diulose, 3-

Desoxy-2-tetrosulose und Methylglyoxal sowie die Aldehyde Glycerinaldehyd, Glykolaldehyd und Acetaldehyd nachgewiesen werden. Die gebildeten Carbonsäuren sind stabile Maillard-Endprodukte. Entsprechend reicherten sie sich nach der Bildung, die vor allem in der Anfangsphase der Inkubation schnell erfolgte, in den Umsetzungsgemischen an. Die Ergebnisse bestätigten, dass Essigsäure ein quantitativ bedeutendes Folgeprodukt von 1-DG ist. Bis zu 650 mmol Essigsäure pro mol 1-DG wurden nach 24 Stunden bei 37 °C gebildet. Die Bildung ist dabei über die hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung der isomeren 1-Desoxyhexo-2,4-diulose zu formulieren.

Diese Fragmentierungsreaktion erklärt auch die Bildung eines Teils der nachgewiesenen Glycerinsäure. Die Konzentrationen an Glycerinsäure waren deutlich niedriger als die von Essigsäure. Nach 48 Stunden betrug die Konzentration 256 mmol/mol 1-DG (37 °C, aerob). In derselben Größenordnung, jedoch nochmals kleiner, war zu diesem Zeitpunkt die Konzentration von Milchsäure (165 mmol/mol 1-DG). Im Gegensatz zur Essigsäure zeigte der zeitliche Verlauf der Bildung dieser beiden Säuren auch eine deutliche Abhängigkeit von der Anwesenheit von Sauerstoff. Somit muss neben dem hydrolytischen ein alternativer, oxidativer Fragmentierungsweg existieren. Es wurde daher die Oxidation der  $\alpha$ -Oxo-Endiolstruktur von 1-DG zu einem Tricarbonyl postuliert. Die Fragmentierung via  $\beta$ -Dicarbonylspaltung führt dann zur Bildung von Glycerinsäure und einem Keten, dessen Hydratisierung Milchsäure ergibt.

Neben der Carbonsäure entsteht bei der hydrolytischen  $\beta$ -Dicarbonylspaltung eine Endiolstruktur. Diese führt im Falle der Glycerinsäure zur Bildung von Acetol, das als Folgeprodukt von 1-DG identifiziert werden konnte. Das korrespondierende Gegenstück bei der Reaktion zu Essigsäure ist ein C<sub>4</sub>-Endiol, das in der vorliegenden Arbeit als zentral für das Verständnis der Entstehung weiterer Folgeprodukte von 1-DG identifiziert wurde. So führt Tautomerisierung zu Erythrose. Dieser C<sub>4</sub>-Zucker wurde deutlich bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet. Bis zu viermal so hoch war die Konzentration an Erythrose in Abwesenheit von Sauerstoff nach gleicher Inkubationsdauer und bei gleicher Reaktionstemperatur. Im Gegensatz zu den Carbonsäuren reicherte sich Erythrose in den Inkubationen nicht an. Nach Durchschreiten einer maximalen Konzentration wurde die Verbindung wieder abgebaut. Das gleiche Muster zeigten

auch die zeitlichen Verläufe der Konzentrationen von drei  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen, die als Folgeprodukte von 1-DG nachgewiesen wurden. Dies waren Threoson (3,4-Dihydroxy-2-oxo-butanal), das vor allem unter aeroben Bedingungen gebildet wurde, sowie 1-Desoxytetra-2,3-diulose (1-Hydroxy-2-oxo-butanal) und 3-Desoxy-2-tetrosulose (4-Hydroxy-2-oxo-butanal), die, wie Erythrulose, unter anaeroben Bedingungen bevorzugt waren. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit der Überlegung, dass die Verbindungen in der Anfangsphase der Inkubation schnell gebildet werden, solange 1-DG und das Endiol als indirekter und direkter Precursor noch vorhanden sind und anschließend aufgrund ihrer Reaktivität wieder abgebaut werden. Die Bildung von Threoson kann über die Oxidation der Endiolstruktur formuliert werden, wodurch auch die bevorzugte Bildung der konkurrierenden Strukturen unter anaeroben Bedingungen verständlich wird. 3-Desoxy-2-tetrosulose ergibt sich durch Dehydratisierung am C-3 des Endiols. In einer analogen Reaktion des korrespondierenden 2,3-Endiols entsteht durch Wasserabspaltung am C-1 1-Desoxytetra-2,3-diulose.

Retro-Aldol-Spaltungen, die zur Bildung von Aldehyden aus 1-DG führen, stellen dagegen, zumindest unter den in dieser Arbeit betrachteten moderaten Reaktionsbedingungen, keine wichtigen Reaktionspfade dar. Für die nachgewiesenen Aldehyde sind alternative Bildungsmechanismen anzunehmen. Eine Möglichkeit ist dabei, dass sie aus der Fragmentierung primär gebildeter Folgeprodukte von 1-DG resultierten.

Mit  $\gamma$ -Pyranon und Furan-3-on wurden auch Folgeprodukte von 1-DG mit intaktem Kohlenstoffskelett nachgewiesen. Die Bildung dieser Produkte ist entsprechend über Dehydratisierung der pyranoiden bzw. furanoiden Form von 1-DG zu formulieren. Interessanterweise zeigten Inkubationen mit synthetisiertem  $\gamma$ -Pyranon, dass beim Abbau ebenfalls Folgeprodukte wie Glycerinsäure, Milchsäure und insbesondere auch Furan-3-on nachgewiesen werden konnten. Dies lässt den Schluss zu, dass  $\gamma$ -Pyranon durch Hydratation wieder 1-DG bilden kann.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin die Bildung stabiler Amidstrukturen bei der Umsetzung von 1-DG mit Lysin untersucht. Dazu wurde 1-DG mit  $N^{\epsilon}$ -t-BOC-Lysin in Phosphatpuffer inkubiert. Anhand der authentischen Referenzsubstanz konnte mittels HPLC-FLD (nach post-column-Derivatisierung mit  $\alpha$ -Phthaldialdehyd) die Bildung von  $N^{\epsilon}$ -Acetyl-L-Lysin nachgewiesen werden. Der eindeutige Nachweis erfolgte mittels LC-MS/MS.

Bis zu 1,5 mmol/mol 1-DG entstanden nach 168 Stunden (37 °C, unter aeroben Bedingungen). Mechanistisch lässt sich die Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin über die  $\beta$ -Dicarbonylspaltung der isomeren 1-Desoxyhexo-2,4-diulose formulieren, wobei in diesem Fall nicht ein Hydroxidion als Nukleophil angreift, sondern die  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysin. Auf diesem Weg ist auch die Bildung anderer Säureamide denkbar. So wurden in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf die Bildung des Milchsäureamids von Lysin erhalten. Dies ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Im Zusammenhang mit der Modifizierung der Lysinseitenkette stand schließlich auch ein letzter Aspekt dieser Arbeit. Es wurde versucht, den Mechanismus der Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin (CEL) aufzuklären. Diese stabile Struktur wird durch Reaktion von Methylglyoxal (2-Oxopropanal) mit Lysin gebildet. Dazu wurde 2-<sup>13</sup>C-Methylglyoxal synthetisiert und mit *N*<sup>ε</sup>-t-BOC-Lysin in Phosphatpuffer inkubiert. Nach Isolierung von <sup>13</sup>C-CEL aus den Inkubationslösungen wurde die Verbindung in Form des Trifluoracetylmethylesters mittels GC-MS vermessen. Der Vergleich charakteristischer Fragmentationen im Massenspektrum mit einem synthetisierten, unmarkierten CEL-Standard belegte, dass CEL nicht über einen Methyl-*shift* im Sinne einer Benzilsäureumlagerung entsteht. Zwischen einem Hydrid-*shift* (intramolekulare Cannizzaro-Reaktion) und einer Reaktion über Enolisierungs- und Tautomerisierungsschritte konnte jedoch nicht differenziert werden.

Zusammenfassend konnte mit vorliegender Arbeit die zentrale Bedeutung des hochreaktiven Intermediats 1-Desoxy-D-*erythro*-hexo-2,3-diulose für die Maillard-Reaktion von Hexosen bestätigt werden. Es gelang, zahlreiche Folgeprodukte beim aminkatalysierten Abbau von 1-DG zu identifizieren. Durch quantitative Betrachtungen konnten Einblicke in die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen gewonnen werden. Die hydrolytische  $\beta$ -Dicarbonylspaltung sowohl der nativen, als auch der oxidierten Form von 1-DG ist dabei von entscheidender Bedeutung für die Bildung von C<sub>2</sub><sup>-</sup>, C<sub>3</sub><sup>-</sup> und C<sub>4</sub><sup>-</sup> Fragmenten aus 1-DG.

## **7. Experimenteller Teil**

### **7.1 Abbau von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose**

Eine Lösung von 1-Desoxy-4,5-O-isopropyliden-D-erythro-hexo-2,3-diulose (0,2 mmol) in Wasser wurde unter Argon mit Dowex 50W × 8 (H<sup>+</sup>-Form, 50-100 mesh) gerührt. Die Vollständigkeit der Entschützung wurde nach drei Stunden mittels DC (TTC-Detektion) geprüft. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit Methanol nachgewaschen. Nach Abziehen der kombinierten Lösemittel am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4, 2,4 ml) aufgenommen. Aliquote (150 µl) dieser Lösung und einer Lösung von L-Alanin (0,2mmol) in Phosphatpuffer (2,4 ml) wurden in Schraubdeckel-Gläschen (1,5ml) überführt. Die so erhaltene Lösung (je 42 mM bezogen auf 1-DG und L-Alanin) wurde bei 37 °C oder 50 °C inkubiert. Über die Zeit entnommene Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und der Vermessung mittels GC-MS oder HPLC-UV zugeführt.

### **7.2 Anaerobe Inkubationen**

Inkubationen unter anaeroben Bedingungen wurden mit Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) durchgeführt nach Zusatz von Diethylentriaminpentaessigsäure (1 mM) als Chelator für Spuren von Metallen, die oxidative Reaktionen katalysieren können. Der Puffer wurde vor der Herstellung der Inkubationslösungen mit Helium entgast und die Inkubationsansätze vor der thermischen Behandlung mit Argon gespült.

### **7.3 Inkubationen von 1-DG mit N<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin**

Für die Inkubationen wurden je Inkubationsansatz 84 mM unabhängig synthetisiertes 1-DG und 84 mM N<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin (jeweils 150 µl) gelöst in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4) in einem verschließbaren Glasvial zusammen

pipettiert und über einen Zeitraum von einer Stunde bis zu sieben Tage im Trockenschrank (50 °C) belassen.

#### **7.4 Isolierung von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin**

Für den eindeutigen Nachweis der Bildung von *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin wurden zunächst 1-DG und *N*<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin (jeweils 150 µl 200 mM-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) umgesetzt (50 °C, 7 d). Daran schloss sich die Entschützung der Proben wie unter 7.7.7 beschrieben an. Nach Eintrocknen der Proben über Nacht am Savant wurde der Rückstand in ca. 1 ml Pyridiniumformiat (pH 5,5) aufgenommen und auf eine mit DOWEX 50 Ionenaustauscher-Harz befüllte Säule (Säulendurchmesser: 1 cm, Füllhöhe: 10 cm) gegeben. Als Elutionsmittel diente Pyridiniumformiat (pH 5,5). Bei einer Flußrate von ca. 10 ml/min wurden alle 5 min insgesamt 50 Fraktionen per Hand gesammelt und mittels DC (Kieselgel 60, Butanol/Wasser/Eisessig/Pyridin 4:3:2:2) überprüft. Die Fraktionen, die nach zehn Minuten Entwicklung im Trockenschrank mit Ninhydrin anfärbbar waren, wurden vereint und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach wiederholter (fünfmaliger) Aufnahme des Rückstandes in Wasser und anschließendem Abrotieren erfolgte die weitere Aufreinigung und Isolierung des *N*<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysins mittels präparativer HPLC-FLD. Hierzu wurde der Rückstand in dem verwendeten Laufmittel (Methanol/Wasser 70:30) aufgenommen und auf die Säule gegeben. Es wurden bei einer Flußrate von 15 ml/min 40 Fraktionen á 1 min gesammelt. Die vereinten Produktfraktionen (Fluoreszenzdetektion nach *post-column*-Derivatisierung mit OPA) wurden unter verminderten Druck bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeeengt, der Rückstand in 200 µl Wasser aufgenommen und schlussendlich an der LC-MS/MS vermessen.

#### **7.5 Inkubationen von 2-<sup>13</sup>C-Methyglyoxal mit *N*<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin**

Für die Untersuchungen zur Bildung von <sup>13</sup>C-markiertem CEL wurden Inkubationsansätze von 2-<sup>13</sup>C-Methyglyoxal (50 mM) und *N*<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin (25 mM) in Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4) durch Zufügen entsprechender Mengen von Lösungen von *N*<sup>α</sup>-t-BOC-Lysin und Phosphatpuffer (0,4 M, pH 7,4) zu Aliquoten

der aus der Synthese von 2-<sup>13</sup>C-Methyglyoxal erhaltenen wässrigen Destillate hergestellt. Die Inkubationsansätze wurden in verschließbaren Vials bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Ein definierter Endzeitpunkt der Inkubation wurde nicht festgelegt. Je nach Bedarf wurden Teilvolumina der Ansätze entnommen und den entsprechenden Untersuchungen zugeführt. Ziel dieser Vorgehensweise war es, eine maximale Menge an <sup>13</sup>C-markiertem CEL zu gewinnen.

## **7.6 Derivatisierungsreaktionen**

### **7.6.1 Trimethylsilylierung**

Auf der Grundlage der in (60) beschriebenen Methode wurde ein Aliquot (50 µl) der Inkubationslösung am Vakuum-Rotations-Konzentrator eingetrocknet und der Rückstand mit 50 µl Pyridin versetzt. Anschließend wurden 50 µl N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (mit 5 % Trimethylchlorosilan) zugefügt und die Lösung für fünf Minuten am Ultraschall behandelt. Die Proben wurden drei Stunden bei Raum belassen und mittels GC-MS vermessen. Die Quantifizierung wurde durchgeführt durch Vergleich der im TIC erhaltenen Peakflächen mit denen von Standardlösungen, die bekannte Mengen der reinen Referenzsubstanzen enthielten. Die Signale der Analytverbindungen wurden dabei auf das Signal der silylierten Phosphorsäure, die in allen Proben in gleichem Gehalt enthalten war, standardisiert. Die für die silylierten Verbindungen erhaltenen Messwerte zeigten Standardabweichungen im Bereich < 10 mmol/mol 1-DG, entsprechend Variationskoeffizienten < 5%.

### **7.6.2 Decylchloroformat Derivat von Essigsäure**

In Anlehnung an die in (40) beschriebene Methode wurden die Inkubationslösung mit Chlorbernsteinsäure (50 µg) gelöst in Wasser als interner Standard versetzt. Pyridin (40 µl) und Decylchloroformat (50 ml) wurden zugefügt und die Mischung für zehn Minuten am Ultraschall belassen. Der gebildete Decylester wurde mit

Hexan extrahiert und die organische Phase mittels GC-FID vermessen. Die Quantifizierung erfolgte mit interner Kalibrierung unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Eisessig. Die erhaltenen Messwerte zeigten Standardabweichungen  $< 20$  mmol/mol 1-DG, entsprechend Variationskoeffizienten  $< 3,5$  %. Die für die Kalibrierkurven erhaltenen Bestimmtheitsmaße waren jeweils  $> 0,97$ .

### 7.6.3 Chinoxalin-Derivate

Die Proben wurden mit o-Phenylendiamin (4,95  $\mu$ mol) gelöst in Wasser (30  $\mu$ l) versetzt und vor der Vermessung mit HPLC-UV fünf Stunden bei Raumtemperatur nachinkubiert. Die Umsetzung der Dicarbonyl- zu den korrespondierenden Chinoxalinen ist nach (61) unter diesen Bedingungen nahezu vollständig. Die Chinoxaline wurden bei  $\lambda = 320$  nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Peakflächen mit denen von Standardlösungen, die bekannte Mengen entweder kommerziell erhältlicher Referenzsubstanz (2-Methylchinoxalin) oder reiner, authentischer Chinoxaline enthielten, die in unserer Arbeitsgruppe aus Reaktionsmischungen isoliert und deren Reinheit und Identität nachgewiesen wurde. Die für die Chinoxaline erhaltenen Messwerte zeigten Standardabweichungen  $< 1,5$  mmol/mol 1-DG, entsprechend Variationskoeffizienten  $< 5$  %.

### 7.6.4 O-Benzylloxim Trimethylsilylierung

Hydroxycarbonyl-Verbindungen wurden auf der Grundlage der in (62) beschriebenen Methode mit einigen Änderungen derivatisiert. Die Proben wurden mit einer Lösung von O-Benzylhydroxylamin Hydrochlorid (6  $\mu$ mol) in Wasser (300  $\mu$ l) versetzt und drei Stunden bei 37°C belassen. Die Mischung wurde anschließend auf pH 6 eingestellt und mit 1ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit Calciumsulfat getrocknet, mit Argon abgeblasen und vor der Vermessung mit GC-MS nach der unter 7.6.1 beschriebenen Methode silyliert.

## **7.7 Präparative Arbeiten**

### **7.7.1 Darstellung von 1-Desoxy-2-O-ethyl-4,5-O-isopropyliden-D-erythro-hex-1-en-3-ulose**

t-Butyllithium (4,5 ml, 1,5 M in Pentan, 6,3 mmol) wurde bei -65 °C (Aceton/Trockeneis) zu einer Lösung von Ethylvinylether (0,96 ml, 10 mmol) in THF (6 ml) unter Argonatmosphäre zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei 0 °C (Wassereis) belassen, bis es farblos war. Nach erneutem Abkühlen auf -65 °C wurde eine Lösung von 2,3-O-Isopropyliden-D-(–)-erythrolacton (1020 mg, 6,5 mmol) in THF (4 ml) zugefügt und das Gemisch 30 min bei 0 °C gerührt. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 20 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung wurde dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand einer Hochvakuumdestillation (105 °C, 0,1 Torr) unterzogen. Das erhaltene hellgelbe Öl wurde mittels Säulenchromatographie (RP18, Wasser/Methanol 7/3, v/v) weiter aufgereinigt. Die Produktfraktionen (Kieselgel 60-DC, Ethylacetat/Hexan 3/7, v/v,  $R_f=0,69$ , TTC-Detektion) wurden vereinigt und der Eluent unter vermindertem Druck abgezogen. Es wurde ein farbloses Öl erhalten (649 mg, 44 %).

### **7.7.2 Darstellung von 1-Desoxy-4,5-isopropyliden-D-erythro-hexo-2,3-diulose**

HCl (0,5 ml, 1 M) wurde zu einer Lösung von 1-Desoxy-2-O-ethyl-4,5-O-isopropyliden-D-erythro-hex-1-en-3-ulose (1054 mg, 4,6 mmol) in Methanol (30 ml) gegeben und der Ansatz für 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit Natronlauge (1 M) wurden die Lösemittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Wasser (30 ml) gelöst und viermal mit je 40 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Calciumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (RP18, Wasser/Methanol 7/3, v/v)

weiter aufgereinigt. Die Produktfraktionen (Kieselgel 60-DC, Ethylacetat/Hexan 3/7, v/v,  $R_f=0,56$ , TTC-Detektion) wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer Methanol abgezogen. Die wässrigen Lösungen wurden einer Gefriertrocknung unterzogen, aus der das Produkt als feiner, weißer Feststoff erhalten wurde (584 mg, 63 %).

### 7.7.3 Darstellung von 1-Desoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose

Eine Lösung von 1-Desoxy-4,5-isopropyliden-D-erythro-hexo-2,3-diulose (14 mg, 0,07 mmol) in Wasser (1 ml) wurde mit 1 ml Dowex 50 W $\times$ 8 ( $H^+$ -Form, 50-100 mesh) unter Argon gerührt. Nach 4 Stunden wurde die Vollständigkeit der Entschützung mittels DC (Kieselgel 60, Methanol/Ethylacetat 3/7, v/v,  $R_f=0,63$ , TTC-Detektion) geprüft. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und mit 2 ml Methanol nachgewaschen. Nach Abziehen der kombinierten Lösemittel unter vermindertem Druck wurde das Produkt als farbloser, amorpher Feststoff erhalten (10,2 mg, 91 %).

### 7.7.4 Isolierung von 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-furan-3(2H)-on

1-Desoxyhexo-2,3-diulose und L-Alanin (jeweils 42 mM) wurden in Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4 für 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Calciumsulfat getrocknet und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck (Rotationsverdampfer) bei 14 °C abgezogen. Der Rückstand wurde mittels präparativer Flüssigchromatographie auf einer Lobar-Fertigsäule (Merck, LiChroprep RP-18, 40-63  $\mu$ m, Größe B – 310 $\times$ 25) weiter aufgereinigt (Laufmittel: Wasser/Methanol 90:10, v/v). Produktfraktionen (UV-Detektion,  $\lambda = 220$  nm) wurden vereinigt, Methanol so weit wie möglich abgezogen (Rotationsverdampfer) und der Gefriertrocknung zugeführt.

Die verbleibende wässrige Inkubationslösung wurde mit dem zehnfachen Volumen an Ethylacetat versetzt, weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und

nochmals mit Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet.

### **7.7.5 Darstellung von 3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-methyldihydrofuran-2(3H)-on ( $\alpha$ -D-Glucosaccharino- $\gamma$ -lacton)**

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Hotchkiss et al. durchgeführt (63). D-Glucose (3,17 g, 17,6 mmol) wurde in 5 ml Ethanol und 1 ml Eisessig suspendiert. Nach Zugabe von 3,2 ml Dimethylamin (33 %ig in Ethanol, 18,0 mmol) wurde der Ansatz 1,5 h bei 80 °C belassen. Die entstandene Lösung wurde unter Vakuum eingeeengt. Nach Zugabe von 150 ml Wasser und 5,61 g Calciumoxid (100 mmol) wurden weitere 24 h bei 70 °C gerührt. Zu der Suspension wurden anschließend 6,74 g Oxalsäuredihydrat (53,5 mmol) gegeben, über Celite filtriert und das Filtrat über eine Ionenaustauschersäule [Dowex 50 Wx8 (H<sup>+</sup>-Form)] gegeben. Das Lösemittel wurde vollständig abgezogen und der Rückstand in 50 ml Wasser wieder aufgenommen. Nach weiteren 15 min bei 40 °C wurde zur Trockne eingeeengt.

Die weitere Aufreinigung erfolgte über eine Kieselgelsäule. Dazu wurde der Rückstand mit etwas Kieselgel und einem Gemisch aus Ethylacetat und Cyclohexan (1:1) versetzt und das Lösemittel anschließend wieder abgezogen. Die Kieselgelsäule (300 mm x 10 mm) wurde mit Ethylacetat/Cyclohexan (1:1) gespült. Anschließend wurde der an Kieselgel gebundene Rückstand aus der Reaktion auf die vorbereitete Säule gegeben. Dann wurde zunächst mit reichlich Ethylacetat/Cyclohexan (1:1) gespült, anschließend mit reinem Ethylacetat eluiert. Das nach Abziehen des Eluenten erhaltene Produkt wurde abschließend aus heißem Ethylacetat umkristallisiert. Dazu wurde das fast reine Lacton in heißem Ethylacetat gelöst. Die gleiche Menge Cyclohexan wurde hinzugefügt und der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das reine Produkt wurde als farblose kristalline Substanz erhalten (201 mg, 7 %).

### **7.7.6 Inkubation $\alpha$ -D-Glucosaccharino- $\gamma$ -lacton/Alanin**

$\alpha$ -D-Glucosaccharino- $\gamma$ -lacton und L-Alanin wurden je 42 mM in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) gelöst und bei 37 °C inkubiert. Nach 2, 5, 24 und 48 h wurde jeweils 1 ml Lösung mit Ethylacetat extrahiert, das Lösemittel abgeblasen und dann mit BSA/Pyridin silyliert. Die Vermessung der Proben erfolgte am GC-FID.

### 7.7.7 Abspaltung der t-BOC-Schutzgruppe

Um die *N*<sup>t</sup>-t-BOC-Schutzgruppe von den verschiedenen Proben zu lösen, wurden diese 1:1 (v:v) mit 6 N Salzsäure versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Salzsäure im Vakuum-Rotations-Verdampfer abgezogen oder die Proben soweit verdünnt, dass die Säure keinen weiteren Einfluss auf die Substanzen ausübte.

### 7.7.8 Derivatisierung von Aminen zur Bestimmung mittels GC

Zur Analytik von Aminosäuren und Peptiden mittels Gaschromatographie nutzt man oft die *N*-Trifluoracetylierung um die Flüchtigkeit der Verbindungen zu erhöhen (64). Des Weiteren werden die Methyl ester der Aminosäuren gebildet.

Die wasserfreien Proben wurden dazu im Wheaton-Röhrchen in einem Milliliter wasserfreiem Methanol gelöst. Nach der Zugabe von etwa 15 Tropfen Thionylchlorid wurden die Röhrchen verschlossen und für eine Stunde bei 100 °C inkubiert. In diesem Reaktionsschritt wurden die Carboxylgruppen der Verbindungen in ihre Methyl ester überführt.

Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und erneut in einem Milliliter wasserfreiem Methanol aufgenommen und im Vakuum-Rotations-Verdampfer über Nacht getrocknet.

Zum getrockneten Rückstand wurden 200  $\mu$ l Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben und bei 65 °C für etwa 30 Minuten inkubiert. Hierbei wurden die Aminosäuren in die *N*-Trifluoracetyl-Derivate überführt.

Nach erneutem Einrotieren, Aufnahme in einem Milliliter wasserfreiem Methanol und der Trocknung am Vakuum-Rotations-Verdampfer konnte der Rückstand in 100  $\mu$ l Dichlormethan aufgenommen werden.

Die so gewonnenen *N*-Trifluoracetyl-Aminosäure-methylester konnten der GC zugeführt werden.

### 7.7.9 Herstellung Derivatisierungsreagenz OPA

Es wurden pro Liter Ansatz 23,37 g Borsäure eingewogen und in etwa 800 ml Reinstwasser gelöst. Mit einer 44%igen Kaliumhydroxidlösung wurde ein pH 9,75 eingestellt. Nach Zugabe von 1,6 g *o*-Phthaldialdehyd, gelöst in 10 ml absolutem Ethanol (Ultraschallbad), wurde mit Reinstwasser auf einen Liter aufgefüllt. In eine DU-Saugflasche wurden 1 g Brij und 2 ml 2-Mercaptoethanol vorgelegt und die OPA-Lösung über einen Membranfilter (0,45 µm) bei einem Druck von etwa 280 mbar in die Flasche gezogen. Die OPA-Reagenz wurde bis zum vollständigen Auflösen des Brij gerührt. Die Reagenz wurde für maximal 3 Wochen im Kühlschrank gelagert.

### 7.7.10 Darstellung von *N*<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin (Standard)

Die Synthese des *N*<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin-Standards erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Fujioka und Tanaka (65).

Zunächst wurden 0,5 g *N*<sup>ε</sup>-*t*-Boc-Lysin (2,03 mmol) in 36 ml 50 %iger Ethanol­lösung in einem Erlenmeyerkolben gelöst. Das Gemisch wurde in einem Inkubator unter Rühren auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurden 1,7 g Bariumhydroxid in 7,5 ml warmen destilliertem Wasser aufgenommen und zum Reaktionsansatz zugegeben. Die Lösung erhielt dadurch eine milchig trübe Farbe. Außerdem wurden 0,65 ml 2-Brompropionsäure (7,08 mmol) hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde unter stetigem Rühren zunächst für 24 Stunden bei 50 °C inkubiert. Nach den ersten 24 Stunden wurde der nun wiederum klaren und farblosen Mischung erneut eine warme Bariumhydroxidlösung (1,2 g in 4,5 ml dest. Wasser) zugegeben. Die Inkubation wurde für weitere 48 Stunden bei 50 °C fortgesetzt (Reaktionskontrolle mittels DC, Ninhydrin-Detektion). Am Ende dieser Inkubationsphase behielt der Ansatz seine milchige Trübung. Anschließend wurde der Ansatz mit etwa 3,0 g Natriumsulfat versetzt. Dieser Schritt diente der Ausfällung des gelösten Bariums. Der Niederschlag wurde bei 4500 U/min für

10 Minuten abzentrifugiert. Die klare Lösung über dem Bariumsulfat wurde in einen 100 ml Kolben überführt und der Niederschlag wurde verworfen.

Diese Fällungsreaktion war zwingend notwendig, da die hohe Salzkonzentration die Säule der folgenden Anionenaustauschchromatographie stark belasten würde. Zudem kommt es zur Auskristallisierung von schwer löslichem Bariumhydroxid während der Konditionierung der Säule mit Natriumhydroxid-Lösung.

Am Rotationsverdampfer wurde die Lösung bei 40 °C und einem minimalen Druck von 30 mbar bis fast zur Trockene eingengt. Der Rückstand war leicht gelb gefärbt und hochviskos. In 10 ml Pyridiniumformiat konnte der Rückstand nach Behandlung im Ultraschallbad vollständig gelöst werden. Diese Lösung wurde dann auf die Ionenaustauschersäule aufgeben. Ziel der Ionenaustauschchromatographie war es, das überschüssige Lysin von dem CEL zu trennen. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden 100 Fraktionen (pro Fraktion 10 min) aufgefangen. Die Produktfraktionen (Kontrolle mittels DC und HPLC-FLD) wurden vereinigt, einrotiert, anschließend mit 6 N Salzsäure entschützt und erneut in 5 ml Wasser aufgenommen. Zur weiteren Aufreinigung wurde die erhaltene Lösung einer präparativen HPLC unterzogen. Dazu wurde die Lösung nochmals 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Produktfraktionen (Kontrolle: HPLC-FLD) wurden vereinigt und anschließend am Rotationsverdampfer einrotiert. Der erhaltene Rückstand wurde anschließend noch mehrfach in Wasser aufgenommen und wieder einrotiert. Nach einer weiteren Aufnahme in 1 ml destilliertem Wasser, wurde der CEL-Standard mittels Gefriertrocknung bis zur Massenkonstanz auskristallisiert. Es bildeten sich weiße Nadeln bis leicht braune Kristalle aus.

### **7.7.11 Synthese von 2-<sup>13</sup>C-Methylglyoxal (2-Oxo-[2-<sup>13</sup>C]propanal)**

Die Synthese von 2-<sup>13</sup>C-Methylglyoxal wurde in Anlehnung an Clelland und Thornalley (66) durchgeführt. Dazu wurden 1,8866 g Selendioxid in 5,95 ml dest. Wasser in einer braunen Schraubflasche gelöst. Um die Kristalle vollständig zu lösen, wurde das Gemisch für etwa 10 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die Lösung für etwa 5 Minuten mit Argon begast. Daraufhin wurden 1250 µl (1,0 g) 2-<sup>13</sup>C-Aceton zugefügt und die Flasche sofort zugeschraubt. Der Ansatz wurde 3 h 70 °C belassen (Reaktionskontrolle mittels

HPLC-UV nach OPD-Derivatisierung). Die Aufreinigung erfolgte durch anschließende Destillation. Der Reaktionsansatz wurde dazu unter Rühren mit einem Wasserbad (Temperatur etwa 70 °C) und unter reduziertem Druck (etwa 180 mbar) erhitzt. Die Gasübergangstemperatur betrug 60-61 °C. Es wurden klare, leicht gelbe bis leicht braune Destillate erhalten.

## 8. Chemikalien und Geräte

### 8.1 Chemikalien

Acros Organics (Beerse, Belgien):

- Acetol

Chemotrade (Leipzig, Deutschland)

- 2-<sup>13</sup>C-Aceton
- Methanol-d4

Fluka/Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland):

- N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (mit 5 % Trimethylchlorosilan)
- L-Alanin
- 2-Brompropansäure
- Eisessig
- D-Erythronsäure- $\gamma$ -lacton
- D-(-)-Erythrose
- L-(+)-Erythrulose
- *Heptafluorbuttersäure*
- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
- BOC-Lys-OH
- Methanol (wasserfrei)
- L-(+)-Milchsäure
- o-Phenylendiamin
- Pyridin puriss.
- Tetrahydrofuran (mol. sieve)
- Thionylchlorid
- Trifluoressigsäureanhydrid

## Experimenteller Teil

---

Merck (Darmstadt, Deutschland):

- Ammoniumchlorid
- Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat
- Kaliumdihydrogenphosphat
- Ninhydrin

Roth (Karlsruhe, Deutschland):

- Aceton
- Butan-1-ol
- Calciumsulfat
- Diethylether
- Ethylacetat
- n-Hexan
- Kaliumhydroxid

Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland):

- N<sup>ε</sup>-Acetyl-L-Lysin
- Bariumhydroxid
- O-Benzylhydroxylamin-Hydrochlorid
- Brij 35
- Chlorbernsteinsäure 96 %
- Diethylentriaminpentaessigsäure
- 2-Mercaptoethanol
- o-Phthaldialdehyd
- D-(-)-Threose

Aldrich/Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland):

- Decylchloroformat 97 %
- D-Glycerinsäure, Dicalciumsalz
- 2-Methylchinoxalin
- Methylglyoxal-Lösung
- Selendioxid

Serva/Boehringer (Ingelheim-Heidelberg, Deutschland):

- Dowex 50W × 8 (50 100 mesh)

## 8.2 Geräte

### 8.2.1 GC-MS

GC: Thermo Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen)

Säule: HP-5 (95 % Dimethylsilyl, 5 % Diphenylsilyl) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA); zusätzlich ca. 1 m unpolar desaktivierte Vorsäule

Dimensionen: 30 m × 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke)

Injektor: 220°C

Injektionsmodus: Split (1:30)

Transfer line: 250°C

Trägergas: Helium 5.0

Linearer Fluss: 28 cm/s (1 ml/min; *constant flow mode*)

Temperaturprogramm 1:

Start: 100 °C (0 min)

Ramp 1: 5 °C/min → 200 °C (0 min)

Ramp 2: 10 °C/min → 270 °C (10 min)

EI-MS: Thermo Finnigan Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen)

Elektronenenergie: 70eV

Quellentemperatur: 210 °C

Scan modus: Full Scan (m/z 50-650)

LCI-MS: Thermo Finnigan Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen)

Elektronenenergie: 70eV

Filamentstrom: 80 µA

Quellentemperatur: 190 °C

Reaktandgas: Methanol

Scan modus: Full Scan (m/z 50-650)

### 8.2.2 GC-FID

GC: HP 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)

Säule: HP-5 (95 % Dimethylsilyl, 5 % Diphenylsilyl) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA); zusätzlich ca. 1 m unpolar desaktivierte Vorsäule

Dimensionen: 30 m × 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke)

Injektor: 250°C

Injektionsmodus: Split (1:10)

FID: 270°C

Trärgas: Helium 4.6

Linearer Fluss: 28 cm/s (1,6 ml/min; *constant flow mode*)

Brennergas: Wasserstoff/Druckluft

Temperaturprogramm 2:

Start: 50 °C (1 min)

Ramp 1: 4 °C/min → 120 °C (15 min)

Ramp 2: 40 °C/min → 220 °C (3 min)

Ramp 3: 30 °C/min → 260 °C (15 min)

### 8.2.3 HPLC-UV

Pumpe: Jasco PU-2089 Plus (quaternäre Gradienten Pumpe mit Degasser)

Autosampler: Jasco AS-2055 Plus

Detektor: Jasco-UV-2075 Plus

Säule: Eurospher 100-5 C18, 250 × 4,6mm (Knauer, Berlin)

Fluss: 1ml/min

Mobile Phase: Wasser (Solvent A<sup>7</sup>), Wasser/Methanol 3:7 (v/v, Solvent B<sup>1</sup>)

---

<sup>7</sup> beiden Laufmittelkomponenten wurde Heptafluorbuttersäure (0,6 ml/l) zugesetzt

Gradientenprogramm:

Injektion: 20 % B, dann linear

auf 30 % B in 35 min,

auf 40 % B in 5 min,

auf 70 % B in 15 min (für 5 min),

auf 100 % B in 30 min (für 10 min),

auf 20 % in 5 min (für 15 min).

### 8.2.4 HPLC/FLD

Pumpe: Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump

Degasser: Jasco DG 2080-54 4-Line Degasser

Gradientenmischer: Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit

Autosampler: Jasco AS-2055 Plus Intelligent Sampler

OPA-Reaktionspumpe: Merck-Hitachi 655A-13 Reaction Pump

Detektor: Jasco FP-2020 Plus Intelligent Fluorescence Detektor

Trennsäule: VYDAC Protein & Peptide C 18

Methode: Dauer 65 min, Säule bei 15 °C

Solvent A: Wasser, Solvent B: MeOH/Wasser 70/30

98A/2B (25') → 5' → 100B (10') → 5' → 98A/2B (20')

### 8.2.5 Präparative Flüssigchromatographie

Pumpe: Waters Associates Chromatography Pump (Model M-6000A)

Trennsäule: Merck Lobar Fertigsäule für die Flüssigkeitschromatographie,  
Größe B (310 x 25 mm), LiChroprep RP-18, 40-63 µm

Fraktionssammler: LKB Ultrarac Fraction Collector Type 7000

UV-Detektor (optional): Gynkotek SP-6

Integrator (optional): Shimadzu C-R6A Chromatopac

### **8.2.6 Vakuum-Rotations-Konzentrator**

Savant Speed Vac Plus SC 110 A

Savant Refrigerated Vapor Trap RVT 400

### **8.2.7 Gefriertrocknung**

Lyophilisator: VirTis benchtop SLC

Pumpe: Edwards

## 9. Anhang

### 9.1 Literaturverzeichnis

- (1) Maillard, L. C. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.* **1912**, *154*, 66-68.
- (2) Finot, P. A. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. In *The Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease*; Baynes, J. W., Monnier, V. M., Ames, J. M., Thorpe, S. R., Eds.; Annals of the New York Academy of Sciences; Wiley: New York, 2005; Vol. *1043*, pp 1-8.
- (3) Amadori, M. Prodotti di condensazione tra glucosio e *p*-toluidina. *Atti Accad. Naz. Lincei Mem. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat.* **1931**, *13*, 72-77.
- (4) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; 5. vollst. überarb. Aufl.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York, 2001.
- (5) Heyns, K.; Heukeshoven, J.; Brose, K. H. Browning reactions and fragmentation of carbohydrates. V. Degradation of fructose amino acids to N-(2-furoylmethyl) amino acids. Intermediates in browning reactions. *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* **1968**, *7*, 628-629.
- (6) Resmini, P.; Pellegrino, L. Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *Int. Chromat. Lab.* **1992**, *6*, 7-11.
- (7) Heyns, K.; Paulsen, H.; Eichstedt, R.; Rolle, M. The formation of 2-aminoaldoses by rearrangement of ketosylamines. *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 2039-2049.
- (8) Lee, H. S.; Nagy, S. Relationship of sugar degradation to detrimental changes in citrus juice quality. *Food Technol.* **1988**, *42*, 91-97.
- (9) Hodge, J. E. Dehydrated foods - chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1953**, *1*, 928-943.
- (10) Beck, J.; Ledl, F.; Severin, T. Formation of 1-Deoxy-D-Erythro-2,3-Hexodiulose from Amadori Compounds. *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, 240-243.
- (11) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Synthesis of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose, a major hexose Maillard intermediate. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 515-523.

- (12) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543-5550.
- (13) Mills, F. D.; Weisleder, D.; Hodge, J. E. 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, a novel nonenzymatic browning product. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 1243-1246.
- (14) Ledl, F.; Schnell, W.; Severin, T. Proof of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one in foods. Studies on Maillard Reaction XI. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **1976**, *160*, 367-370.
- (15) Kim, M. O.; Baltes, W. On the role of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 282-289.
- (16) Ledl, F.; Schleicher, E. Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 597-626.
- (17) Hofmann, T. Acetylformoin - A chemical switch in the formation of colored Maillard reaction products from hexoses and primary and secondary amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3918-3928.
- (18) Severin, Th.; Seilmeier, W. Maillard reaction. II. Reaction of pentoses in the presence of amine acetates. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **1967**, *134*, 230-232.
- (19) Hiebl, J.; Ledl, F.; Severin, T. Isolation of 4-Hydroxy-2-(Hydroxymethyl)-5-Methyl-3(2H)-Furanone from Sugar Amino-Acid Reaction Mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 990-993.
- (20) Ginz, M.; Balzer, H. H.; Bradbury, A. G. W.; Maier, H. G. Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 404-410.
- (21) Martins, S. I. F. S.; Van Boekel, M. A. J. S. Kinetic modelling of Amadori N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part II. Kinetic analysis. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1665-1678.
- (22) Davidek, T.; Devaud, S.; Robert, F.; Blank, I. Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Isotope labeling studies on the formation of acetic acid by a hydrolytic  $\beta$ -dicarbonyl cleavage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6667-6676.
- (23) Davidek, T.; Robert, F.; Devaud, S.; Vera, F. A.; Blank, I. Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative  $\alpha$ -dicarbonyl cleavage pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6677-6684.
- (24) Rahbar, S. An Abnormal Hemoglobin in Red Cells of Diabetics. *Clin. Chim. Acta* **1968**, *22*, 296-298.

- (25) Rahbar, S.; Blumenfeld, O.; Ranney, H. M. Studies of An Unusual Hemoglobin in Patients with Diabetes Mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, *36*, 838-843.
- (26) Rahbar, S. The discovery of glycated hemoglobin - A major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. In *The Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease*; Baynes, J. W., Monnier, V. M., Ames, J. M., Thorpe, S. R., Eds.; Annals of the New York Academy of Sciences; Wiley: New York, 2005; Vol. 1043, pp 9-19.
- (27) Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 109-116.
- (28) Ahmed, M. U.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Identification of  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl)lysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4889-4894.
- (29) Dunn, J. A.; Patrick, J. S.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* **1989**, *28*, 9464-9468.
- (30) Ahmed, M. U.; Frye, E. B.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W.  $N^{\epsilon}$ -(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* **1997**, *324*, 565-570.
- (31) Pfahler, C. Synthese, Strukturaufklärung und Nachweis reaktiver Abbauprodukte von 1-Desoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose (Synthesis, structure determination and detection of reactive degradation products of 1-deoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose). Ph.D. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin, Germany, 2002.
- (32) Wellsknecht, K. J.; Brinkmann, E.; Baynes, J. W. Characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and  $N^{\epsilon}$ -hippuryllysine - A model for Maillard reaction cross-links in proteins. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6246-6247.
- (33) Wellsknecht, K. J.; Brinkmann, E.; Wellsknecht, M. C.; Litchfield, J. E.; Ahmed, M. U.; Reddy, S.; Zyzak, D. V.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1996**, *11*, 41-47.
- (34) Brinkmann, E.; Wellsknecht, K. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Characterization of An Imidazolium Compound Formed by Reaction of Methylglyoxal and N-Alpha-Hippuryllysine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 2817-2818.
- (35) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41638-41647.

- (36) Iwabata, H.; Yoshida, M.; Komatsu, Y. Proteomic analysis of organ-specific post-translational lysine acetylation and -methylation in mice by use of anti-acetyllysine and -methyllysine mouse monoclonal antibodies. *Proteomics* **2005**, *5*, 4653-4664.
- (37) Wang, D. X.; Thompson, P.; Cole, P. A.; Cotter, R. J. Structural analysis of a highly acetylated protein using a curved-field reflectron mass spectrometer. *Proteomics* **2005**, *5*, 2288-2296.
- (38) Garcia, B. A.; Thomas, C. E.; Mizzen, C. A. Tissue-specific expression and post-translational modification of histone H3 variants. *J Proteome Res* **2008**, *7*, 4225-4236.
- (39) Violand, B. N.; Schlittler, M. R.; Duffin, K. L. Isolation of Escherichia coli synthesized recombinant eukaryotic proteins that contain  $\epsilon$ -N-acetyllysine. *Protein Sci* **1994**, *3*, 1089-1097.
- (40) Husek, P. Amino-Acid Derivatization and Analysis in 5 Minutes. *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 354-356.
- (41) Töpfer, A. Entwicklung einer Screeningmethode zum Nachweis von Fruchtsaftverfälschungen mittels Fruchtsäure-Aminosäure-Fingerprints durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie am Beispiel von Apfelsaft (). Dissertation, Technische Universität, Berlin, 1999.
- (42) Morita, N.; Inoue, K.; Takagi, M. Quinoxalines Derived from D-Glucose and O-Phenylenediamine in A Weakly Acidic Medium. *Agr. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 2665-2668.
- (43) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543-5550.
- (44) Beck, J.; Ledl, F.; Sengl, M.; Severin, T. Formation of Acids, Lactones and Esters Through the Maillard Reaction. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **1990**, *190*, 212-216.
- (45) Delatour, T.; Fenaille, F.; Parisod, V.; Buetler, T. Synthesis, tandem MS- and NMR-based characterization, and quantification of the 13-labeled advanced glycation endproduct, 6-N-carboxymethyllysine. *Amino Acids* **2006**, *30*, 25-34.
- (46) Brands, C. M. J.; van Boekel, M. A. J. S. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: Building of a reaction network model. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4667-4675.
- (47) Schulz, A.; Trage, C.; Schwarz, H.; Kroh, L. W. Electrospray ionization mass spectrometric investigations of alpha-dicarbonyl compounds - Probing intermediates formed in the course of the nonenzymatic browning reaction of L-ascorbic acid. *Int. J. Mass. Spectrom.* **2007**, *262*, 169-173.
- (48) Usui, T.; Yanagisawa, S.; Ohguchi, M.; Yoshino, M.; Kawabata, R.; Kishimoto, J.; Arai, Y.; Aida, K.; Watanabe, H.; Hayase, F. Identification and

- determination of alpha-dicarbonyl compounds formed in the degradation of sugars. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 2465-2472.
- (49) Nedvidek, W.; Ledl, F.; Fischer, P. Detection of 5-Hydroxymethyl-2-Methyl-3(2H)-Furanone and of Alpha-Dicarbonyl Compounds in Reaction Mixtures of Hexoses and Pentoses with Different Amines. *Z. Lebensm. Unters. - Forsch.* **1992**, *194*, 222-228.
- (50) Goto, R.; Hayami, J.; Kudo, K.; Otani, S. Studies on the Chemical Decomposition of Simple Sugars .10. Acetol Formation from C-14-Labeled Hexoses. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 753-757.
- (51) Hayami, J. Studies on the chemical decomposition of simple sugars. XII. Mechanism of the acetol formation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 927-932.
- (52) Weenen, H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62*, 393-401.
- (53) Beck, J.; Ledl, F.; Sengl, M.; Severin, T. Formation of Acids, Lactones and Esters Through the Maillard Reaction. *Z. Lebensm. Unters. -Forsch.* **1990**, *190*, 212-216.
- (54) Chiang, Y.; Kresge, A. J.; Meng, Q.; Morita, Y.; Yamamoto, Y. The 4,4,4-trifluoroacetoacetic acid keto-enol system in aqueous solution. Generation of the enol by hydration of trifluoroacetylketene. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8345-8351.
- (55) Takagi, M.; Morita, N. Active oxygens and the peroxidation of linoleic acid catalysed by degraded species of ascorbic acid. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1987**, *18*, 171-178.
- (56) Voigt, M.; Smuda, M.; Pfahler, C.; Glomb, M. A. Oxygen dependent fragmentation reactions during the degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose. *J. Agric. Food Chem.* **2010**.
- (57) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of reactive  $\alpha$ -dicarbonyl compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2009**.
- (58) Hasenkopf, K.; Ubel, B.; Bordiehn, T.; Pischetsrieder, M. Determination of the Maillard product oxalic acidmonolysinyamide (OMA) in heated milk products by ELISA. *Nahrung-Food* **2001**, *45*, 206-209.
- (59) Larisch, B.; Pischetsrieder, M.; Severin, T. Reactions of dehydroascorbic acid with primary aliphatic amines including N-alpha-acetyllysine. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1630-1634.
- (60) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543-5550.

- (61) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of alpha-dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543-5550.
- (62) Mason, B. S.; Slover, H. T. Gas Chromatographic Method for Determination of Sugars in Foods. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 551-554.
- (63) Hotchkiss, D. J.; Jenkinson, S. F.; Storer, R.; Heinz, T.; Fleet, G. W. J. Amadori ketoses with calcium hydroxide and the Kiliani reaction on 1-deoxy ketoses: Two approaches to the synthesis of saccharinic acids. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 315-318.
- (64) Manhas, M. S.; Hsieh, R. S.; Bose, A. K. Mass spectral studies. VII. Unusual fragmentation of some N-trifluoroacetyl amino acid methyl esters. *J. Chem. Soc. C* **1970**, 116-119.
- (65) Fujioka, M.; Tanaka, M. Enzymic and Chemical Synthesis of *N*<sup>ε</sup>-(L-Propionyl-2)-L-Lysine. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *90*, 297-300.
- (66) Clelland, J. D.; Thornalley, P. J. Synthesis of C-14-Labeled Methylglyoxal and S-D-Lactoylglutathione. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1990**, *28*, 1455-1464.

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

<b>ABB. 1:</b> BILDUNG DES AMADORI-PRODUKTS VON D-GLUCOSE.....	11
<b>ABB. 2:</b> BILDUNG DES HEYNS-PRODUKTES AM BEISPIEL DER FRUCTOSE.....	12
<b>ABB. 3:</b> BILDUNG VON 3-DESOXYGLUCOSON.....	12
<b>ABB. 4:</b> ENTSTEHUNG VON HMF AUS 3-DESOXYGLUCOSON.....	13
<b>ABB. 5:</b> PYRIDIN- UND PYRROLSTRUKTUREN AUS 3-DESOXYGLUCOSON.....	13
<b>ABB. 6:</b> BILDUNG VON 1-AMINO-1,4-DIDESOXYGLUCOSON.....	14
<b>ABB. 7:</b> BILDUNG VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	14
<b>ABB. 8:</b> NACHWEIS VON 1-DG MITTELS OPD AUS EINER AMADORI-VERBINDUNG.....	15
<b>ABB. 9:</b> SYNTHESE VON 1-DESOXY-D-ERYTHRO-HEXO-2,3-DIULOSE.....	15
<b>ABB. 10:</b> RINGISOMERIE VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	16
<b>ABB. 11:</b> ${}^2C^5$ -SESSEL-KONFORMATION DES $\beta$ -PYRANO-ISOMERS VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	16
<b>ABB. 12:</b> FOLGEPRODUKTE VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	17
<b>ABB. 13:</b> DICARBONYLSPALTUNGEN VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	18
<b>ABB. 14:</b> RETRO-ALDOL-FRAGMENTIERUNG.....	19
<b>ABB. 15:</b> STRECKER-ABBAU.....	19
<b>ABB. 16:</b> $N^{\epsilon}$ -(CARBOXYMETHYL)LYSIN.....	21
<b>ABB. 17:</b> $N^{\epsilon}$ -(CARBOXYETHYL)LYSIN.....	21
<b>ABB. 18:</b> 4-HYDROXY-5-HYDROXYMETHYL-3-METHYL-5( <i>H</i> )-FURAN-2-ON.....	22
<b>ABB. 19:</b> POSTULIERTE BILDUNG VON 4-HYDROXY-5-HYDROXYMETHYL-3-METHYL-5( <i>H</i> )-FURAN-2-ON.....	23
<b>ABB. 20:</b> IMIDAZOLIUM-CROSS-LINKS GOLD UND MOLD.....	23
<b>ABB. 21:</b> AMIDE VON LYSIN ALS AGE-STRUKTUREN.....	24
<b>ABB. 22:</b> BILDUNG VON $N^{\epsilon}$ -ACETYL-L-LYSIN.....	24
<b>ABB. 23:</b> SILYLIERUNG MIT BSA.....	26
<b>ABB. 24:</b> IN-SITU DERIVATISIERUNG VON ESSIGSÄURE.....	27
<b>ABB. 25:</b> <i>O</i> -ALKYL/-ARYLOXIM-TRIMETHYLSILYLIERUNG VON HYDROXYCARBONYLVERBINDUNGEN.....	28
<b>ABB. 26:</b> BILDUNG VON CHINOXALIN DURCH REAKTION VON DICARBONYL UND OPD.....	29
<b>ABB. 27:</b> BILDUNG VON BENZIMIDAZOL DURCH REAKTION VON OPD UND ALDEHYD.....	30
<b>ABB. 28:</b> DERIVATISIERUNG VON AMINEN MIT <i>o</i> -PHTHALDIALDEHYD.....	31
<b>ABB. 29:</b> TOTALIONENCHROMATOGRAMM EINER 1-DG/L-ALANIN INKUBATION.....	33
<b>ABB. 30:</b> BILDUNG VON GLYCERINSÄURE (1-DG/L-ALANIN).....	34
<b>ABB. 31:</b> BILDUNG VON MILCHSÄURE (1-DG/L-ALANIN).....	35
<b>ABB. 32:</b> NACHWEIS VON ESSIGSÄURE MITTELS GC-FID (NACH DERIVATISIERUNG MIT DECYLCHLOROFORMAT).....	36
<b>ABB. 33:</b> BILDUNG VON ERYTHRULOSE (1-DG/L-ALANIN).....	37

<b>ABB. 34:</b> BILDUNG VON $\gamma$ -PYRANON (1-DG/L-ALANIN).....	38
<b>ABB. 35:</b> BILDUNG VON FURAN-3-ON (1-DG/L-ALANIN) .....	39
<b>ABB. 36:</b> HPLC-UV-CHROMATOGRAMM EINER MIT OPD NACHINKUBIERTEN INKUBATIONSLÖSUNG (1-DG/L-ALANIN) .....	40
<b>ABB. 37:</b> BILDUNG VON 1-DT (1-DG/L-ALANIN).....	40
<b>ABB. 38:</b> BILDUNG VON 3-DT (1-DG/L-ALANIN).....	41
<b>ABB. 39:</b> BILDUNG VON THREOSON (1-DG/L-ALANIN).....	42
<b>ABB. 40:</b> HPLC-UV-CHROMATOGRAMM EINER INKUBATIONSPROBE (1-DG/L-ALANIN) NACH UMSETZUNG MIT <i>o</i> -PHENYLENDIAMIN .....	43
<b>ABB. 41:</b> BILDUNG VON GLYCERINALDEHYD (1-DG/L-ALANIN).....	44
<b>ABB. 42:</b> BILDUNG VON ACETALDEHYD (1-DG/L-ALANIN).....	45
<b>ABB. 43:</b> BILDUNG VON GLYKOLALDEHYD (1-DG/L-ALANIN).....	46
<b>ABB. 44:</b> ABBAU VON $\gamma$ -PYRANON ( $\gamma$ -PYRANON/L-ALANIN).....	47
<b>ABB. 45:</b> BILDUNG VON GLYCERINSÄURE ( $\gamma$ -PYRANON/L-ALANIN).....	48
<b>ABB. 46:</b> BILDUNG VON MILCHSÄURE ( $\gamma$ -PYRANON/L-ALANIN) .....	48
<b>ABB. 47:</b> BILDUNG VON FURAN-3-ON ( $\gamma$ -PYRANON/L-ALANIN) .....	49
<b>ABB. 48:</b> BILDUNG VON ERYTHRULOSE ( $\gamma$ -PYRANON/L-ALANIN) .....	50
<b>ABB. 49:</b> HPLC-FLD-SIGNAL VON $N^{\epsilon}$ -ACETYL-L-LYSIN (1-DG/ $N^{\alpha}$ -T-BOC-LYSIN) .....	51
<b>ABB. 50:</b> MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM VON $N^{\epsilon}$ -ACETYL-L-LYSIN.....	51
<b>ABB. 51:</b> MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM DER ISOLIERTEN VERBINDUNG.....	51
<b>ABB. 52:</b> BILDUNG VON $N^{\epsilon}$ -ACETYL-L-LYSIN (1-DG/ $N^{\alpha}$ -T-BOC-LYSIN).....	52
<b>ABB. 53:</b> BILDUNG VON ESSIGSÄURE (1-DG/ $N^{\alpha}$ -T-BOC-LYSIN).....	52
<b>ABB. 54:</b> BILDUNG VON $N^{\epsilon}$ -ACETYL-L-LYSIN (1-DG/ $N^{\alpha}$ -T-BOC-LYSIN) .....	53
<b>ABB. 55:</b> BILDUNG VON ESSIGSÄURE (1-DG/ $N^{\alpha}$ -T-BOC-LYSIN).....	54
<b>ABB. 58:</b> BILDUNG VON ERYTHRULOSE (1-DG/ $N^{\alpha}$ -T-BOC-LYSIN) .....	55
<b>ABB. 59:</b> MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM VON $N^{\epsilon}$ -CARBOXYETHYLLYSIN .....	57
<b>ABB. 60:</b> MS <sup>2</sup> -FRAGMENTIERUNG VON $N^{\epsilon}$ -CARBOXYETHYLLYSIN .....	58
<b>ABB. 61:</b> MASSENSPEKTRUM DES DERIVATISIERTEN CEL-STANDARDS .....	59
<b>ABB. 62:</b> FRAGMENTIERUNGSSCHEMA VON DERIVATISIERTEM $N^{\epsilon}$ -CARBOXYETHYLLYSIN .....	59
<b>ABB. 63:</b> GC-MS VON ISOTOPENMARKIERTEM CEL (DERIVATISIERT) .....	61
<b>ABB. 64:</b> MECHANISMUS DES ABBAUS VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE DURCH $\alpha$ - UND $\beta$ - DICARBONYLSPALTUNG UNTER ENTSTEHUNG VON ESSIGSÄURE .....	65
<b>ABB. 65:</b> ABBAU VON 1-DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE FÜHRT ZU C <sub>2</sub> -, C <sub>3</sub> - UND C <sub>4</sub> -FRAGMENTEN .....	66
<b>ABB. 66:</b> BILDUNG VON MILCHSÄURE UND GLYCERINSÄURE MITTELS OXIDATIVER $\alpha$ - DICARBONYLSPALTUNG .....	68
<b>ABB. 67:</b> OXIDATIV ABHÄNGIGE BILDUNG VON GLYCERINSÄURE UND MILCHSÄURE AUS 1- DESOXYHEXO-2,3-DIULOSE.....	69
<b>ABB. 68:</b> ALTERNATIVE REAKTIONSWEGE FÜR DIE BILDUNG VON MILCHSÄURE UND GLYCERINSÄURE .....	71
<b>ABB. 69:</b> POSTULIERTE BILDUNG VON MILCHSÄURE AUS 1-DESOXYTETRO-2.3-DIULOSE ....	72

<b>ABB. 70:</b> BILDUNG VON GLYKOLALDEHYD UND GLYCERINALDEHYD.....	73
<b>ABB. 71:</b> Q1-SPEKTRUM DER UNBEKANNTEN VERBINDUNG.....	75
<b>ABB. 72:</b> MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM DER UNBEKANNTEN VERBINDUNG.....	76
<b>ABB. 73:</b> INTERPRETATION DER MS-FRAGMENTIERUNG ALS MILCHSÄUREAMID VON LYSIN .....	76
<b>ABB. 74:</b> THEORETISCH MÖGLICHE MECHANISMEN DER REAKTION VON METHYLGLYOXAL UND LYSIN ZUM CEL.....	78
<b>ABB. 75:</b> MECHANISTISCHE ALTERNATIVEN DER BILDUNG VON IMIDAZOLINON .....	80
<b>ABB. 76:</b> POSTULIERTE STRUKTUR VON 4-HYDROXY-5-HYDROXYMETHYL-3-METHYL-5( <i>H</i> )- FURAN-2-ON .....	81
<b>ABB. 77:</b> AUSGEWÄHLTE HMBC-KORRELATIONEN VON 4-HYDROXY-5-HYDROXYMETHYL-3- METHYL-5( <i>H</i> )-FURAN-2-ON .....	82
<b>ABB. 78:</b> 4-HYDROXY-2-(HYDROXYMETHYL)-5-METHYL-FURAN-3(2 <i>H</i> )-ON.....	82
<b>ABB. 79:</b> GESAMTKOHLLENSTOFFBILANZ DER NACHGEWIESENEN FOLGEPRODUKTE (3 h)...	83
<b>ABB. 80:</b> GESAMTKOHLLENSTOFFBILANZ DER NACHGEWIESENEN FOLGEPRODUKTE (24 h) .	84

### **9.3 Lebenslauf**

Persönliche Daten:

Michael Voigt

geboren am 14. März 1978 in Berlin,

ledig

#### ***Beruflicher Werdegang***

---

06/2005-05/2009

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Marcus Glomb

#### ***Studium***

---

09/2003-11/2004

Praktikum der Lebensmittelchemie; Teil B der Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker

Abschluss: Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

03/2003-01/2004

Ergänzungsstudiengang Lebensmittelchemie (Diplom) an der Technischen Universität Berlin

Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker

10/1998-02/2003

Grund- und Hauptstudium im Studiengang Lebensmittelchemie (Staatsexamen) an der Technischen Universität Berlin

***Zivildienst***

---

07/1997-07/1998                      Altenpflege    im    Seniorenzentrum    Berlin-  
Lichterfelde

***Schulbildung***

---

1990-1997                              Georg-Büchner-Oberschule (Gymnasium) in  
Berlin-Tempelhof  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1984-1990                              Malteser Grundschule in Berlin-Tempelhof

#### **9.4 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

.....  
Datum, Unterschrift