

**Bildung von α -Dicarbonylen beim Maillard-induzierten
Abbau von Mono- und Disacchariden**

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 Frau Diplom-Lebensmittelchemikerin

Jenny Gobert

geboren am 06. September 1977 in Frankfurt/Oder

Gutachter: 1. Prof. Dr. Marcus A. Glomb
 2. Prof. Dr. Lothar W. Kroh

Halle/Saale, 03.12.2009

Abstract

Jenny Gobert

Bildung von α -Dicarbonylen beim Maillard-induzierten Abbau von Mono- und Disacchariden

Die Maillard-Reaktion ist eine sehr komplex ablaufende Reaktionsfolge, in deren Verlauf es zur Bildung von Aroma-, Geschmacksstoffen und Bräunungsprodukten kommt. Dabei sind überwiegend die stabilen Umsetzungsprodukte bekannt. Die reaktiven Substanzen dagegen liegen in den Umsetzungsgemischen meist nicht oder nur in sehr geringen Mengen vor und reagieren während der Isolierung bereits weiter. Eine solche reaktive Verbindungsklasse sind die α -Dicarbonyle.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von Glucose und Maltose/Lactose in Anwesenheit von Lysin untersucht. Die α -Dicarbonyle wurden mit *o*-Phenylen-diamin in stabile Chinoxaline überführt, woraus Glucoson, Lederer Glucoson, 1-Desoxyglucoson, 3-Desoxyglucoson, 1-Desoxypentosen, 3-Desoxypentosen, Threoson, 1-Desoxythreoson, 3-Desoxythreoson, Glyoxal, Methylglyoxal, Maltoson, 1-Desoxymaltoson, 3-Desoxymaltoson, 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson, 1,2,3-Tricarbonyl, 2,3,4-Tricarbonyl, 1,4-Didesoxyglucoson, 4-Desoxyglucoson, 3,4-Didesoxypentosen, Diacetyl und Glyoxalsäure resultierten.

Die für qualitative und quantitative Untersuchungen benötigten Referenzsubstanzen wurden mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) aus Glucose- und Maltoseinkubationen isoliert. Mit NMR, GC/MS und HR/MS wurden die Strukturen der isolierten Chinoxaline aufgeklärt.

Aerobe und anaerobe Inkubationen in Anwesenheit von Lysin erlaubten Einblicke in die Bildungswege der α -Dicarbonylverbindungen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

Gobert, J., Glomb, M. A.

„Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds”
J. Agric. Food Chem., 2009, 57 (18), 8591-8597

Gobert, J., Schubert, A., Glomb, M. A., 2009

“ α -Dicarbonyl as Key Intermediates during Maillard Degradation of Disaccharides”
J. Agric. Food Chem., (in Vorbereitung)

Tagungsvorträge

Gobert, J., Glomb, M. A.

„Bildung von α -Dicarbonylen beim Maillard-induzierten Abbau von Zuckern“
GDCh Regionalverbandstagung Süd/Ost, Jena 03. April 2008

Posterbeiträge

Gobert J., Glomb M. A., 2007

„Isolierung von α -Dicarbonylchinoxalinen mittels MLCCC“
Deutscher Lebensmittelchemikertag Erlangen-Nürnberg 10.-12. September 2007
Posterbeitrag als Abstract in *Lebensmittelchemie* 2008 (3), S. 72

Gobert J., Glomb M. A., 2008

„Maillard-induzierter Abbau von Glucose“
Deutscher Lebensmittelchemikertag in Kaiserslautern 08.-10. September 2008
Posterbeitrag als Abstract in *Lebensmittelchemie* 2009 (4), S. 100

Schubert A., Gobert J., Glomb M. A., 2008

„ α -Dicarbonyle als zentrale Intermediate des aminkatalysierten Abbaus von Disacchariden“
Deutscher Lebensmittelchemikertag in Kaiserslautern 08.-10. September 2008
Posterbeitrag als Abstract in *Lebensmittelchemie* 2009 (4), S. 101

I. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Marcus A. Glomb möchte ich für die Überlassung des Arbeitsthemas zur selbstständigen Bearbeitung danken. Für das immer entgegengebrachte Vertrauen, für die konstruktiven Besprechungen und Arbeitsanregungen möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Glomb möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft danken: bei Dipl.-LMC Michael Voigt für die Hilfestellungen und Diskussionen zu den Reaktionsmechanismen, Dipl.-LMC Martin Schubert und Dipl.-LMC Christian Henning für die Hilfe bei den Messungen am LC/MS und allen anderen für die gute Zusammenarbeit.

Bei Frau Dipl.-LMC Isabel Marloth und bei Dipl.-LMC Antje Schubert möchte ich mich für ihren Beitrag an dieser Arbeit, im Rahmen der angefertigten Diplomarbeiten, sehr herzlich bedanken.

Großer Dank gilt meinen Freunden, die mir während des gesamten Studiums und bei der Anfertigung dieser Arbeit beiseite gestanden haben. Zuletzt möchte ich den Menschen danken, die mir das letztendlich alles möglich gemacht haben. Großer Dank gilt meiner Familie, die mich stets bestärkt und immer tatkräftig unterstützt haben. Mein ganz persönlicher Dank gilt Gerald. Ihm danke ich für das entgegengebrachte Verständnis, für die andauernde Hilfe und die motivierenden Worte. Ihm widme ich diese Arbeit.

II. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Theoretischer Teil | 3 |
| 2.1 | Grundlagen der Maillard-Reaktion | 3 |
| 2.1.1 | Anfangsphase der Maillard-Reaktion..... | 3 |
| 2.1.2 | Bildung von α -Dicarbonylverbindungen | 4 |
| 2.1.2.1 | Bildung von α -Dicarbonylen mit vollständigem Kohlenstoffskelett (Desoxyosone) | 4 |
| 2.1.2.2 | Folgeprodukte der Desoxyosone..... | 8 |
| 2.2 | Nachweis und Bestimmung von α-Dicarbonylverbindungen | 15 |
| 2.3 | Isolierung von α-Dicarbonylchinoxalinen mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC)..... | 17 |
| 2.4 | Wichtige Reaktionen der α-Dicarbonyle | 18 |
| 2.4.1 | Strecker Abbau..... | 18 |
| 2.4.2 | Weiterführende Reaktionen unter Beteiligung von α -Dicarbonyl- strukturen | 19 |
| 2.4.2.1 | Retro-Aldol-Spaltung | 19 |
| 2.4.2.2 | α -Dicarbonyl-Spaltung | 20 |
| 2.4.2.2.1 | Hydrolytische α -Dicarbonyl-Spaltung | 20 |
| 2.4.2.2.2 | Oxidative α -Dicarbonyl-Spaltung..... | 21 |
| 2.4.2.3 | β -Dicarbonyl-Spaltung | 22 |
| 3 | Problemstellung und Zielsetzung | 23 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion..... | 24 |
| 4.1 | Qualitative und quantitative Untersuchungen von α-Dicarbonyl- chinoxalinen aus Glucose..... | 24 |
| 4.1.1 | Isolierung von α -Dicarbonylchinoxalinen aus Glucose | 24 |
| 4.1.2 | Strukturaufklärungen der isolierten Chinoxaline aus Glucose | 26 |
| 4.1.3 | Quantitative und mechanistische Untersuchungen der Glucose- inkubationen | 31 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.3.1 | Quantifizierung der gebildeten α -Dicarbonylverbindungen aus Glucose in Anwesenheit von OPD..... | 31 |
| 4.1.3.2 | Modelluntersuchungen zum Abbau von Glucose und Lysin in Abwesenheit von OPD | 35 |
| 4.1.3.3 | Untersuchungen zum Abbau von Lysin | 37 |
| 4.1.4 | Zusammenfassung | 38 |
| 4.1.5 | Modelluntersuchungen zur Aufklärung der Bildungswege..... | 39 |
| 4.1.5.1 | Modelluntersuchungen mit ^{13}C -markierter Glucose..... | 39 |
| 4.1.5.2 | Modelluntersuchungen zum Abbau von Glucoson | 41 |
| 4.1.5.3 | Modelluntersuchungen zum Abbau von 3-Desoxyglucoson | 43 |
| 4.1.5.4 | Modelluntersuchungen zum Abbau der Amadori-Verbindung | 44 |
| 4.1.6 | Zusammenfassung | 46 |
| 4.2 | Qualitative und quantitative Untersuchungen von α-Dicarbonylchinoxalinen aus Maltose und Lactose | 48 |
| 4.2.1 | Isolierung von α -Dicarbonylen aus Maltose | 48 |
| 4.2.1.2 | Strukturaufklärung der isolierten Chinoxaline aus Maltose..... | 49 |
| 4.2.2 | Quantitative und mechanistische Untersuchungen der Maltoseinkubationen | 52 |
| 4.2.3.1 | Quantifizierung der gebildeten α -Dicarbonylverbindungen aus Maltose in Anwesenheit von OPD | 52 |
| 4.2.3.2 | Modelluntersuchungen zum Abbau von Maltose und Lysin in Abwesenheit von OPD | 59 |
| 4.2.4 | Zusammenfassung | 62 |
| 4.3 | Modellreaktionen zum Abbau von Lactose in Gegenwart von OPD | 65 |
| 4.4 | Synthese von 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson | 67 |
| 4.4.1 | Stufe 1: Einführung einer Schutzgruppe..... | 69 |
| 4.4.2 | Stufe 2: Chlorierung der 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure | 70 |
| 4.4.3. | Herstellung von Diazomethan | 72 |
| 4.4.4 | Stufe 3: Kettenverlängerung um eine Methylgruppe | 72 |
| 4.4.5 | Darstellung von N^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester..... | 73 |
| 4.4.6 | Stufe 4: Umsetzung von Buttersäurechlorid mit N^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester | 74 |
| 5 | Zusammenfassung | 75 |

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6 | Experimenteller Teil | 80 |
| 6.1 | Chemikalien..... | 80 |
| 6.2 | Synthesen | 80 |
| 6.2.1 | D-Arabino-hexos-2-ulose (Glucoson) | 80 |
| 6.2.1.1 | Reinheitsbestimmung von D-Arabino-hexos-2-ulose (Glucoson) | 81 |
| 6.2.2 | 3-Desoxy-D-erythro-hexos-2-ulose (3-Desoxyglucoson) und Amadori-Verbindung | 82 |
| 6.3 | Reagenzien | 82 |
| 6.3.1 | Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,4..... | 82 |
| 6.3.2 | OPA-Reagenz | 82 |
| 6.4 | Inkubationsansätze | 83 |
| 6.4.1 | Inkubationen Glucose/Maltose unter aeroben Bedingungen | 83 |
| 6.4.2 | Inkubationen Glucose/Maltose unter anaeroben Bedingungen | 83 |
| 6.4.3 | Inkubationen ¹³ C-markierte Glucose unter aeroben Bedingungen | 83 |
| 6.4.4 | Inkubationen ¹³ C-markierte Glucose unter anaeroben Bedingungen | 83 |
| 6.4.5 | Inkubationen von Glucoson unter aeroben Bedingungen..... | 84 |
| 6.4.6 | Inkubationen von Glucoson unter anaeroben Bedingungen..... | 84 |
| 6.4.7 | Inkubationen von 3-Desoxyglucoson unter aeroben Bedingungen | 84 |
| 6.4.8 | Inkubationen von 3-Desoxyglucoson unter anaeroben Bedingungen..... | 85 |
| 6.4.9 | Inkubationen der Amadori-Verbindung unter aeroben Bedingungen..... | 85 |
| 6.4.10 | Inkubationen der Amadori-Verbindung unter anaeroben Bedingungen... | 85 |
| 6.4.11 | Inkubationsansätze Glucose/Maltose unter aeroben Bedingungen (für MLCCC-Standardgewinnung) | 85 |
| 6.4.12 | Inkubationsansätze Glucose/Maltose unter Rückfluss (für MLCCC Standardgewinnung) | 86 |
| 6.5 | Isolierung, Strukturaufklärung und Quantifizierung der α-Dicarbonyle ... | 86 |
| 6.5.1 | MLCCC-Trennung | 86 |
| 6.5.2 | HPLC-UV (Identifizierung und Quantifizierung von α -Dicarbonyl- verbindungen) | 87 |
| 6.5.3 | Fluoreszenz-HPLC (Aminosäureanalyse) | 88 |
| 6.5.4 | GC/MS (Identifizierung von α -Dicarbonylverbindungen)..... | 88 |
| 6.5.5 | GC/FID (Reinheitsbestimmung D-Arabino-hexos-2-ulose) | 89 |

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 6.5.6 | Hochauflösendes MS (Strukturaufklärung der α -Dicarbonylverbindungen) | 89 |
| 6.5.7 | LC/MS (Untersuchungen zur Isotopenverteilung der α -Dicarbonyle)..... | 90 |
| 6.5.8 | Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR) | 91 |
| 6.5.9 | Dünnschichtchromatographie (DC) | 91 |
| 6.5.10 | Lyophilisation..... | 92 |
| 6.6 | Synthese von 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson | 92 |
| 6.6.1 | 1,3-Dioxolan-Schutzgruppe | 92 |
| 6.6.1.1 | Silylierung (Produktkontrolle) | 92 |
| 6.6.1.2 | Derivatisierung (Produktkontrolle)..... | 92 |
| 6.6.2 | Chlorierung der geschützten Brenztraubensäure | 93 |
| 6.6.3 | Herstellung von Diazomethan | 93 |
| 6.6.4 | Darstellung von N ^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester | 93 |
| 6.6.4.1 | Hydrogenolyse von N ^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester | 94 |
| 7. | Abbildungsverzeichnis..... | 95 |
| 8. | Tabellenverzeichnis..... | 99 |
| 9. | Literaturverzeichnis..... | 100 |
| IV. | Anhang | VII |
| | Strukturaufklärung (NMR-, GC/MS- und HR/MS-Daten)..... | VII |
| | Lebenslauf..... | XXII |
| | Selbstständigkeitserklärung..... | XXIII |

III. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|-------------------------------------------|
| AGEs | advanced glycation end products |
| OPD | o-Phenylendiamin |
| MLCCC | Multilayer Countercurrent Chromatographie |
| GC | Gaschromatographie |
| MS | Massenspektrometrie |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance Spectroskopie |
| HR/MS | Hochauflösende Massenspektrometrie |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatographie |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| UV | Ultraviolett |
| vgl | Vergleich |
| Q | Chinoxaline |
| h | Stunden |
| min | Minuten |
| bzw. | beziehungsweise |
| BOC | Butoxycarbonyl |
| Abb | Abbildung |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| HFBA | Heptafluorbuttersäure |
| dest | destilliert |
| TTC | Triphenyltetrazoliumchlorid |
| vs | versus |
| z.T. | zum Teil |

1 Einleitung

Beim Kochen, Braten, Backen und Konservieren von Lebensmitteln finden Reaktionen statt, die für das Aussehen, den Geruch und den Geschmack verantwortlich sind. Viele dieser Veränderungen lassen sich auf die Maillard-Reaktion, eine Reihe hochkomplex ablaufender chemischer Prozesse, zurückführen. Unter der Maillard-Reaktion, welche auch als nichtenzymatische Bräunung bezeichnet wird, versteht man die Umsetzung von reduzierenden Zuckern mit Aminkomponenten aus Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen zu stabilen Bräunungsprodukten. Bei den reduzierenden Zuckern gehen vorwiegend Glucose, Fructose, Maltose, Lactose und Ribose eine Reaktion ein. Bei den Proteinen ist es vorwiegend die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Es sind allerdings auch Folgeprodukte aus Reaktionen mit der Guanidinogruppe des Arginins bekannt [1].

Die Maillard-Reaktion ist für den Prozess der Lebensmittelherstellung, Verarbeitung und Lagerung von zentraler Bedeutung. Da die meisten Lebensmittel aus Kohlenhydraten und Proteinen bestehen, ist sie immer gegenwärtig und beeinflusst somit die Qualität der Lebensmittel in erheblichem Maße. Aufgrund ihres breiten Produktspektrums führt die Maillard-Reaktion zu vielen verschiedenen erwünschten und unerwünschten Reaktionen. Neben der typischen Farbgebung kommt es zur Bildung von Aromastoffen, die den Geruch und den Geschmack positiv beeinflussen. Einige Maillard-Reaktionsprodukte haben darüber hinaus stark reduzierende Eigenschaften und tragen in Lebensmitteln zur Stabilisierung und zum Schutz vor oxidativem Verderb bei [2].

Eine negative Auswirkung ist die mit dem Reaktionsprozess voranschreitende Nährwertminderung des Lebensmittels. Da die Reaktion eines reduzierenden Zuckers mit Lysin zu stabilen Endprodukten führt, ist diese Aminosäure nach der Nahrungsaufnahme für den Körper nicht mehr verfügbar. Auch nicht reduzierende Zucker, wie Saccharose, können während eines Lebensmittelverarbeitungsprozesses zu Lysinverlusten führen, wenn die Reaktionsbedingungen eine Hydrolyse begünstigen. Des Weiteren kann es im Prozess der Maillard-Reaktion zur Bildung mutagener und cancerogener Stoffe kommen [3].

Da im menschlichen Organismus große Mengen an Proteinen und Zuckern vorliegen, entstehen auch im Körper Maillard-Reaktionsprodukte. Sie beeinflussen *in vivo* den Alterungsprozess durch Ausbildung von Proteinquervernetzungen, so

genannten „advanced glycation end products“ (AGEs). In langlebigem Bindegewebe und Matrixkomponenten akkumulieren die AGEs altersabhängig und werden in verstärktem Maß bei Diabetes gebildet. Sie können zu krankhaften Veränderungen beitragen, die mit dem Alterungsprozess sowie Spätkomplikationen bei Diabetes und Arteriosklerose in Zusammenhang stehen [4].

In der Maillard-Reaktion sind überwiegend die stabilen Umsetzungsprodukte bekannt. Reaktive Substanzen dagegen liegen in den Umsetzungsgemischen meist nicht oder nur in sehr geringen Mengen vor und reagieren während der Isolierung bereits weiter. Doch gerade diese Verbindungen sind für die Maillard-Reaktion von größter Bedeutung, da sie wesentlich an der Bildung von Bräunungsprodukten und Aromastoffen beteiligt sind. Zu dieser Verbindungsklasse gehören die α -Dicarbonyle. Diese Verbindungen sind wichtige Intermediate und Schlüsselverbindungen in der Maillard-Reaktion. Obwohl inzwischen viele Ergebnisse über den Ablauf der Maillard-Reaktion vorliegen, ist es nicht möglich ein vollständiges Reaktionsschema zu präsentieren. In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Reaktionswege der Maillard-Reaktion vorgestellt.

2 Theoretischer Teil

2.1 Grundlagen der Maillard-Reaktion

Grundvoraussetzung für den Ablauf der Maillard-Reaktion ist die Anwesenheit von reduzierenden Zuckern (Glucose, Maltose) und Aminkomponenten (Lysin).

Die Maillard-Reaktion gliedert sich in drei Phasen. In der Anfangsphase wird die partiell stabile Amadori-Verbindung gebildet. Diese enolisiert in der fortgeschrittenen Phase zu reaktiven α -Dicarbonylen. Infolge von Dehydratisierungs- und Fragmentierungsreaktionen entstehen erste Folgeprodukte, von denen einige bereits zur Aroma- und Farbbildung beitragen. Eine braune Färbung und starke Fluoreszenz zeigen die in der Endphase gebildeten Reaktionsprodukte. Ausgebildete hochpolymere Strukturen, die eine intensive Bräunung vorweisen, werden als Melanoidine bezeichnet [5].

2.1.1 Anfangsphase der Maillard-Reaktion

Amine bzw. Aminosäuren reagieren als nucleophile Verbindungen leicht an die Carbonylfunktion von reduzierenden Zuckern **1** unter Bildung von Iminen (Schiff-basen **2**). Aufgrund der in α -Position vorliegenden Hydroxygruppe können die Imine in 1,2-Enaminole **4** umlagern. Diese Umlagerung führt zur Amadori-Verbindung (1-Amino-1-desoxyketose) **3** (Abb. 1).

Im Folgenden werden die Zucker in ihrer offenkettigen Form dargestellt, wobei $R_2=H$ für Glucose (Monosaccharid-Vertreter) steht und $R_2=Glucose$ für Maltose (Disaccharid-Vertreter).

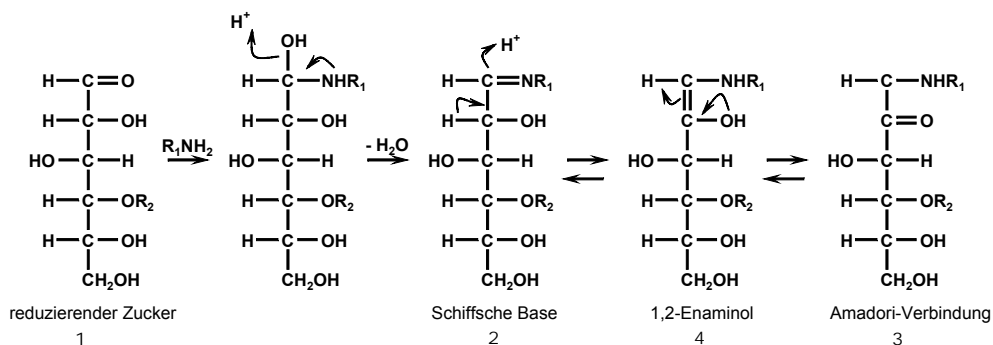


Abbildung 1: Bildung der Amadori-Verbindung aus Glucose ($R_2=H$) und Maltose ($R_2=Glucose$)

Die Amadori-Verbindung **3** ist ein partiell stabiles Zwischenprodukt und kann bereits analytisch erfasst werden. Es lässt sich in erhitzten und gelagerten Lebensmitteln nachweisen, sowie in getrocknetem Obst, in Gemüse und Milchprodukten. Auch im menschlichen Körper sind Amadori-Verbindungen zu finden, insbesondere im Blutserum bei Diabetes mellitus Patienten [1]. Ebenso wie Ketosen und Aldosen neigen auch Amadori-Verbindungen zu einer Säure-Base-katalysierten Enolisierung. Die Enolform der Amadori-Verbindung stellt eine sehr reaktive Zwischenstufe dar, die zu unterschiedlichen Folgeprodukten weiter reagieren kann. Möglich sind intramolekulare Wanderungen der Carbonylgruppe, β -Eliminierungsreaktionen oder oxidative Prozesse [6].

2.1.2 Bildung von α -Dicarbonylverbindungen

2.1.2.1 Bildung von α -Dicarbonylen mit vollständigem Kohlenstoffskelett (Desoxyosone)

Im Verlauf der Maillard-Reaktion wird die Amadori-Verbindung über Enolisierungs- und Eliminierungsreaktionen weiter umgewandelt. Zum einen führt eine Enolisierung zum 1,2-Enaminol **4**, zum anderen zum 2,3-Enaminol **5**, das jeweils ein charakteristisches α -Dicarbonyl bedingt.

3-Desoxyhexos-2-ulose (3-Desoxyglucoson) **6** wird über das 1,2-Enaminol **4** durch β -Eliminierung und Hydrolyse des Imin-Kations gebildet. Das 2,3-Enaminol **5** hat zwei verschiedene β -Eliminierungsmöglichkeiten. Durch Eliminierung der Aminosäure an Position C-1 kommt es zur Bildung der 1-Desoxyhexo-2,3-diulose (1-Desoxyglucoson) **7**. Daneben kann durch Wassereliminierung an C-4 die 1-Amino-1,4-didesoxyhexo-2,3-diulose (1-Amino-1,4-didesoxyglucoson) **8** gebildet werden. Bei diesem Reaktionsweg bleibt der Aminosäurerest an der Kohlenhydratkette gebunden (Abb. 2).

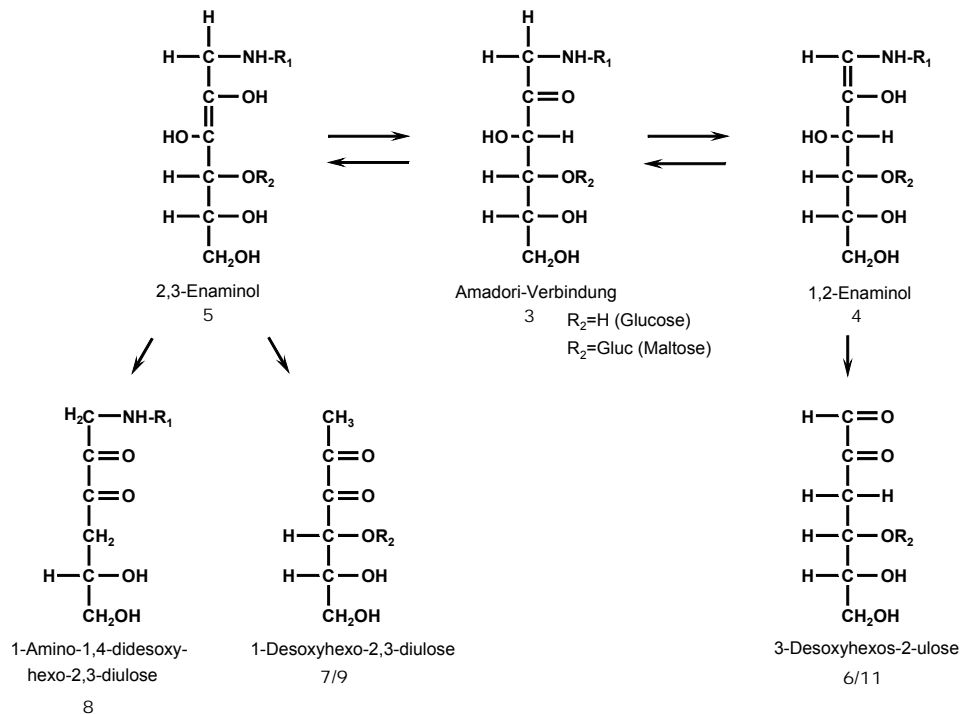


Abbildung 2: Bildung von α -Dicarbonylverbindungen aus der Amadori-Verbindung

Unter Abspaltung des Amins entsteht aus dem 2,3-Enaminol **5** das 1-Desoxy-maltoson **9** und durch Eliminierung des Glucosylrestes das 1-Amino-1,4-didesoxyhexo-2,3-diulose (N^6 -(5,6-dihydroxy-2,3-dioxo-hexyl)-lysin) **8**. Aus dem 1,2-Enaminol **4** bildet sich durch β -Eliminierung von Wasser und nachfolgender hydrolytischer Spaltung das 3-Desoxymaltoson **11**.

Die Bildung von 1-Amino-1,4-didesoxglucoson **8** wird von Huber und Ledl [7] aus Disacchariden beschrieben. Reihl et al. [8] schlagen auf Basis des 2,3-Enaminols **5** einen Bildungsweg vor, indem die glucosidische Bindung gespalten wird. Aus dem 2,3-Enaminol **5** bildet sich eine weitere Aminoverbindung, N^6 -(3,6-Didesoxyhexos-2-ulos-6-yl)-lysin (Lederer Glucoson) **12**, die erstmals von Biemel et al. [9] aus Glucose beschrieben wird. Durch Enolisierung entlang der gesamten Kohlenhydratkette und anschließender Wasserabspaltung an Position C-4 kommt es zur Bildung dieses Dicarbonyls [8]. Die Bildung der beiden Lysinderivate ist in Abbildung 3 dargestellt.

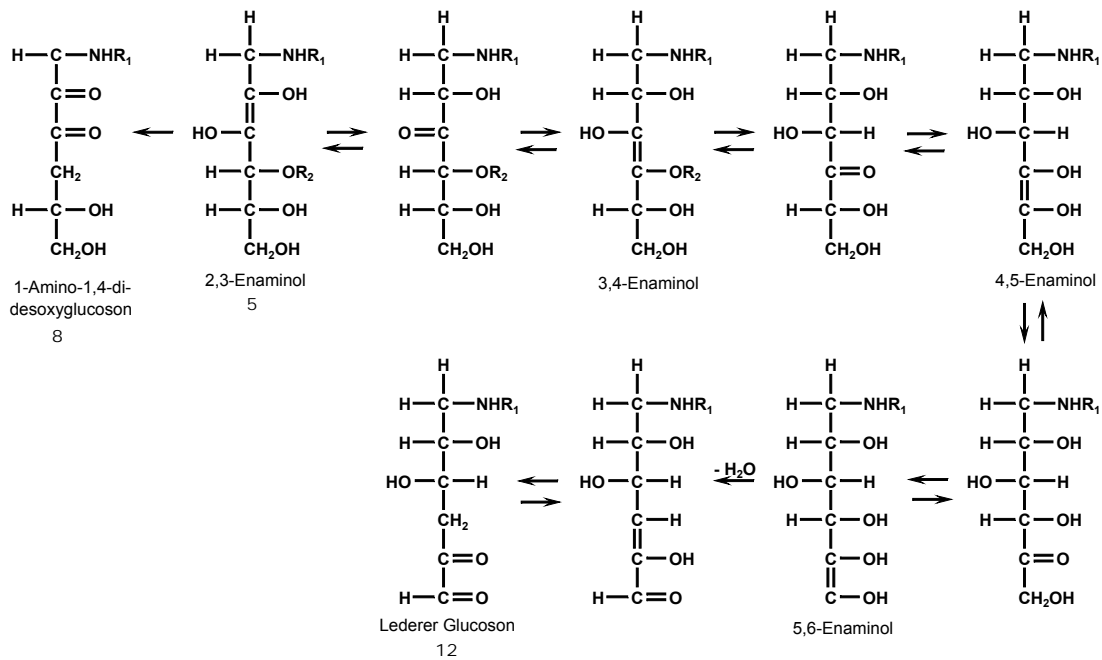


Abbildung 3: Bildungsweg der Dideoxyosone 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson und Lederer Glucoson nach Reihl et al. [8]

Eine weitere α -Dicarbonylverbindung ist die oxidativ gebildete *Arabino*-hexos-2-ulose (Glucoson) **13**. Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen wurde maßgeblich von Kawakishi et al. [10] untersucht. Der oxidative Abbau der Amadori-Verbindung stellt demnach einen Weg für die Bildung von α -Dicarbonylen dar, der in Konkurrenz zu den 1,2- und 2,3-Enolisierungsreaktionen steht. Liedke [11] schlägt auf Basis der Amadori-Verbindung einen radikalisch-oxidativen Bildungsweg vor (Abb. 4). Die oxidativ beeinflusste Bildung des Glucoson wurde durch Barth [12] und durch eigene Untersuchungen (vgl. 4.1.3.1 und 4.1.3.2) bestätigt.

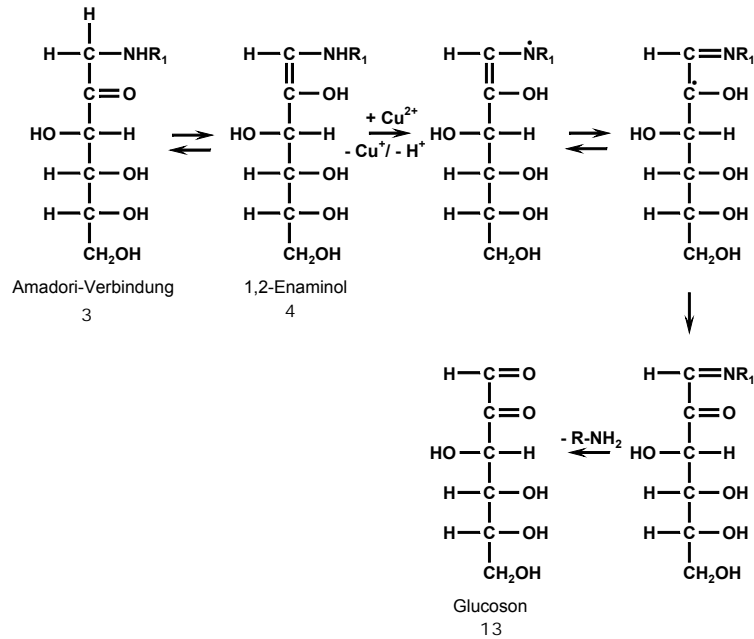


Abbildung 4: Oxidative Bildung von Glucoson aus der Amadori-Verbindung nach Liedke [11]

Hollnagel und Kroh [13] beschreiben die Bildung von 1,4-Didesoxyglucoson **14** als Intermediat der Umsetzung von Disacchariden mit Aminosäuren. Ausgehend vom 2,3-Enaminol **5** wird durch eine β -Eliminierung des Amins am C-1-Atom das 1,2-Endiol gebildet, welche im Reaktionsansatz zu dem 2,3-Endiol reduziert wird. Dieses 2,3-Endiol reagiert über eine β -Eliminierung des Glucosylrestes am C-4-Atom, verbunden mit einer keto-enol-tautomeren Umlagerung, zum 1,4-Didesoxyglucoson (Abb. 5).

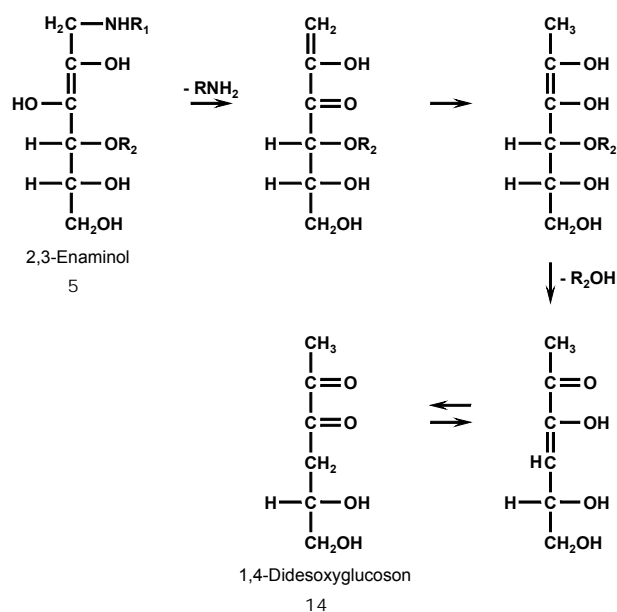


Abbildung 5: Bildung des 1,4-Dideoxyglucoson nach Hollnagel und Kroh [13]

Ein weiteres Intermediat des Zuckerabbaus ist die 4-Desoxy-2,3-glucodiulose (4-Desoxyglucoson) **15**. Morita et al. [14] beschreiben die Bildung dieser α -Dicarbonylverbindung ausgehend von einer Hexose über das 2,3-Endiol **5**. Im Reaktionsverlauf kommt es zu einer β -Eliminierung aus dem ein 3,4-Endiol hervorgeht, welches im nachfolgenden Schritt keto-enol-tautomer umlagert (Abb. 6).

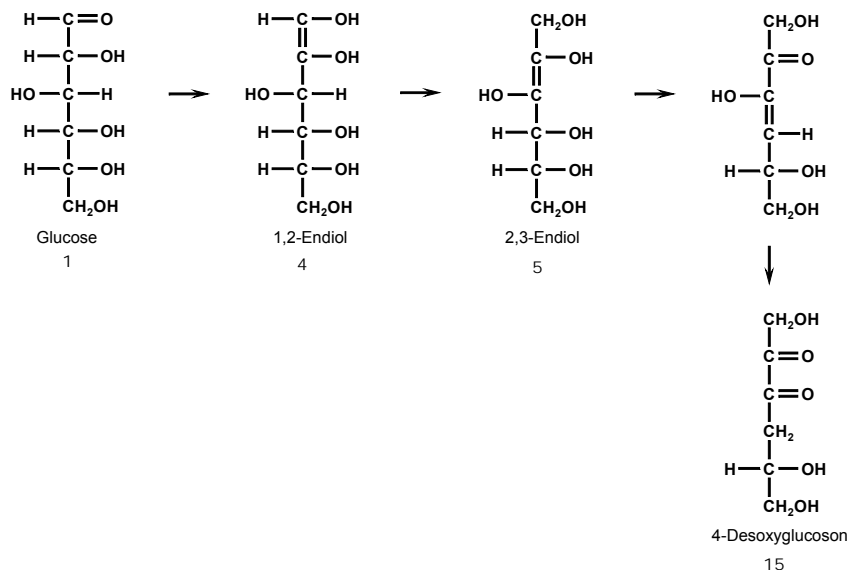


Abbildung 6: Bildungsweg von 4-Desoxyglucoson aus Glucose nach Morita et al. [14]

2.1.2.2 Folgeprodukte der Desoxyosone

Aufgrund ihrer großen Reaktivität stellen Desoxyosone Ausgangsprodukte für eine Vielzahl an Verbindungen dar. Sie können im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion durch Enolisierung, Cyclisierung, Eliminierung, Fragmentierung und Retro-Aldol-Spaltung umgewandelt und abgebaut werden. Aus diesen Reaktionen entstehen Fragmente (C-2-C-5), die im Folgenden dargestellt werden.

Die Bildung von Pentosen wird von Nedvidek et al. [15], Usui et al. [16], Hollnagel und Kroh [17], Mavric und Henle [18], Grandhee und Monnier [19], Rizzi [20] und Hauck et al. [21] beschrieben.

In der Literatur wird die Bildung von 3-Desoxypentosen **16** aus Mono- und Disacchariden beschrieben. Aus Glucose wird ein Bildungsweg von Usui et al. [16] vorgeschlagen, in dem durch hydrolytische α -Dicarbonylspaltung aus dem Glucoson das 3-Desoxypentosen **16** gebildet wird. Die Bildung aus Disacchariden erfolgt ausgehend vom 2,3-Enaminol. Über eine β -Eliminierung wird der Glucosyl-

rest abgespalten. Das entstandene 1-Amino-1,4-dideoxyglucoson wird keto-enol-tautomer umgelagert. Nach anschließender hydrolytischer β -Dicarbonylspaltung und Freiwerden von Ameisensäure entsteht ein Pentose-1,2-endiol, welches zum 3-Desoxypentosen **16** oxidiert [17].

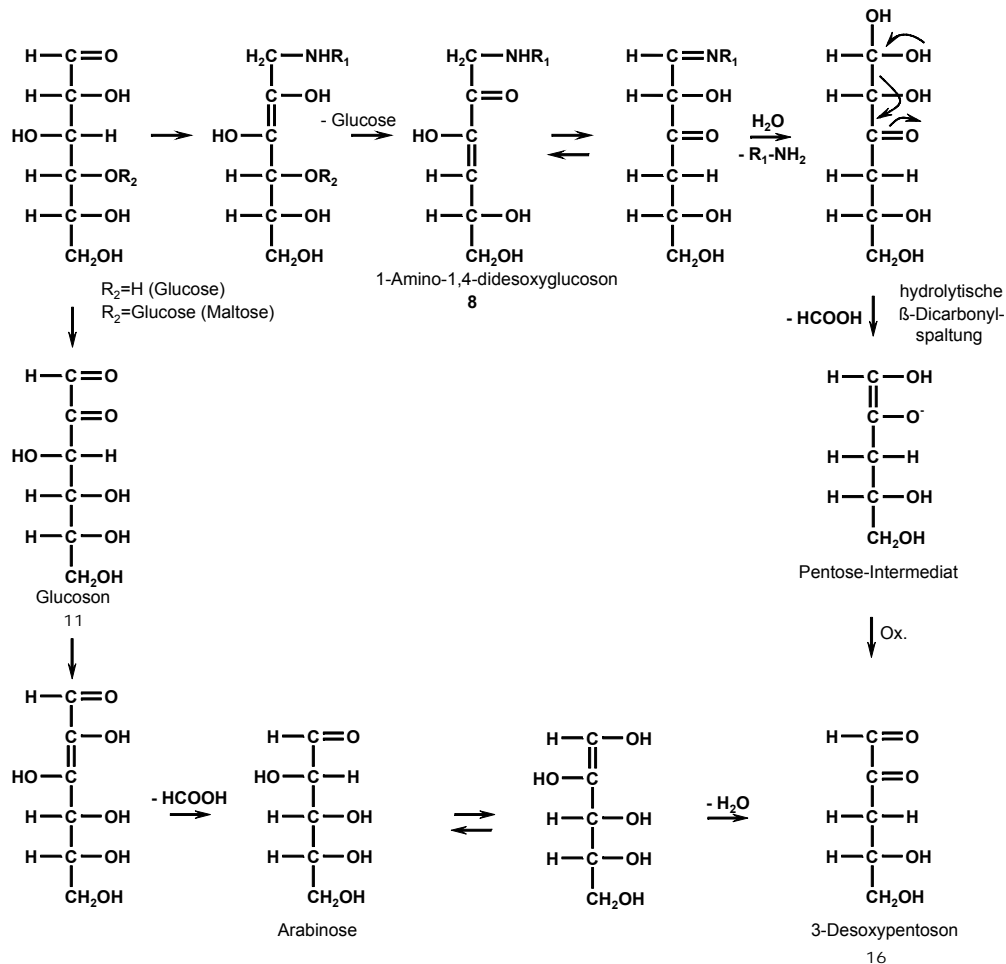


Abbildung 7: Bildung von 3-Desoxypentosen aus Glucose nach Usui et al. [16] und aus Maltose nach Hollnagel und Kroh [17]

Mavric und Henle [18] identifizieren das 3-Desoxypentosen-Chinoxalin in Inkubationen mit Lactose. Grandhee und Monnier [19] schlagen einen Mechanismus für die Bildung von 3-Desoxypentosen aus Ribose vor.

3,4-Dideoxypentosen **17** wird als ein spezifisches Spaltungsprodukt aus Lactose gebildet. Mavric und Henle [18] beschreiben die Bildung ausgehend von Lactose. Über eine 1,2-Enolisierung entsteht die Lactulose, wobei sich anschließend ein 2,3-Endiol bildet. Nach Eliminierung der Galactose an Position vier der Kohlenstoffkette wird das 4-Desoxyglucoson **15** gebildet, welches im nachfolgenden Schritt über Enolisierung und hydrolytischer β -Dicarbonylspaltung zum Pentose-

Intermediat umgewandelt wird. Das Pentose-Intermediat (1,2-Endiol der 3-Desoxy-pentulose) wird nachfolgend zum 3-Desoxy-pentose **16** oxidiert. Durch Eliminierung von Wasser und Keto-Enol-Tautomerisierung bildet sich aus der 3-Desoxy-pentulose das 3,4-Didesoxy-pentose **17** (Abb. 8).

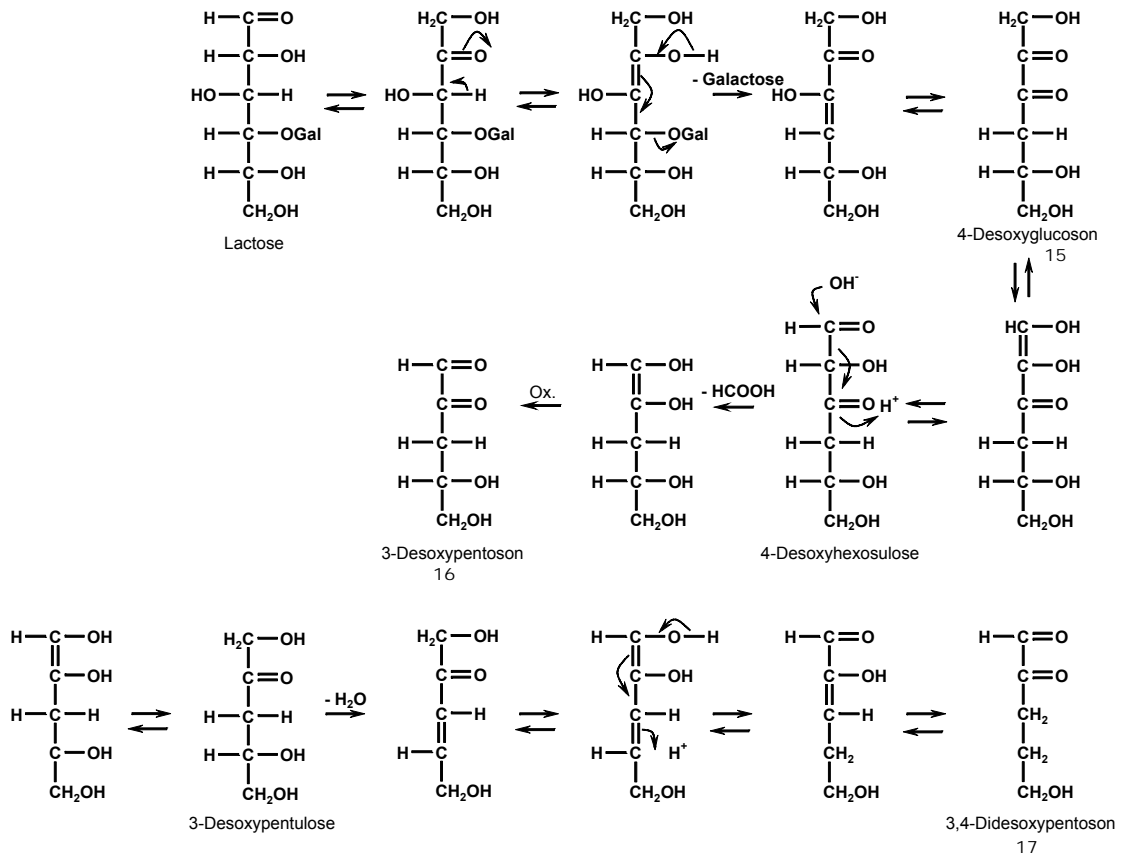


Abbildung 8: Bildung von 3,4-Dideoxypentose nach Mavric und Henle [18]

Durch katalytischen Abbau von Ribose bildet sich das 1-Desoxy-pentosen **18** [20]. Hauck et al. [21] postulieren einen Bildungsweg nach Inkubationen mit Ribulose-5-phosphat.

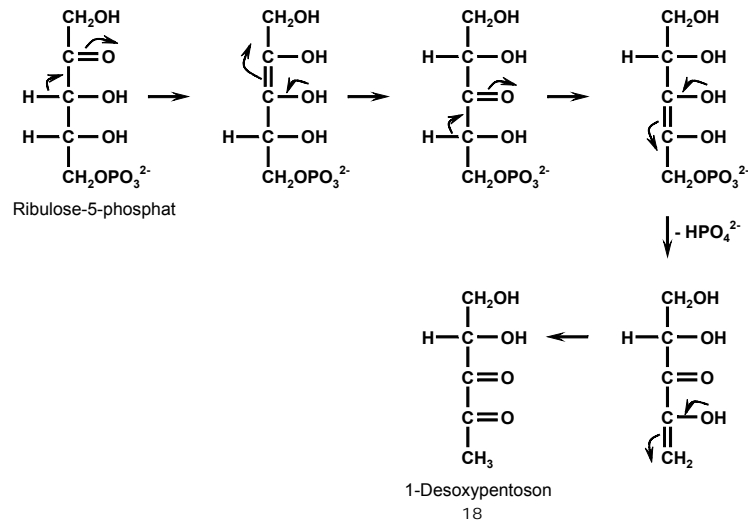


Abbildung 9: Bildungsweg von 1-Desoxy-pentosen nach Hauck et al. [21]

α -Dicarbonylverbindungen mit vier Kohlenstoffatomen werden von Nedvidek et al. [15], Usui et al. [16], Nishikawa et al. [22], Yaylayan und Keyhani [23], Davidek et al. [24] und Voigt und Glomb [25] beschrieben. Threoson **19** wird als Hauptabbau-produkt in Inkubationen mit Dehydroascorbinsäure von Nishikawa et al. [22] identifiziert (Abb. 10).

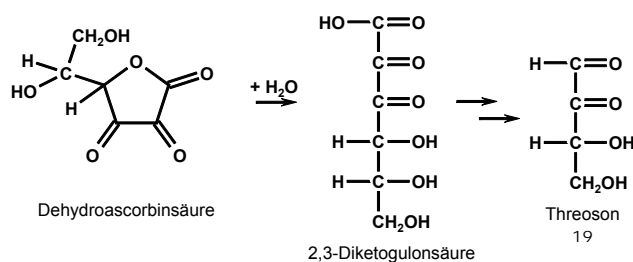


Abbildung 10: Bildung von Threoson aus Dehydroascorbinsäure nach Nishikawa et al. [22]

Usui et al. [16] beschreiben die Bildung von Threoson **19** über Glucoson in Glucoseinkubationen. Ein oxidativer Mechanismus ausgehend von 1-Desoxyglucoson wird von Voigt und Glomb [25] vorgeschlagen. 3-Desoxyglucoson **6**, Glucoson **13** und 3-Desoxypentosen **16** werden als Vorstufen bei der Bildung von 3-Desoxy-threoson **20** beschrieben [16] (Abb. 11).

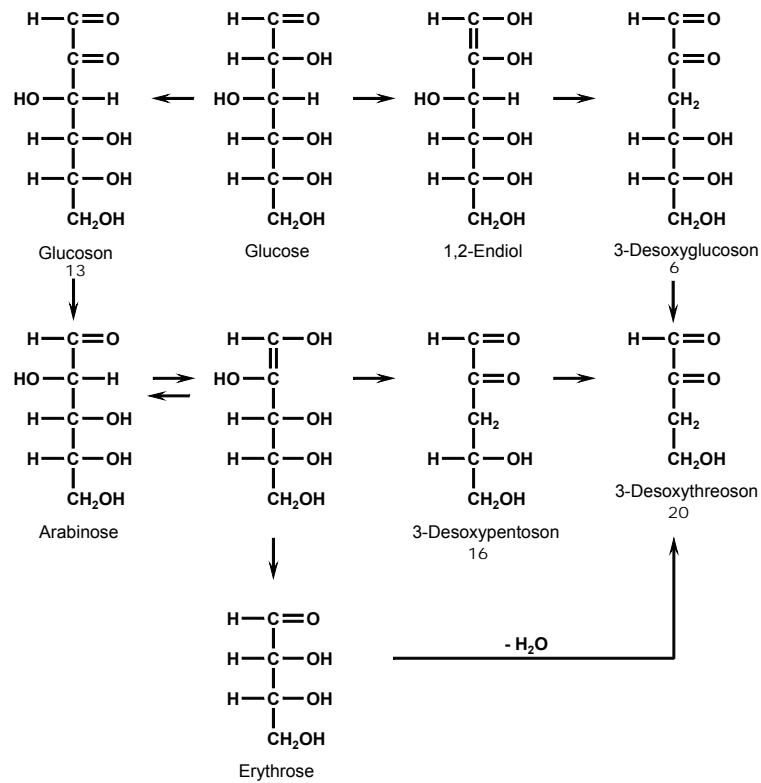


Abbildung 11: Bildung von 3-Desoxythreoson aus Glucoson, 3-Desoxyglucoson und 3-Desoxypentose nach Usui et al. [16]

Durch Aldolreaktion bildet sich aus 1,3-Dihydroxyaceton und Formaldehyd das 1-Desoxythreoson [23]. Davidek et al. [24] identifizieren das Chinoxalin von 1-Desoxythreoson **21** in Glucose/Glycin Inkubationen als Produkt aus 1-Desoxyglucoson. Voigt und Glomb [25] beschreiben die Bildung aus 1-Desoxyglucoson nach Abspaltung von Essigsäure (Abb. 12).

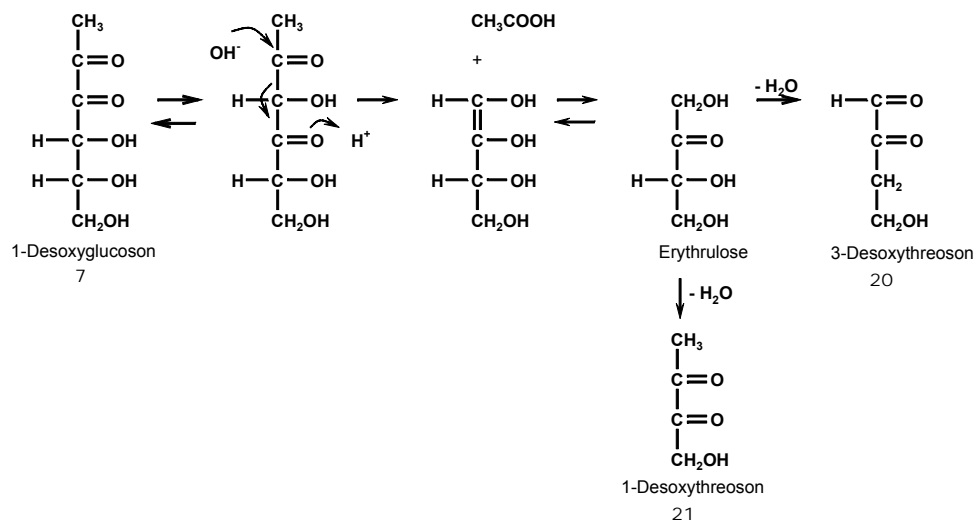


Abbildung 12: Bildung von 1-Desoxythreoson nach Davidek et al. [24] und Voigt und Glomb [25]

Methylglyoxal **22** und Glyoxal **23** sind die kleinsten α -Dicarbonylverbindungen, deren Bildung Bestandteil vieler Forschungsergebnisse ist. Hollnagel und Kroh [26] schlagen einen Bildungsweg für Methylglyoxal **22** vor, der die Spaltung von 1-Desoxyglucoson **7** in Position C₃-C₄ beinhaltet. Weenen [27] schlägt 3-Desoxyglucoson **6** als Vorstufe für die Bildung von Methylglyoxal vor, was von Yaylayan und Keyhani [28] bestätigt wird. Durch Bildung von 2,3-Enol aus Glucose **1** und anschließender Retro-Aldol-Kondensation wird ein Bildungsweg von Thornalley et al. [29] beschrieben (Abb. 13).

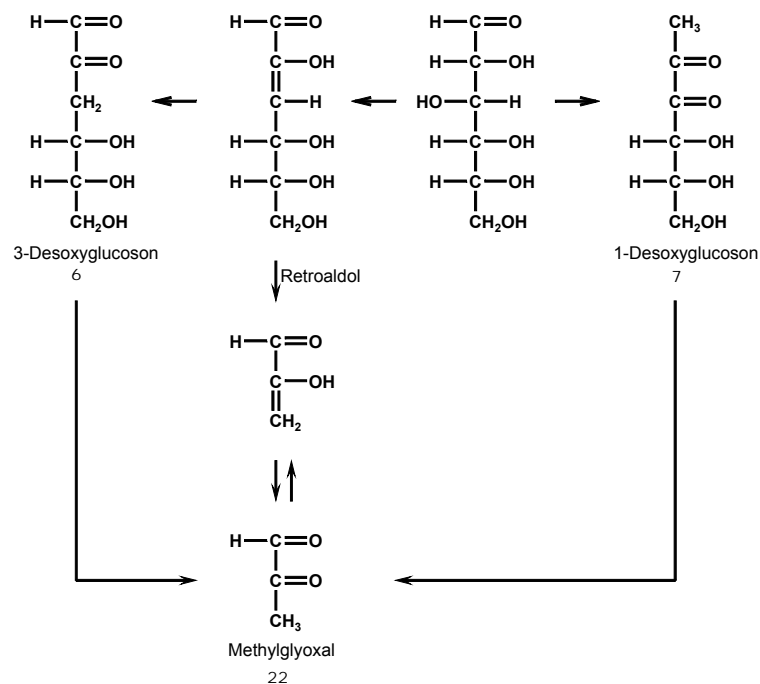


Abbildung 13: Bildung von Methylglyoxal nach Hollnagel und Kroh [26], Yaylayan und Keyhani [28] und Thornalley et al. [29]

Die Bildung von Glyoxal **23** wird über eine Retro-Aldol-Spaltung direkt aus der Glucose **1** von Thornalley et al. [29] beschrieben. Wells-Knecht et al. [30] identifizierten Glyoxal **23** als Intermediat bei der Autoxidation von Glucose. Hofmann et al. [31] verifizierten Glucoson **13** als Vorstufe für die oxidative Bildung von Glyoxal. Yaylayan und Keyhani [28] schlagen einen Mechanismus ausgehend von Glucose **1** vor, der auf Abspaltung von zwei Molekülen Wasser und anschließender Retro-Aldol-Spaltung basiert. Ein weiterer Bildungsweg wird von Hayashi und Namiki [32] vorgeschlagen. Die Bildung von Glyoxal **23** basiert auf Retro-Aldol-Spaltung der Schiffsbasis, gefolgt von Oxidation des Glycolaldehyd-Imin. Usui et al. [16] beschreiben die Bildung aus 3-Desoxyglucoson **6**, 3-Desoxypentose **16** und Glycolaldehyd (Abb. 14).

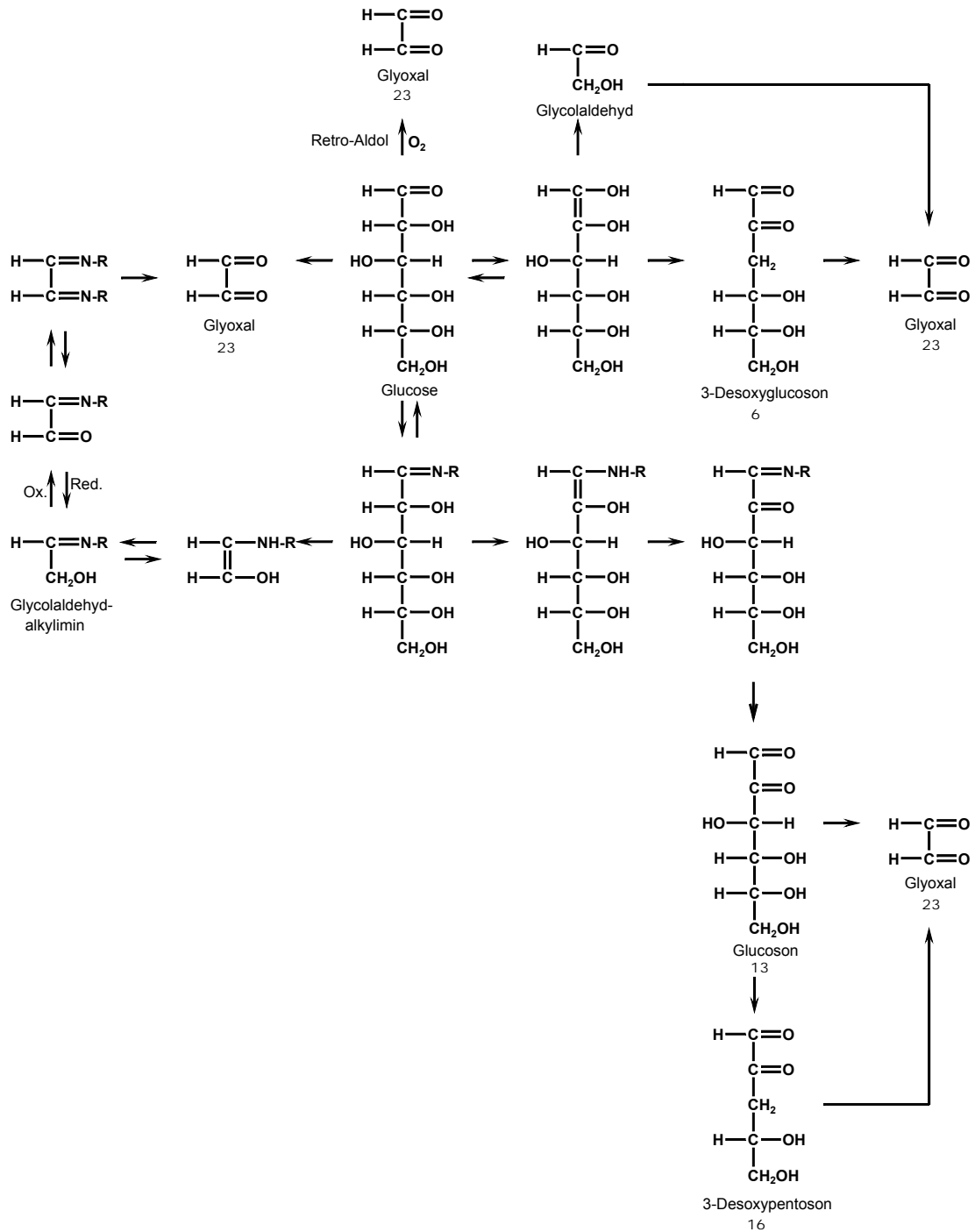


Abbildung 14: Bildungswege für Glyoxal nach Thornalley et al. [29], Wells-Knecht et al. [30], Hofmann et al. [31], Hayashi und Namiki [32] und Usui et al. [16]

2.2 Nachweis und Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen

α -Dicarbonyle sind hochreaktive Verbindungen, die analytisch nur schwer erfassbar sind. Um qualitative als auch quantitative Aussagen über die im Reaktionsverlauf gebildeten α -Dicarbonylverbindungen treffen zu können, muss auf indirekte Nachweisverfahren zurückgegriffen werden. Zum einen geben charakteristische Folgeprodukte Aufschluss über die vorhandenen α -Dicarbonyle, zum anderen können diese reaktiven Verbindungen in stabile detektierbare Derivate überführt werden. Verwendungen finden hierbei die Abfangreagenzien *o*-Phenylendiamin (OPD), Aminoguanidin, Cysteamin, *O*-Methylhydroxylamin und Girard-T. Zur Analytik von α -Dicarbonylverbindungen wird von Glomb und Tschirnich [33] eine Auswahl an Abfangreagenzien beschrieben (Abb. 15).

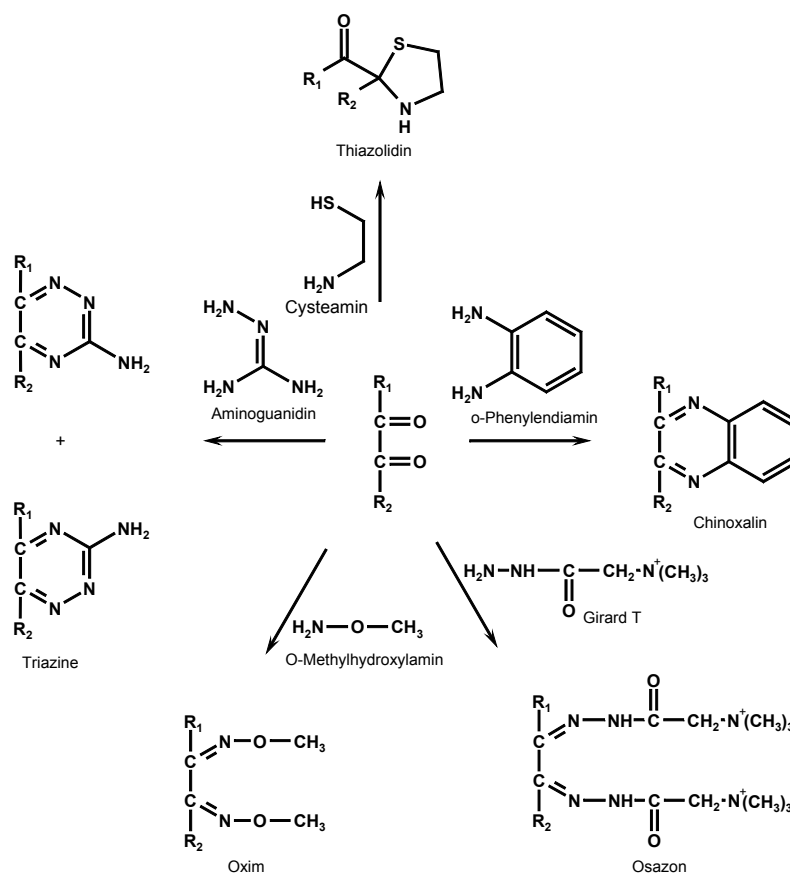


Abbildung 15: Übersicht über Abfangreagenzien für α -Dicarbonylverbindungen nach Glomb und Tschirnich [33]

Aminoguanidin ist ein langsam reagierendes Abfangreagenz und eignet sich für die hochreaktiven Dicarbonylverbindungen nur bedingt. Zudem werden in der Reaktion mit Aminoguanidin zwei isomere Triazinprodukte gebildet, die eine

Quantifizierung erschweren. Im Vergleich zu den Chinoxalinen sind die Triazinderivate wesentlich instabiler. OPD ergibt aufgrund seiner Symmetrie mit dem Dicarboxyl genau ein Reaktionsprodukt. Ein weiterer Nachteil von Aminoguanidin ist die Hemmung der Retro-Aldol-Fragmentierung, was zu einer niedrigeren Ausbeute und Vielfalt an α -Dicarboxyl-Spaltprodukten führt [33].

In der Literatur wurde OPD erstmals von Morita et al. [34] als Abfangreagenz beschrieben. Hierbei reagiert die α -Dicarboxylverbindung äquimolar infolge einer Kondensationsreaktion mit dem Abfangreagenz zu einem stabilen, analytisch gut erfassbaren Chinoxalinderivat. Während der Maillard-Reaktion herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Bildung und den Folgereaktionen von α -Dicarboxylen. Daraus ergeben sich zwei grundlegende Anwendungen der Abfangreaktion zur Bestimmung der α -Dicarboxylkonzentration. Wird OPD zu Beginn einer Inkubation zugesetzt, werden ständig alle gebildeten Dicarboxylverbindungen abgefangen. Diese Anwendung weist Nachteile auf. So besteht die Möglichkeit, dass OPD mit seinen Stickstoffgruppen selbst in die Reaktion eingreift und somit zu erhöhten oder falsch positiven Ergebnissen führt [33]. Die zweite Methode zum Einsatz der OPD Abfangreaktion ist die Zugabe von OPD nach einer festgelegten Reaktionszeit der α -Dicarboxylverbindung. Mit dieser Methode kann zwar die Gesamtmenge an gebildeten α -Dicarboxylen nicht bestimmt werden, aber eine Aussage über den zeitlichen Konzentrationsverlauf ist möglich. Auch mit dieser Methodik besteht die Gefahr einer Aminkatalyse, bei der Bildung der Dicarboxylverbindungen, jedoch wird die Abfangreaktion bei Raumtemperatur und kurzen Kontaktzeiten durchgeführt, so dass Ergebnisverfälschungen minimiert werden.

Oxime, Osazone und Thiazolidine sind nicht bzw. nur schwach UV-aktiv und eignen sich daher nur bedingt für die Quantifizierung von α -Dicarboxylverbindungen. Aufgrund der guten analytischen Trennmöglichkeiten und der erheblichen Nachteile anderer Abfangreagenzien wird die Reaktion mit OPD in dieser Arbeit als Methode der Wahl angewendet. Die Identifizierung und Quantifizierung der Chinoxaline erfolgt bei einer Wellenlänge von 320 nm.

In der vorliegenden Arbeit wurden die α -Dicarboxylchinoxaline mittels HPLC-UV identifiziert und quantifiziert. Für die Strukturaufklärung der Chinoxaline wurde die GC/MS, NMR und HR/MS eingesetzt.

2.3 Isolierung von α -Dicarbonylchinoxalinen mittels Multilayer Counter-current Chromatographie (MLCCC)

Die MLCCC ist eine Form der Flüssig-Flüssig-Chromatographie, bei der ein komplexes Substanzgemisch durch Verteilung zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen in Fraktionen unterschiedlicher Polarität aufgetrennt wird. In Abbildung 16 ist der instrumentelle Aufbau einer MLCCC dargestellt.

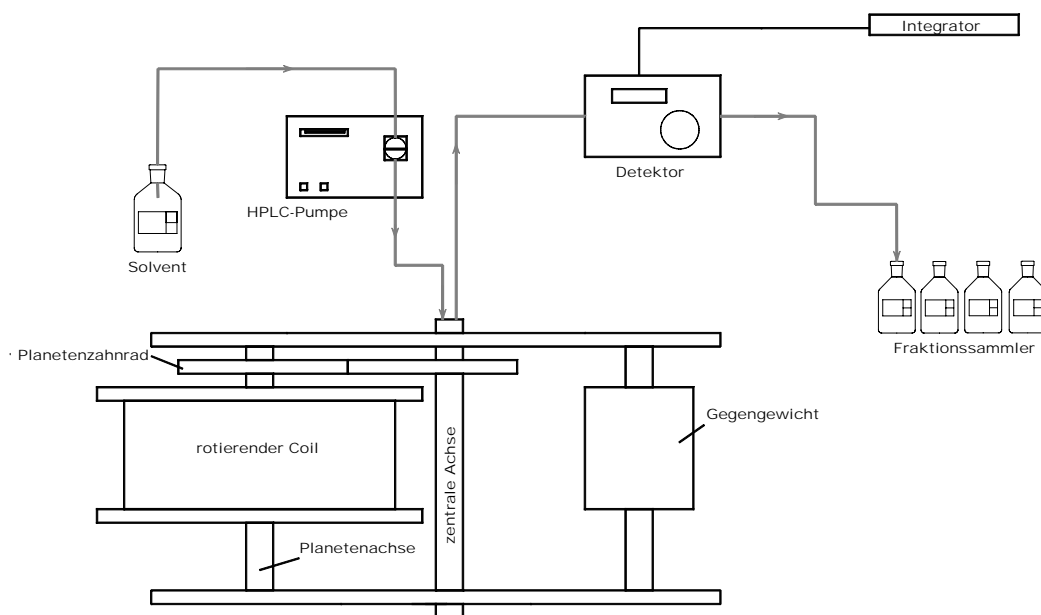


Abbildung 16: Aufbau einer MLCCC-Anlage

Das Kernstück der MLCCC ist ein um eine Spule gewickelter Teflonschlauch (Coil). Diese Spule dreht sich mit 800 U/min zum einen um ihre eigene Achse und zum anderen um eine Zentralachse, an der ein entsprechendes Gegenstück befestigt ist. Durch diesen Aufbau ist eine planetenartige Rotation gewährleistet. Im Coil befinden sich zwei nicht miteinander mischbare Phasen, wobei die eine Flüssigkeit als stationäre Phase im System bleibt und die andere als mobile Phase durch das System geleitet wird. Zu Beginn einer MLCCC wird die Säule im Stillstand mit stationärer Phase gefüllt, anschließend in Rotation versetzt und gleichzeitig die mobile Phase durch das System gepumpt. Sobald die mobile Phase den Säulenausgang erreicht, kann die Probenaufgabe erfolgen. Im Gegensatz zur Feststoff-Flüssig Chromatographie, wo es an der festen Phase zu irreversiblen Adsorptionen kommt, bietet die Flüssig-Flüssig-Chromatographie den großen Vorteil, dass das Probenmaterial nach Entfernen des Lösungsmittels

vollständig wieder gewonnen werden kann. Im Unterschied zu anderen flüssig-flüssig-chromatographischen Techniken weist die MLCCC durch ihre planetenartige Rotation eine Besonderheit auf. Durch die Addition der Zentrifugalkräfte herrschen in den äußeren Bereichen der Planetenbahn hohe Gravitationskräfte, während sich die Kräfte in den zentralen Bereichen aufheben. Dadurch findet im Zentrum eine Durchmischung der Phasen statt. In den äußeren Bereichen hingegen trennen sich die Phasen aufgrund des hohen Gravitationsfeldes wieder. Durch diese permanenten Verteilungsvorgänge findet eine Trennung der Substanzen nach ihrem Verteilungskoeffizienten statt. Bei der Wahl von Essigsäureethylester als stationäre Phase und Wasser als mobile Phase eluieren die polaren Substanzen vor den weniger polaren. Je nach Polarität erreichen die Chinoxaline zu unterschiedlichen Zeitpunkten den Detektor und können entsprechend fraktioniert werden.

2.4 Wichtige Reaktionen der α -Dicarbonyle

2.4.1 Strecker Abbau

Eine wichtige Reaktion zwischen α -Dicarbonylverbindungen und Aminosäuren ist der Strecker Abbau. Die Aminosäure reagiert mit einer Carbonylgruppe des Dicarbonyls zur Schiffschenschen Base. Durch die zweite Carbonylgruppe wird ein Elektronenzug hervorgerufen, der eine Verschiebung der Doppelbindung bewirkt. Dabei wird Kohlendioxid (CO_2) aus dem Molekül abgespalten. Eine hydrolytische Spaltung der C-N-Doppelbindung setzt aus dem Molekül den sogenannten Strecker-Aldehyd frei und hinterlässt an der ehemaligen Dicarbonylfunktion eine Enaminolfunktion (Abb. 17). Der Strecker-Aldehyd leistet einen besonderen Beitrag zur Aromabildung in der Maillard-Reaktion. Zudem können über die Strecker-Reaktion organische Säuren und Verbindungen mit Redukton-Struktur gebildet werden, die durch ihre antioxidativen Eigenschaften zur Stabilität von Lebensmitteln beitragen. Neben den Aldehyden werden auch Pyrrazine gebildet.

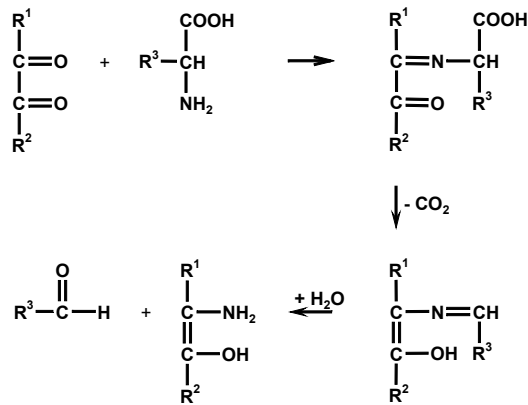


Abbildung 17: Strecker-Abbau

2.4.2 Weiterführende Reaktionen unter Beteiligung von α -Dicarbonylstrukturen

Wichtige Folgereaktionen der α -Dicarbonylverbindungen mit intaktem Kohlenstoffskelett sind die Retro-Aldol-, α -Dicarbonyl- und β -Dicarbonyl-Spaltung. Durch diese unspezifischen Reaktionen entsteht eine Vielzahl unterschiedlicher C-2-C-5-Spaltprodukte, die z.T. ebenfalls über α -Dicarbonylstrukturen verfügen. Diese Spaltprodukte können daher weiter zu einer Vielzahl von Folgestrukturen abgebaut werden.

2.4.2.1 Retro-Aldol-Spaltung

Zucker und viele Maillard-Zwischenprodukte, wie Desoxyaldoketosen oder Desoxydiketosen, sind geeignete Verbindungen für Retro-Aldol-Spaltungen. Dabei kommt es in großem Umfang zur Bildung von C-2- bis C-5-Fragmenten, die bereits in der frühen Phase der Maillard-Reaktion nachweisbar sind. Dabei sind die kurzkettigen Verbindungen im Allgemeinen wesentlich reaktiver als native Zucker oder Desoxyhexosulosen. Sie gehen daher leicht Folgereaktionen wie Aldol-Kondensations-, Oxidations- und/oder Dehydratisierungsreaktionen ein. Die entsprechenden Kondensationsprodukte sind maßgeblich für die Bräunung der Maillard-Reaktionsprodukte verantwortlich. Die Bräunungsintensität korreliert mit der Menge an gebildeten Spaltprodukten; das Bräunungspotenzial der kurzkettigen Fragmente liegt um ein Vielfaches höher als das der Zuckerabbau-produkte mit intaktem Kohlenstoffskelett [35-37].

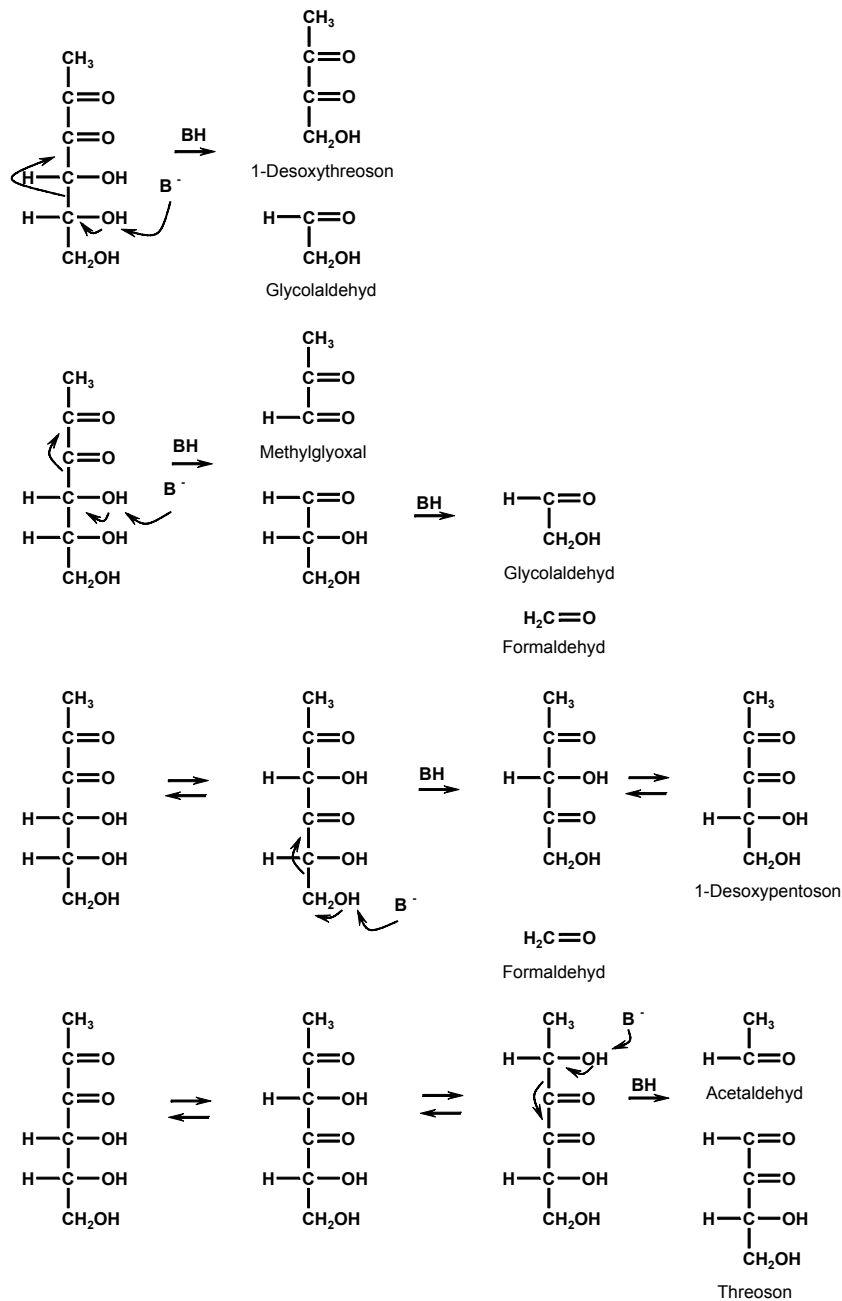


Abbildung 18: Theoretisch mögliche Retro-Aldol-Spaltungen von 1-Desoxyglucoson [38]

2.4.2.2 α -Dicarbonyl-Spaltung

2.4.2.2.1 Hydrolytische α -Dicarbonyl-Spaltung

Bei der hydrolytischen α -Dicarbonylspaltung handelt es sich um eine Diproporionierungsreaktion, bei der aus der Diketoverbindung eine Carbonsäure und ein Aldehyd entstehen (Abb. 19).

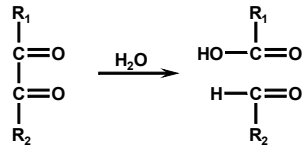


Abbildung 19: Allgemein postulierte α -Dicarbonylspaltung

Am Beispiel von 1-Desoxyglucoson wird die hydrolytische α -Dicarbonylspaltung in Abbildung 20 dargestellt.

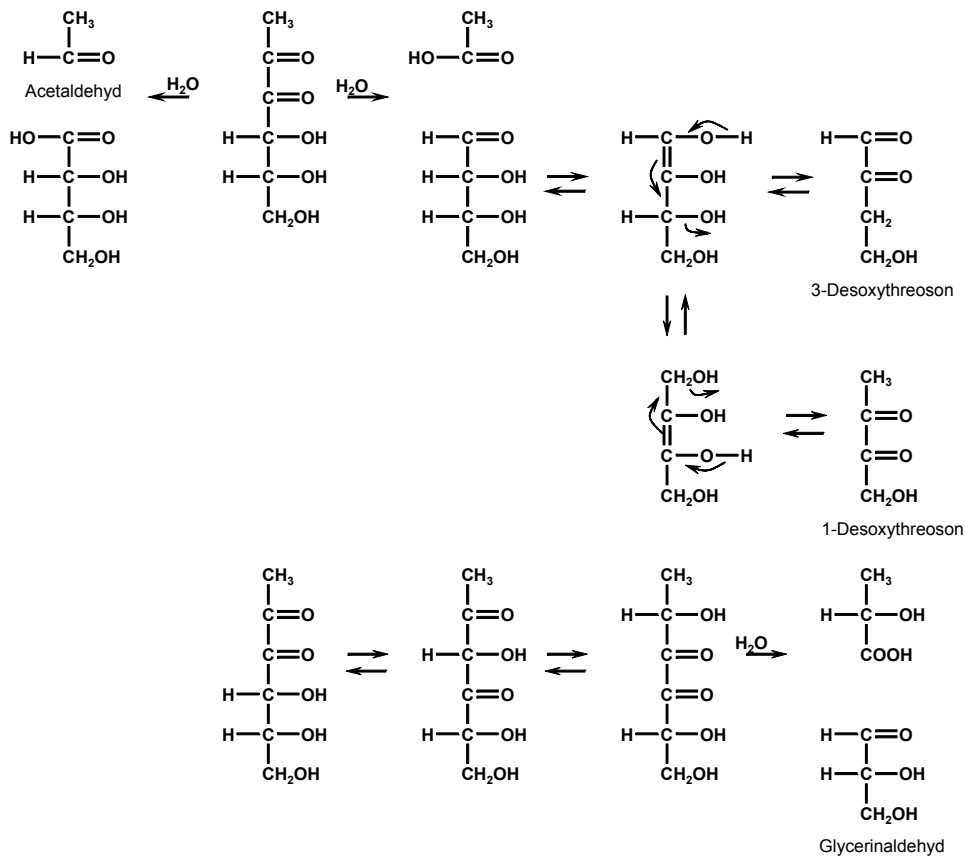


Abbildung 20: Theoretisch mögliche hydrolytische α -Dicarbonylspaltung von 1-Desoxyglucoson [38]

2.4.2.2 Oxidative α -Dicarbonyl-Spaltung

Davidek et al. [39] führte Versuche durch, die bewiesen, dass die hydrolytische α -Dicarbonylspaltung nicht existent ist. Am Beispiel von 1-Desoxyglucoson wird die oxidative α -Dicarbonylspaltung in Abbildung 21 dargestellt.

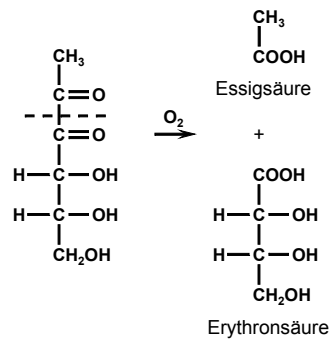


Abbildung 21: Oxidative α -Dicarbonylspaltung nach Davidek et al. [39]

2.4.2.3 β -Dicarbonyl-Spaltung

Bei dieser Reaktion erfolgt der nucleophile Angriff eines Hydroxylions an eine β -Dicarbonylbindung. Dabei fragmentiert das intermediär gebildete Hydrat zu einer Carbonsäure und einem Keton. Nach Enolisierung und Tautomerisierung entsteht als Dicarbonylverbindung eine Reihe von C-2- bis C-4-Fragmenten (Abb. 22).

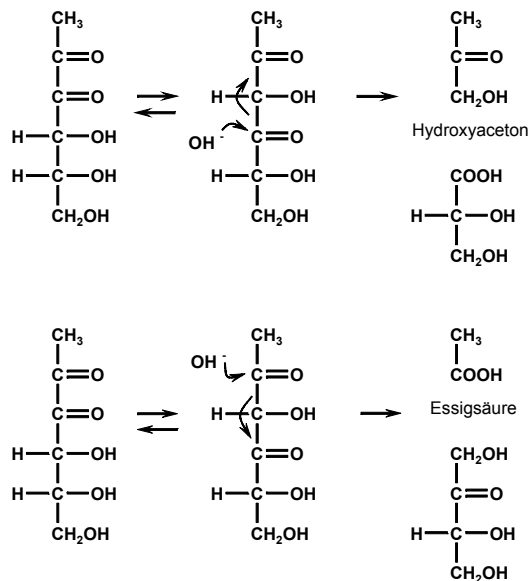


Abbildung 22: β -Dicarbonylspaltung von 1-Desoxyglucoson [38]

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die Maillard-Reaktion ist eine sehr komplex ablaufende Reaktionsfolge, in deren Verlauf es in Lebensmitteln zur Bildung von Aroma- und Geschmacksstoffen sowie Bräunungsprodukten kommt. Es sind überwiegend die stabilen Umsetzungsprodukte bekannt. Reaktive Substanzen dagegen liegen in den Umsetzungsgemischen meist nicht oder nur in sehr geringen Mengen vor und reagieren während der Isolierung bereits weiter. Eine solche reaktive Verbindungsklasse sind die α -Dicarbonyle. α -Dicarbonylverbindungen sind von großer Bedeutung bei der Herstellung, Lagerung und Verarbeitung von Lebensmitteln. Sie sind verantwortlich sowohl für die Farbgebung als auch für die Aromabildung.

Ziele dieser Arbeit sind, grundlegende Erkenntnisse dieser reaktiven Verbindungsklasse in der Maillard-Reaktion zu erlangen. Hierzu steht die Aufklärung der Bildungswege der α -Dicarbonylverbindungen im Vordergrund. Es wurden qualitative und quantitative Aussagen über die Bildung von α -Dicarbonylen in Inkubationen von Mono- und Disacchariden mit Lysin erarbeitet. Stellvertretend wurde Glucose als Monosaccharid und Maltose und Lactose als Disaccharide für die Inkubationen eingesetzt. Der Nachweis der α -Dicarbonyle erfolgte in Form ihrer Chinoxaline mittels HPLC-UV.

Die für die Qualifizierung und Quantifizierung benötigten Standards wurden mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) aus Glucose/Lysin/OPD und Maltose/Lysin/OPD Umsetzungen isoliert. Die Identifizierung der isolierten Standards erfolgte mittels GC/MS, NMR und hochauflösender Massenspektrometrie. Ein Teil der authentischen Standards wurde selbst hergestellt.

Erstmals wurde begonnen 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson zu synthetisieren. 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson ist eine bedeutende α -Dicarbonylstruktur beim Abbau von lebensmittelrelevanten Disacchariden. Aussagen über Reaktivität und damit zur Bedeutung von 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson beim Abbau von Disacchariden lassen sich erst nach der Synthese der authentischen Referenz machen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Qualitative und quantitative Untersuchungen von α -Dicarbonylchinoxalinen aus Glucose

Für erste Untersuchungen zur Maillard-Reaktion von Glucose wurden Glucose-Modelllösungen in Gegenwart von Lysin bei 50 °C inkubiert. Die gebildeten α -Dicarbonyle wurden durch Zugabe von *o*-Phenylendiamin (OPD) in Form ihrer Chinoxaline mit HPLC-UV bei 320 nm detektiert. Es wurde die Bildung von α -Dicarbonylverbindungen in An- und Abwesenheit von Sauerstoff untersucht. Die für die Qualifizierung und Quantifizierung benötigten Standardsubstanzen wurden erstmals mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) isoliert.

4.1.1 Isolierung von α -Dicarbonylchinoxalinen aus Glucose

Das Elutionsverhalten der detektierten Chinoxaline (Q) in Abbildung 23 zeigt ihre Polarität an. Sehr polare Substanzen eluieren schnell von der Säule und fanden sich somit im vorderen Bereich des HPLC Chromatogrammes wieder. Die unpolaren Substanzen blieben länger auf der Säule und wiesen dementsprechend höhere Retentionszeiten auf.

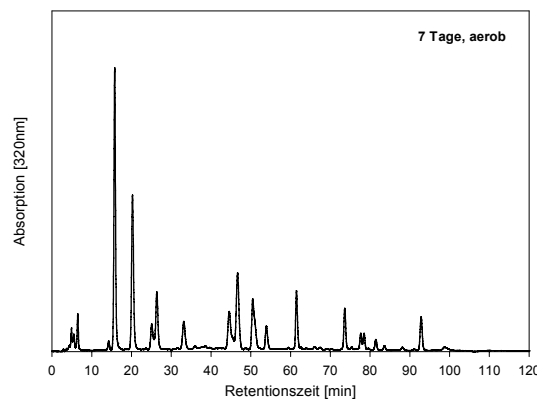


Abbildung 23: HPLC Chromatogramm Inkubation Glucose

Um eine möglichst gute Auftrennung der Substanzen mittels MLCCC zu erreichen, wurden die Inkubationsansätze mit Essigsäureethylester (Ethylacetat) extrahiert. Dies bewirkte, dass sich die polaren Substanzen in der wässrigen Phase und die unpolaren Substanzen in der organischen Phase anreicherten. Für die Isolierung

der Chinoxalinstandards wurden die Ethylacetat Phase (Abb. 24) als auch die wässrige Phase (Abb. 24) auf die MLCCC gegeben. Für die Isolierung größerer Mengen war die Ethylacetat Phase besser geeignet. Daher erfolgte die Isolierung der Standards bevorzugt aus dieser Phase.

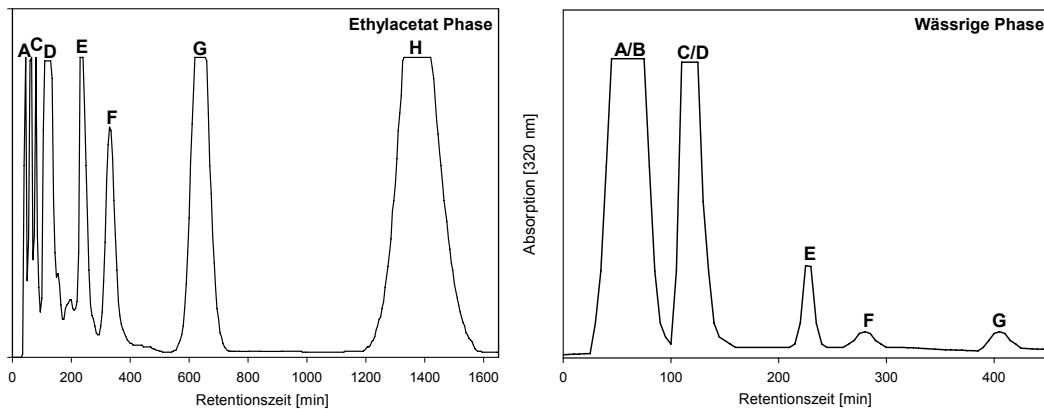


Abbildung 24: MLCCC Chromatogramme der Ethylacetat- und der wässrigen Phase aus Glucose

Aus der Ethylacetat- und der wässrigen Phase des aeroben Ansatzes (vgl. 6.4.11) wurden jeweils sieben Substanzen isoliert und identifiziert. Glucoson-Q wurde aus der MLCCC Fraktion A der Ethylacetat- und der wässrigen Phase isoliert. Das Lederer Glucoson-Q wurde aus Fraktion B der wässrigen Phase isoliert. 3-Desoxyglucoson-Q wurde aus Fraktion C, 1-Desoxyglucoson-Q und 3-Desoxypentosen-Q wurden aus Fraktion D, Threoson-Q wurde aus Fraktion E, 1-Desoxypentosen-Q wurde aus Fraktion F und 3-Desoxythreoson-Q wurde aus Fraktion G der Ethylacetat- und der wässrigen Phase isoliert. 1-Desoxythreoson-Q und Glyoxal-Q wurden aus Fraktion H der Ethylacetat Phase isoliert. Aus der ausgeblasenen stationären Phase wurde Methylglyoxal-Q isoliert.

4.1.2 **Strukturaufklärungen der isolierten Chinoxaline aus Glucose**

Zur Strukturaufklärung der mittels MLCCC isolierten Verbindungen wurden GC/MS, HR/MS und NMR- (^1H , ^{13}C , HMBC und HMQC) Experimente eingesetzt. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-, GC/MS- und HR/MS-Daten sind im Anhang aufgeführt.

Glucoson-Q wurde in Mengen von ca. 2 mg pro Inkubationsansatz als sauberer Standard mittels MLCCC isoliert. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 25,9 min und besitzt vierfach silyliert eine molare Masse von 538 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=217$, 103 und 73.

Mittels NMR konnte die Struktur des Glucoson-Q abgesichert werden. Ein charakteristisches Strukturmerkmal ist das endständige H-Atom am Chinoxalinring (Position 7), welches bei 9,11 ppm ein Singulett ergibt. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 151,4 ppm. Des Weiteren sind die charakteristischen Signale an Position 9 der $\text{CH}(\text{OH})$ Gruppe zu sehen. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 72,6 ppm, im ^1H -Spektrum ist bei 5,29 ppm das zu erwartende Duplett sichtbar. Bei den H-Atomen an Position 10 sind Kopplungen zu H-9 und H-11 beobachtbar. Ebenso sind Kopplungen von H-Atomen an Position 12 zu H-11 sichtbar. Die NMR-Daten stimmen mit den Daten von Hollnagel und Kroh [40] überein. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=273.0849$ [$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anhand der NMR- und GC/MS-Daten und den Daten der Hochauflösung wurde die Struktur des Glucoson-Q bestätigt.

Das Lederer Glucoson-Q wurde aus den vorderen Fraktionen (neun und zehn) der wässrigen Phase mittels MLCCC isoliert. Aufgrund der Unreinheit dieser Fraktionen erfolgte eine Aufreinigung mittels RP-18 Säule. Als Laufmittel wurde ein Wasser/MeOH-Gemisch im Verhältnis 9:1 gewählt. Die Kontrolle der einzelnen Fraktionen nach der Aufreinigung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Hierzu wurde die Methode zur Bestimmung von Aminosäuren gewählt (vgl. 6.5.9). Zur Absicherung der Struktur wurde die NMR-Spektroskopie gewählt. Das endständige H-Atom am Chinoxalinring ergibt bei 8,63 ppm das zu erwartende Singulett. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 146,2 ppm. Die CH_2 -Gruppe an Position 4 ergibt ein Duplett von Dupletts bei 2,90 ppm. Die CH_2 -Gruppe an Position 1 ergibt ebenfalls ein Duplett von Dupletts bei 3,02 ppm. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum ergibt 50,1 ppm (Position 1) und 39,2

ppm (Position 4). Die H-Atome der CH₂-Gruppe an Position 1' sind ein weiteres Strukturmerkmal. Das zu erwartende Multipllett wird bei 2,89 ppm bestätigt. Das H-Atom in Position 5' der CH-Gruppe ergibt im ¹H-Spektrum ein Triplett bei 3,46 ppm. Die chemische Verschiebung im ¹³C-Spektrum ergibt 55,1 ppm. Die Ergebnisse stimmen mit den NMR-Daten von Biemel et al. [9] überein. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=363,2029$ [C₁₂H₁₄N₂O₂], [M+H]⁺. Anhand der NMR-Daten und der Hochauflösung wurde das Lederer Glucoson-Q bestätigt.

1-Desoxyglucoson-Q wurde in Mengen von ca. 8 mg pro Ansatz aus der Ethylacetat- und der wässrigen Phase isoliert. Die Strukturanalyse erfolgte mittels GC/MS, HR/MS und NMR. Das Chinoxalin besitzt eine molare Masse von 234 g/mol. Durch dreifache Silylierung ergibt sich für die GC/MS-Messung eine molare Masse von 450 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=246$, 205, 147 und 73. Durch die NMR-Spektroskopie wurde die vermutete Struktur abschließend verifiziert. Das ¹H-NMR-Spektrum ergibt mit einem Signal bei 2,86 ppm ein Hinweis auf die endständige CH₃-Gruppe am Chinoxalinring. Die Kopplungen zwischen den H-Atomen an Position 10 und Position 11 sowie die Kopplungen zwischen Position 11 und Position 12 wurden bestätigt. Es ergibt sich eine Übereinstimmung mit Glomb und Pfahler [41]. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=257,0896$ [C₁₂H₁₄N₂O₃Na], [M+Na]⁺.

Von 3-Desoxyglucoson-Q wurden ca. 1 mg pro Inkubationsansatz aus der organischen und der wässrigen Phase isoliert. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 25,61 min und besitzt dreifach silyliert eine molare Masse von 450 g/mol. Die charakteristischen Fragmentationen sind $m/z=245$ und 73. Mittels NMR wurde die Struktur bestätigt. Charakteristisch für dieses Desoxyoson ist das Signal (Singulett) des am C-7 befindlichen H-Atoms bei einer chemischen Verschiebung von 8,84 ppm. Des Weiteren sind die charakteristischen Signale der CH₂-Gruppe an Position 9 im ¹H- und ¹³C-Spektrum sichtbar. Die chemische Verschiebung im ¹³C-Spektrum beträgt 40,5 ppm. Im ¹H-Spektrum ist bei 3,13 ppm und 3,41 ppm das zu erwartende Duplett beobachtbar. Die NMR-Daten stimmen mit den NMR-Daten von Nedvidek et al. [15] überein. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=257,0896$ [C₁₂H₁₄N₂O₃Na], [M+Na]⁺.

1-Desoxypentosen-Q wurde vorrangig aus der organischen Phase in Mengen bis zu 7 mg pro Ansatz gewonnen. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei

22,89 min und besitzt zweifach silyliert eine molare Masse von 348 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=245$ und 73. Mit Hilfe der NMR wurde die Struktur des 1-Desoxypentosen-Q abschließend verifiziert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergibt mit einem Signal bei 2,84 ppm ein Hinweis auf die endständige CH_3 -Gruppe am Chinoxalinring. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 22,3 ppm. Des Weiteren wurde die Kopplung zwischen den H-Atomen in Position 10 und Position 11 bestätigt. Die Ergebnisse stimmen mit den Daten von Hauck et al. [21] überein. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=227,0790$ [$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-Desoxypentosen-Q wurde zusammen mit 1-Desoxyglucoson-Q in Mengen von ca. 1 mg pro Ansatz aus der organischen und der wässrigen Phase isoliert. 3-Desoxypentosen-Q eluiert im GC/MS-System bei 23,75 min und besitzt zweifach silyliert eine molare Masse von 348 g/mol. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde bei einem Signal von 8,81 ppm das zu erwartende Singulett am Chinoxalinring zugeordnet. Des Weiteren sind die charakteristischen Signale der CH_2 -Gruppe an Position 9 im ^1H - und ^{13}C -Spektrum sichtbar. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 40,9 ppm. Im ^1H -Spektrum sind bei 3,11 ppm und 3,25 ppm die zu erwartenden Dupletts von Dupletts beobachtbar. Die ermittelten Signale an Position 7 und Position 9 im 3-Desoxypentosen-Q stimmen mit den Signalen von 3-Desoxyglucoson-Q an Position 7 und Position 9 überein. Es liegt eine Übereinstimmung mit den Daten von Bravo et al. [42] vor. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=227,0789$ [$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Threoson-Q wurde sowohl aus der Ethylacetat- und der wässrigen Phase in Mengen von ca. 3 mg pro Inkubationsansatz isoliert. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 22,71 min und besitzt zweifach silyliert eine molare Masse von 334 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=334$, 231, 146 und 73. Mittels NMR-Spektroskopie wurde die Chinoxalinstruktur des Threosons abgesichert. Das endständige H-Atom am Chinoxalinring ergibt bei 9,07 ppm das zu erwartende Singulett. Die Signale an Position 9 und Position 10 stimmen mit den Signalen der H-Atome an Position 10 und Position 11 am 1-Desoxypentosen-Q überein. Die NMR-Daten sind mit den Daten von Usui et al. [16] vergleichbar. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=213,0633$ [$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-Desoxythreoson-Q wurde aus der organischen Phase in Mengen von ca. 3 mg pro Ansatz isoliert. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 20,37 min und besitzt nach einfacher Silylierung eine molare Masse von 246 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=246$ und 231. Durch NMR-Spektroskopie wurde die vermutete Struktur verifiziert. Charakteristisch ist das Signal (Singulett) der an Position 9 befindlichen H-Atome bei einer chemischen Verschiebung von 2,75 ppm. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum ergibt 21,8 ppm. Für die Position 10 ist im ^1H -Spektrum ein Singulett zu erwarten. Dies ist dem Signal bei 4,92 ppm zu zuordnen. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 64,6 ppm. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=197,0688$ [$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{ONa}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3-Desoxythreoson-Q wurde in Mengen von ca. 10 mg bevorzugt aus der organischen Phase gewonnen. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 20,88 min und besitzt nach einfacher Silylierung eine molare Masse von 246 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=231$, 156 und 73. Im ^1H -NMR-Spektrum wurde das Singulett bei 8,82 ppm bestätigt. Des Weiteren sind die charakteristischen Signale der CH_2 -Gruppe an Position 9 zu sehen. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 39,9 ppm. Im ^1H -Spektrum ist das bei 3,20 ppm zu erwartende Triplett sichtbar. Die ^1H -NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit den Daten von Usui et al. [16]. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=197,0687$ [$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{ONa}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Glyoxal-Q und Methylglyoxal-Q wurden anhand käuflich erworbener Chinoxalinstandards verifiziert.

Aus den Glucoseansätzen wurden elf Verbindungen identifiziert (Abb. 25). Die mit GC/MS, hochauflösender Massenspektrometrie und NMR identifizierten α -Dicarbonylchinoxaline wurden als authentische Standardsubstanzen für qualitative und quantitative Untersuchungen der Maillard-Reaktion eingesetzt.

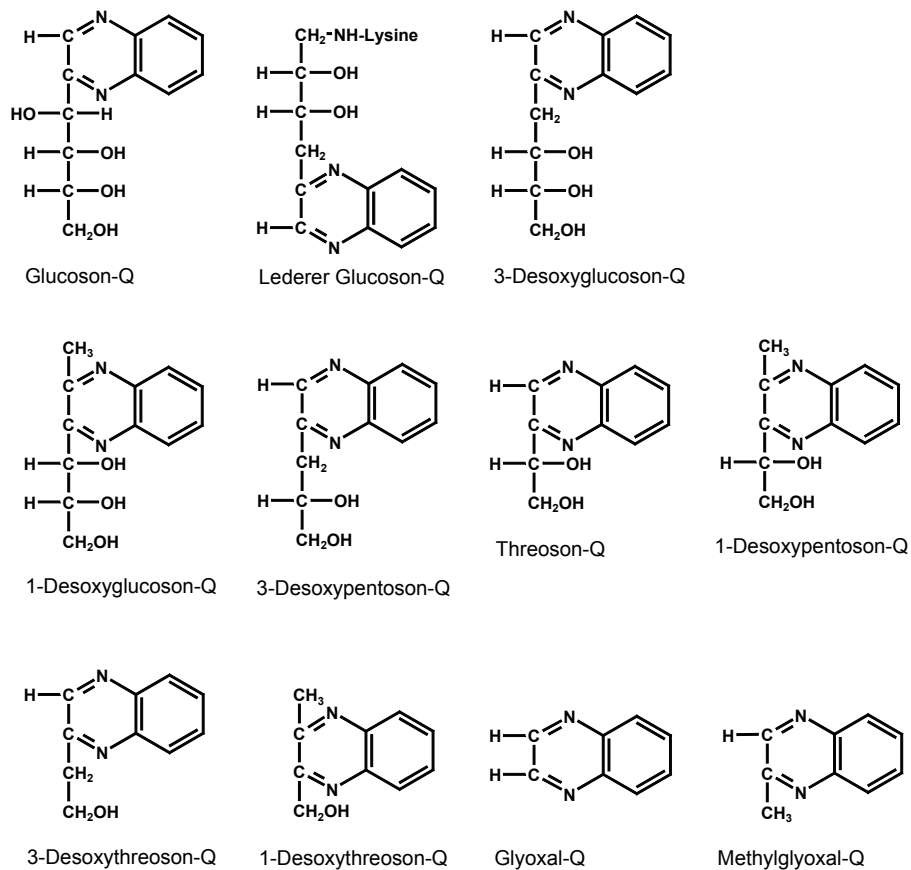


Abbildung 25: Identifizierte α -Dicarbonylchinoxaline aus Glucose

Nach Isolierung der α -Dicarbonylchinoxaline und Strukturaufklärung war es nun möglich den Signalen im HPLC-Chromatogramm (Abb. 26) das jeweilige Chinoxalin zu zuordnen. Glucoson-Q (13) eluiert nach 15,8 min, 1-Desoxyglucoson-Q (7) nach 20,3 min, Threoson-Q (19) nach 25,2 min, 3-Desoxyglucoson-Q (6) nach 26,5 min, 1-Desoxypentosen-Q (16) nach 33,3 min, 3-Desoxypentosen-Q (18) nach 33,3 min, 3-Desoxythreoson-Q (20) nach 44,9 min, 1-Desoxythreoson-Q (21) nach 47,1 min, Lederer Glucoson-Q (12) nach 51,2 min, Glyoxal-Q (22) nach 54,3 min und Methylglyoxal-Q (23) eluiert nach 61,7 min von der Säule.

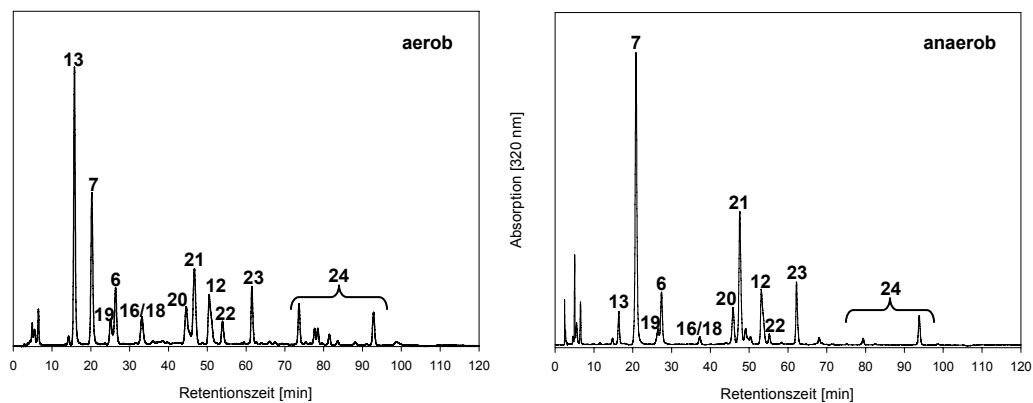


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme Glucoseinkubationen (7 Tage, aerob/anaerob)

In Spuren bilden sich neben den identifizierten Verbindungen noch weitere α -Dicarbonyle, z.B. 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson. Diese α -Dicarbonylverbindungen liegen jedoch in sehr geringen Mengen vor, so dass sie nicht für qualitative und quantitative Aussagen zu Verfügung stehen. Die Verbindungen mit einer Retentionszeit zwischen 70 und 100 min (24) wurden als Artefakte identifiziert, die durch Oxidation von OPD entstehen.

4.1.3 *Quantitative und mechanistische Untersuchungen der Glucoseinkubationen*

4.1.3.1 *Quantifizierung der gebildeten α -Dicarbonylverbindungen aus Glucose in Anwesenheit von OPD*

Die quantitative Bildung der α -Dicarbonyle wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen unter aeroben und anaeroben Bedingungen verfolgt. Dazu wurde täglich der Gehalt der α -Dicarbonyle bestimmt. Im Folgenden wird die Bildung der α -Dicarbonylchinoxaline dargestellt.

Im Vergleich zwischen oxidativen und nicht-oxidativen Bedingungen zeigte das Glucoson-Q den größten Unterschied. Mit 44,56 mmol/mol Glucose (7 Tage) wurde dieses Chinoxalin als die Hauptkomponente unter aeroben Bedingungen nachgewiesen. Deutlich weniger wurde dagegen unter anaeroben Bedingungen gebildet (5,47 mmol/mol Glucose). Die dreifache Menge an 1-Desoxyglucoson-Q wurde unter Ausschluss von Sauerstoff (6,99 vs. 23,51 mmol/mol Glucose) gebildet. Die Bildung von 3-Desoxyglucoson-Q war unabhängig von Sauerstoff

(4,55 vs. 5,01 mmol/mol Glucose). Das Lederer Glucoson-Q wurde ebenfalls bevorzugt unter anaeroben Bedingungen (4,06 vs. 8,16 mmol/mol Glucose) gebildet.

Glucoson ist eine oxidativ gebildete α -Dicarbonylverbindung, wobei der Bildungsmechanismus über einen radikalischen Zwischenzustand beschrieben wird [11]. Die Bildung von 3-Desoxyglucoson ist unter oxidativen Bedingungen stabiler als die Bildung von 1-Desoxyglucoson. Beide Verbindungen werden nicht-oxidativ über Enolisierung und Dehydratisierung gebildet. Die geringere Stabilität von 1-Desoxyglucoson unter aeroben Bedingungen ist auf die Redoxaktivität dieser Reduktionstruktur zurückzuführen. Die Bildung des Lederer Glucosons wurde von Reihl et al. [8] beschrieben. Durch Enolisierung durch die gesamte Kohlenhydratkette entsteht das 5,6-Enaminol, welches im nachfolgenden Schritt an Position C-4 ein Wassermolekül eliminiert. In Abbildung 27 ist das α -Dicarbonylspektrum mit vollständigem Kohlenstoffskelett dargestellt.

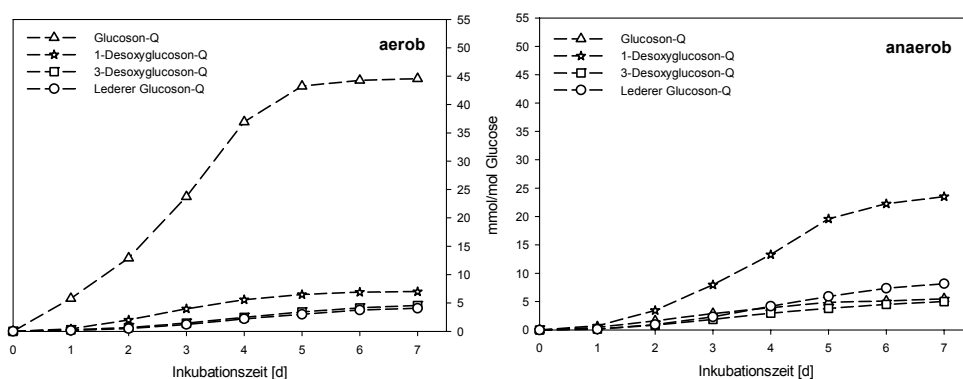


Abbildung 27: Bildung von Glucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q und Lederer Glucoson-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD)

Die Bildung von 1-Desoxypentosen-Q unter anaeroben Bedingungen ist geringer als unter aeroben Bedingungen (1,05 vs. 0,62 mmol/mol Glucose). Dem gleichen Muster, in geringeren Konzentrationen, folgte das 3-Desoxypentosen-Q (0,49 vs. 0,19 mmol/mol Glucose). Die Bildung von 1-Desoxypentosen und 3-Desoxypentosen wird von Nedvidek et al. [15] in alkalischer Lösung von Pentosen beschrieben. Hollnagel und Kroh [17] beschreiben 3-Desoxypentosen als dominierende α -Dicarbonylverbindung in Inkubationen von Disacchariden. Usui et al. [16] schlagen einen Bildungsweg für 3-Desoxypentosen aus Glucose über Glucoson vor. Grandhee und Monnier [19] identifizieren diese Verbindung in

Inkubationen mit Ribose. 1-Desoxypentosen wurde bisher nur aus Pentosen oder deren Derivaten identifiziert. Rizzi [20] beschreibt die Bildung aus Ribose durch Katalyse mit Phosphat. Hauck et al. [21] isolierte 1-Desoxypentosen nach Inkubationen von Ribosephosphat-Isomerase mit Ribulose-5-phosphat. Bravo et al. [42] beschreibt die Bildung von 3-Desoxypentosen und 1-Desoxypentosen in Bier und schließt auf Pentosen-Derivate, die als Precursor fungieren.

1-Desoxypentosen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals in Glucose-Inkubationen identifiziert und quantifiziert. Die bevorzugte Bildung dieser beiden Pentosen unter aeroben Bedingungen lässt darauf schließen, dass das Ausgangsprodukt ebenfalls unter oxidativen Bedingungen gebildet wird. Ein potentieller Kandidat ist das Glucoson. Um dies abzusichern, wird im späteren Abschnitt (4.1.5.2) der Abbau von Glucoson untersucht. Die Bildung der C-5-Fragmente aus Glucose ist in Abbildung 28 dargestellt.

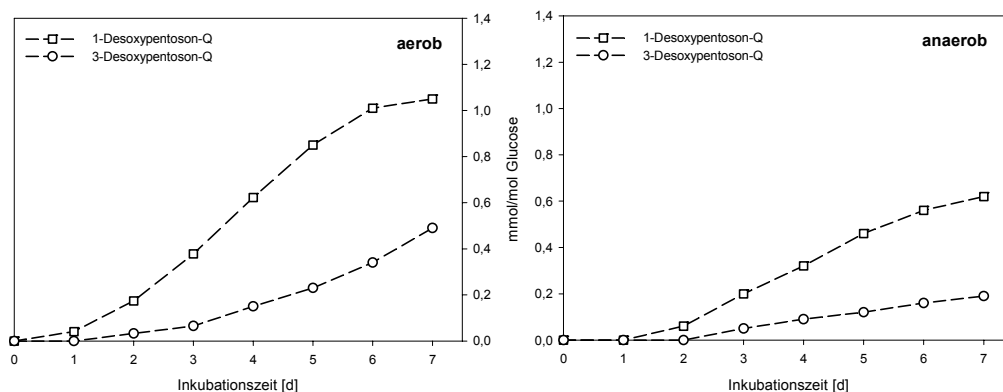


Abbildung 28: Bildung von 1-Desoxypentosen-Q und 3-Desoxypentosen-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD)

Threoson-Q wurde bevorzugt unter Einfluss von Sauerstoff quantifiziert (8,37 vs. 2,20 mmol/mol Glucose). Unter aeroben Bedingungen wurde weniger 1-Desoxythreoson-Q als unter anaeroben (4,35 vs. 14,81 mmol/mol Glucose) nachgewiesen. 3-Desoxythreoson-Q wurde ebenfalls bevorzugt unter anaeroben Bedingungen quantifiziert (1,49 vs. 4,64 mmol/mol Glucose). Die Bildung von Threoson wird von Usui [16] beschrieben, der Glucoson als Ausgangsverbindung verifiziert. Voigt und Glomb [25] weisen einen oxidativen Bildungsweg ausgehend von 1-Desoxyglucoson nach. 1-Desoxythreoson und 3-Desoxythreoson werden bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet. Voigt und Glomb [25] bestätigen die Bildung dieser beiden Verbindungen ausgehend von 1-Desoxy-

glucoson. 3-Desoxyglucoson, Glucoson und 3-Desoxypentosen werden als Ausgangsverbindungen für die Bildung von 3-Desoxythreoson vorgeschlagen [16]. Abbildung 29 zeigt die Bildung der C-4-Fragmente aus Glucose.

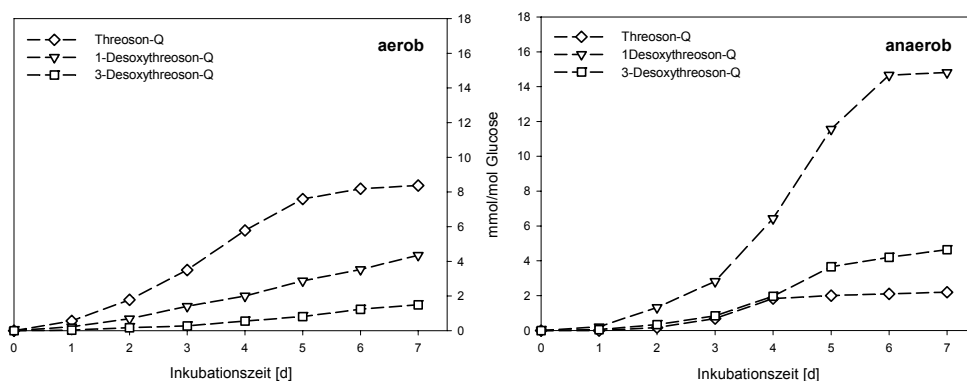


Abbildung 29: Bildung von Threoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxythreoson-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD)

Die Bildung von Methylglyoxal-Q ist unabhängig von Sauerstoff (3,96 vs. 4,04 mmol/mol Glucose). Glyoxal-Q ist die kleinste α -Dicarbonylverbindung und wurde bevorzugt unter oxidativen Bedingungen nachgewiesen (3,27 vs. 1,21 mmol/mol Glucose). Thornalley et al. [29] postulieren einen Bildungsweg über Retro-Aldol-Spaltung aus Glucose. Glucoson wird als Precursor von Hofmann [31] beschrieben. Durch Eliminierung von zwei Molekülen Wasser (C_3-C_4 und C_5-C_6) und anschließender Retro-Aldol-Spaltung zwischen C_2-C_3 entsteht aus Aldohexosen das Glyoxal [23]. Hayashi und Namiki [32] schlagen einen Bildungsweg vor, der auf einer Oxidation von Glycolaldehyd-Imin, gefolgt von einer Retro-Aldol-Fragmentierung des Glycosylamins, basiert.

Die Bildung von Methylglyoxal wird von Hollnagel und Kroh [26] beschrieben. Sie schlagen einen Bildungsweg ausgehend von 1-Desoxyglucoson vor. 3-Desoxyglucoson wird als Ausgangsverbindung von Weenen [27] vorgeschlagen. Yaylayan und Keyhani [23] bestätigen diese Hypothese durch Inkubationen mit ^{13}C -markierter Glucose. In Abbildung 30 wird die Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Glucose dargestellt.

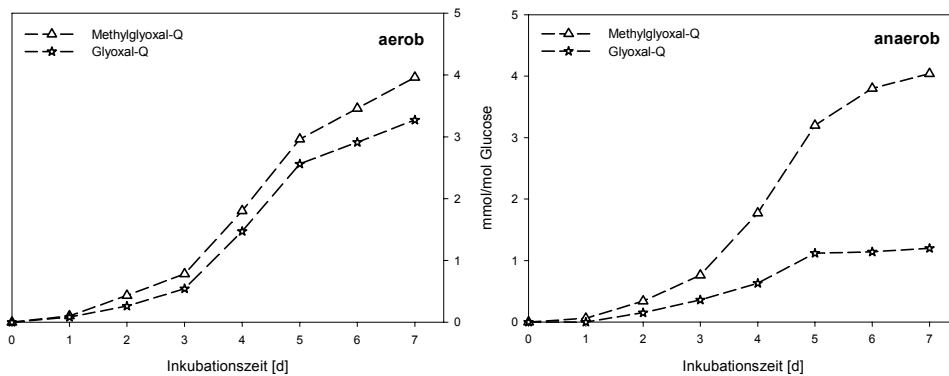


Abbildung 30: Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD)

4.1.3.2 Modelluntersuchungen zum Abbau von Glucose und Lysin in Abwesenheit von OPD

In den Untersuchungen zur Bildung von α -Dicarbylen aus Glucose und Lysin in Abwesenheit von OPD wurden die α -Dicarbylverbindungen aus den Modelluntersuchungen direkt nach definierten Reaktionszeiten mit OPD in stabile Chinoxaline überführt. Es wurde die Bildung der α -Dicarbyle nach 0, 1, 3, 5 und 7 Tagen untersucht.

Aus Abbildung 31 geht hervor, das 3-Desoxyglucoson-Q sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen das dominierende Chinoxalin darstellt (2,24 vs. 2,19 mmol/mol Glucose, 7 Tage). Die Bildung ist unabhängig von Sauerstoff. Glucoson-Q wurde bevorzugt unter aeroben Bedingungen gebildet (0,30 vs. 0,17 mmol/mol Glucose). 1-Desoxyglucoson-Q und das Lederer Glucoson-Q entstanden bevorzugt unter anaeroben Bedingungen. Das Lederer Glucoson-Q (0,04 vs. 0,23 mmol/mol Glucose) und 1-Desoxyglucoson-Q (0,05 vs. 0,22 mmol/mol Glucose) wurden in sehr geringen Mengen unter oxidativen Bedingungen quantifiziert.

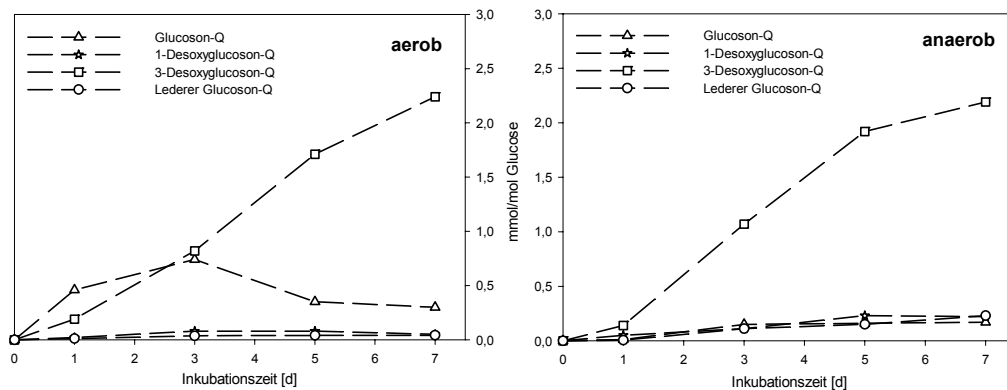


Abbildung 31: Bildung von Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q und Lederer Glucoson-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD)

1-Desoxypentosen-Q und 3-Desoxypentosen-Q wurden bevorzugt unter oxidativen Bedingungen gebildet (Abb. 32). Die doppelte Menge an 3-Desoxypentosen-Q (0,21 vs. 0,10 mmol/mol Glucose) wurde unter Einfluss von Sauerstoff nachgewiesen. Den gleichen Bedingungen in geringeren Konzentrationen folgte das 1-Desoxypentosen-Q (0,03 vs. 0,01 mmol/mol Glucose). 3-Desoxypentosen-Q tritt in einem Konzentrationsverhältnis zu 1-Desoxypentosen-Q von 7:1 auf.

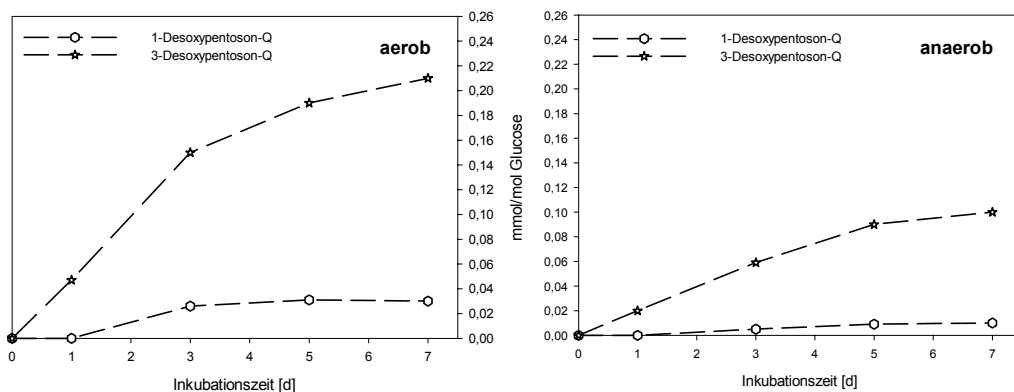


Abbildung 32: Bildung von 1-Desoxypentosen-Q und 3-Desoxypentosen-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD)

Threoson-Q wurde in hohen Konzentrationen bevorzugt unter aeroben Bedingungen quantifiziert (0,25 vs. 0,08 mmol/mol Glucose). 3-Desoxythreoson-Q dominierte mit einer Konzentration von 0,15 vs. 0,23 mmol/mol Glucose unter Ausschluss von Sauerstoff. In deutlich geringeren Konzentrationen wurde 1-Desoxythreoson-Q (0,05 vs. 0,11 mmol/mol Glucose) gebildet. In Abbildung 33 sind die C-4-Fragmente aus Glucose dargestellt.

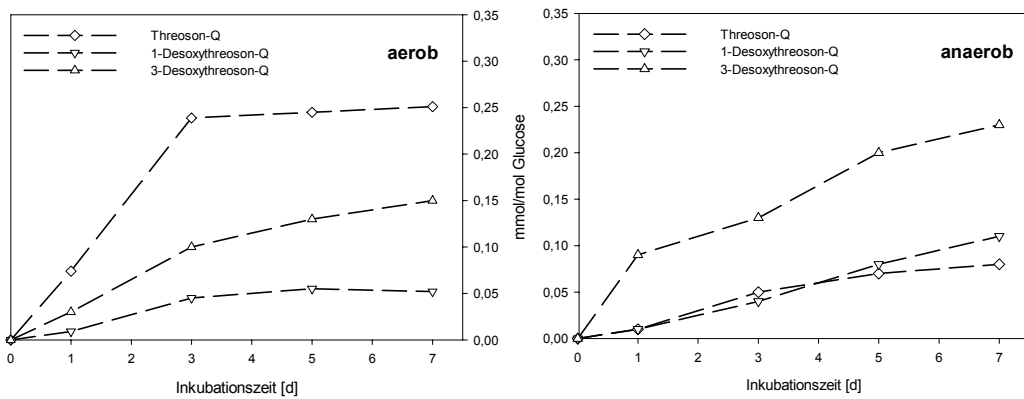


Abbildung 33: Bildung von Threoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxythreoson-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD)

Die Bildung von Methylglyoxal-Q (0,08 vs. 0,08 mmol/mol Glucose) ist unabhängig von Sauerstoff. Dagegen zeigt Glyoxal-Q (0,12 vs. 0,06 mmol/mol Glucose) eine Abhängigkeit von Sauerstoff (Abb. 34).

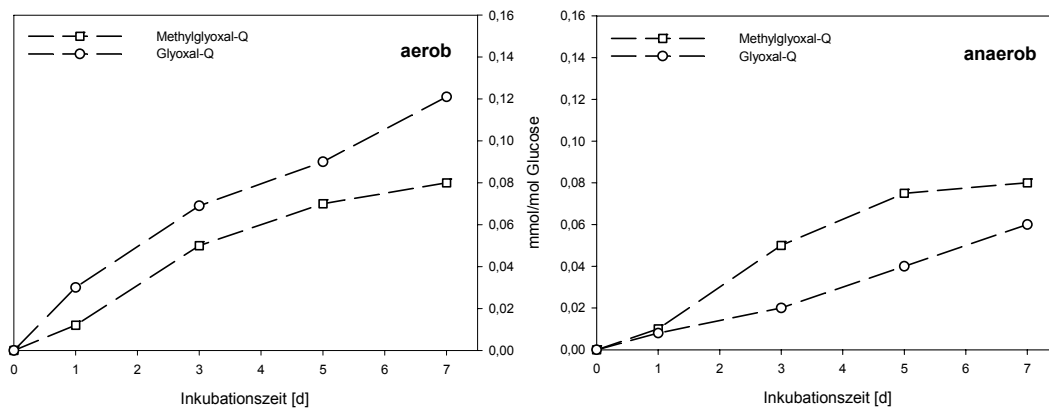


Abbildung 34: Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD)

4.1.3.3 Untersuchungen zum Abbau von Lysin

Aufgrund der geringen Ausbeuten an α -Dicarbonylen wurde im Folgenden der Abbau des Lysins, welches als eines der Ausgangsverbindungen dient, untersucht. Lysin hat eine Ausgangskonzentration von 42 mM und wird bei 50 °C für 7 Tage inkubiert. Der Abbau des Lysins verläuft sehr langsam. Nach 7 Tagen wurden noch 70 % des Lysins detektiert.

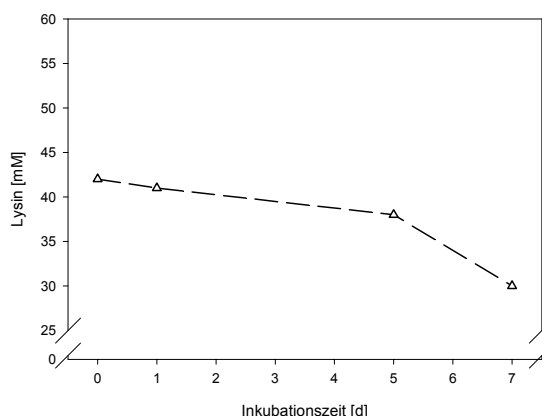


Abbildung 35: Abbau von Lysin in Inkubationen mit Glucose (in Abwesenheit von OPD)

4.1.4 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zum Abbau von Glucose in An- bzw. Abwesenheit von OPD zeigen die Vor- und Nachteile des Einsatzes eines Abfangreagenzes auf. Wird OPD zu Beginn einer Inkubation zugesetzt, werden ständig alle gebildeten α -Dicarbonylverbindungen abgefangen. Wird OPD nach einer festgelegten Reaktionszeit zugegeben, kann die Gesamtmenge an gebildeten α -Dicarbonylen nicht bestimmt werden, aber eine Aussage über den zeitlichen Konzentrationsverlauf ist möglich.

In der Literatur ist bekannt, dass die Ausbeuten an α -Dicarbonylen sehr gering sind (0,01-0,2 %). Daher wurden für die Isolierung der Referenzsubstanzen die Inkubationen in Anwesenheit von OPD gewählt. Die reaktiven α -Dicarbonyle wurden nach ihrer Bildung abgefangen und in Form ihrer Chinoxaline erstmals mittels MLCCC isoliert.

Als spezifische α -Dicarbonylverbindungen in Inkubationen von Glucose wurden Glucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, Lederer Glucoson-Q, 1-Desoxypentosen-Q, 3-Desoxypentosen-Q, 1-Desoxythreoson-Q, 3-Desoxythreoson-Q, Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q nachgewiesen.

In Inkubationen in Abwesenheit von OPD wurde 3-Desoxyglucoson als Chinoxalin mit der höchsten Konzentration detektiert, während in Anwesenheit von OPD Glucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, Lederer Glucoson-Q und 1-Desoxythreoson-Q in hohen Konzentrationen quantifiziert wurden. Das zeigt, dass in Abwesenheit eines Abfangreagenz hochreaktive Reduktonstrukturen sofort nach deren Bildung abgebaut werden. Dagegen häufen sich in Abwesenheit von OPD stabile

Strukturen wie 3-Desoxyglucoson, 3-Desoxypentosen und 3-Desoxythreoson an. Diese 3-Desoxyisomere besitzen eine deutlich geringere Reaktivität als Verbindungen mit Reduktonstruktur.

Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen muss nun geklärt werden, wie die C-5-, C-4-, C-3- und C-2-Fragmente entstehen. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die Bildung von 1-Desoxypentosen gelegt, welches erstmals aus Hexosen identifiziert wurde.

Im Folgenden wurden Untersuchungen durchgeführt, die der Aufklärung der Bildungswege der α -Dicarbonylfragmente dienen. Dazu wurden Inkubationen mit ^{13}C -markierter Glucose sowie Abbaureaktionen von Glucoson, 3-Desoxyglucoson und der Amadori-Verbindung untersucht.

4.1.5 Modelluntersuchungen zur Aufklärung der Bildungswege

4.1.5.1 Modelluntersuchungen mit ^{13}C -markierter Glucose

Zur Aufklärung der Bildungswege der α -Dicarbonylchinoxaline wurden Inkubationen mit 1- ^{13}C - und 6- ^{13}C -markierter Glucose unter aeroben und anaeroben Bedingungen verfolgt. Die Analyse des prozentualen Anteils der Isotope (M+1 und M+2) wurde nach drei und nach sieben Tagen mittels HPLC-ESI-MS ermittelt. M+1 steht für die protonierten Moleküle unter Einbau des unmarkierten Anteils von Glucose und M+2 für den Einbau der Markierung. Der Vergleich der Isotopomeren-Verhältnisse erlaubt Differenzierungen bezüglich der Bildung der jeweiligen α -Dicarbonyle. In Tabelle 1 ist der prozentuale Anteil der 1- ^{13}C und 6- ^{13}C Markierung der α -Dicarbonyle dargestellt.

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Verteilung $1\text{-}^{13}\text{C}$ und $6\text{-}^{13}\text{C}$ Markierung

| α -Dicarbonyl- Chinoxaline von: | m/z | $1\text{-}^{13}\text{C}$ | | $6\text{-}^{13}\text{C}$ | |
|-------------------------------------------|-----|--------------------------|------|--------------------------|------|
| | | 3 | 7 | 3 | 7 |
| | | Tage der Inkubationen | | | |
| Glucoson | M+2 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1-Desoxyglucoson | M+2 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 3-Desoxyglucoson | M+2 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Lederer Glucoson | M+2 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1-Desoxypentosen | M+1 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | M+2 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 3-Desoxypentosen | M+1 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | M+2 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 1-Desoxythreosen | M+1 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | M+2 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| 3-Desoxythreosen | M+1 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | M+2 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| Threosen | M+1 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | M+2 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| Glyoxal | M+1 | 47,9 | 51,2 | 72,2 | 69,0 |
| | M+2 | 52,1 | 48,8 | 27,8 | 31,0 |
| Methylglyoxal | M+1 | 66,8 | 68,2 | 52,9 | 52,9 |
| | M+2 | 33,2 | 31,8 | 47,1 | 47,1 |

*Aerobe und anaerobe Inkubationen zeigten die gleiche Zusammensetzung

Die Untersuchungen zeigen, dass 3-Desoxypentosen, 1-Desoxypentosen, 1-Desoxythreosen, 3-Desoxythreosen und Threosen aus dem Bereich $\text{C}_2\text{-C}_6$ der Glucose hervorgehen. Das Isotopenverhältnis der $6\text{-}^{13}\text{C}$ -Glucose zeigt 100 % dieser Markierung für alle fünf α -Dicarbonylverbindungen an. Methylglyoxal geht zu 32 % aus dem Bereich ($\text{C}_1\text{-C}_3$) der Glucose hervor, 47 % aus dem Bereich ($\text{C}_4\text{-C}_6$). Die fehlenden 21 % werden demnach dem Bereich $\text{C}_2\text{-C}_5$ des Glucose-Kohlenstoff-Gerüsts zugeordnet. Die Verteilung des prozentualen Anteils der Markierung zeigt für Glyoxal, dass 49 % aus $\text{C}_1\text{-C}_2$ und 31 % aus $\text{C}_5\text{-C}_6$ stammen. Die restlichen 20 % gehen demnach aus dem Bereich $\text{C}_2\text{-C}_5$ des Glucose-Kohlenstoff-Grundgerüsts hervor.

Zur Aufklärung der Bildung von α -Dicarbonylen wurden weitere Untersuchungen herangezogen. Dazu wurden Abbaureaktionen von Glucoson, 3-Desoxyglucoson

und der Amadori-Verbindungen über einen Zeitraum von 24 h bzw. 48 h verfolgt. Um die gebildeten α -Dicarbonyle in stabile Derivate zu überführen, wurde OPD nach der Inkubationszeit zugegeben.

4.1.5.2 Modelluntersuchungen zum Abbau von Glucoson

Wie in Abschnitt 4.1.3.1 bereits erwähnt, ist Glucoson ein möglicher Precursor für die Bildung von 1-Desoxypentosen und 3-Desoxypentosen.

Es wurde zuerst die Halbwertszeit von Glucoson bestimmt. Die Halbwertszeit von Glucoson beträgt 8 h (Abb. 36).

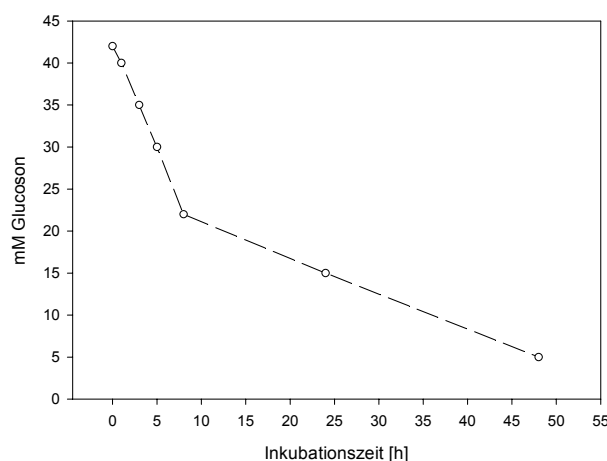


Abbildung 36: Bestimmung der Halbwertszeit von Glucoson

Zur Untersuchung der Bildung von α -Dicarbonylen aus Glucoson wurde das synthetisierte Glucoson mit Lysin über einen Zeitraum von 48 h bei 50 °C aerob und anaerob inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde ein Aliquot der Lösung entnommen, mit OPD versetzt und 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

Es wurden Threoson-Q, 3-Desoxypentosen-Q, 1-Desoxypentosen-Q, Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q detektiert. Pentosen-Q wurde in sehr geringen Mengen nachgewiesen, so dass eine Quantifizierung nicht möglich war.

Die höchste Konzentration der gebildeten α -Dicarbonyle wurde nach 8 h Inkubationszeit erreicht (Abb. 37).

Threoson-Q (7,52 vs. 3,54 mmol/mol Glucoson, 8 h) und 3-Desoxypentosen-Q (2,95 vs. 6,16 mmol/mol Glucoson) wurden als dominierende Chinoxaline unter aeroben und anaeroben Bedingungen detektiert. Threoson-Q wurde bevorzugt

unter Einfluss von Sauerstoff und 3-Desoxypentosen-Q in Abwesenheit von Sauerstoff gebildet. 1-Desoxypentosen-Q (0,34 vs. 0,95 mmol/mol Glucoson) wurde in dreifacher Menge unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen. Die Bildung von Glyoxal-Q (0,73 vs. 0,73 mmol/mol Glucoson) und Methylglyoxal-Q (0,34 vs. 0,33 mmol/mol Glucoson) war unabhängig von Sauerstoff.

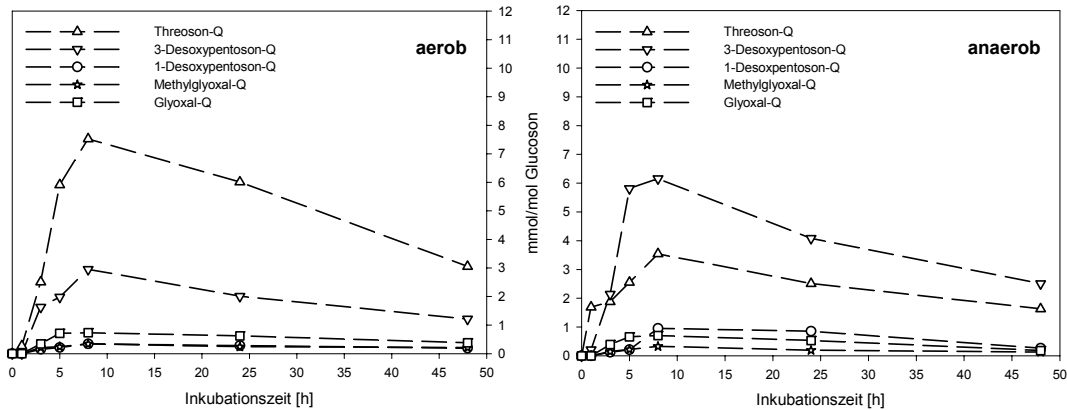


Abbildung 37: α -Dicarbonyle als Abbauprodukte in Inkubationen von Glucoson

In den Inkubationen wurden 3-Desoxypentosen und 1-Desoxypentosen aus Glucoson nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass Glucoson der Precursor für die Bildung dieser beiden Pentosen-Derivate ist. 3-Desoxypentosen zeigt jedoch eine andere Reaktivität als 1-Desoxypentosen. In Inkubationen von Glucose und Lysin in Anwesenheit von OPD wurde mehr 1-Desoxypentosen gebildet als 3-Desoxypentosen. Dagegen zeigen die Inkubationen von Glucose und Lysin in Abwesenheit von OPD eine deutlich höhere Bildung von 3-Desoxypentosen als 1-Desoxypentosen. 3-Desoxypentosen-Q tritt in einem Konzentrationsverhältnis zu 1-Desoxypentosen-Q von 7:1 in den Glucosoninkubationen auf. Das Verhältnis ist identisch mit den Ergebnissen der Glucose/Lysin-Inkubation (ohne OPD).

Die Bildung der Pentosone aus Glucoson lässt sich über eine Dicarbonylspaltung erklären. Aus dem 1,3-Tautomer des Glucosons spaltet sich durch β -Spaltung Ameisensäure ab. Gleichzeitig kommt es zur Bildung eines 1,2-Endiols. Durch Oxidation des Endiols bildet sich das Pentosen. Durch β -Eliminierung von Wasser wird das 3-Desoxypentosen gebildet. Aus der Umwandlung vom 1,2-Endiol zum 2,3-Endiol und anschließender Wasserabspaltung resultiert das 1-Desoxy-

pentoson. In Abbildung 38 wird der vorgeschlagene Bildungsweg der Pentoson-derivate dargestellt.

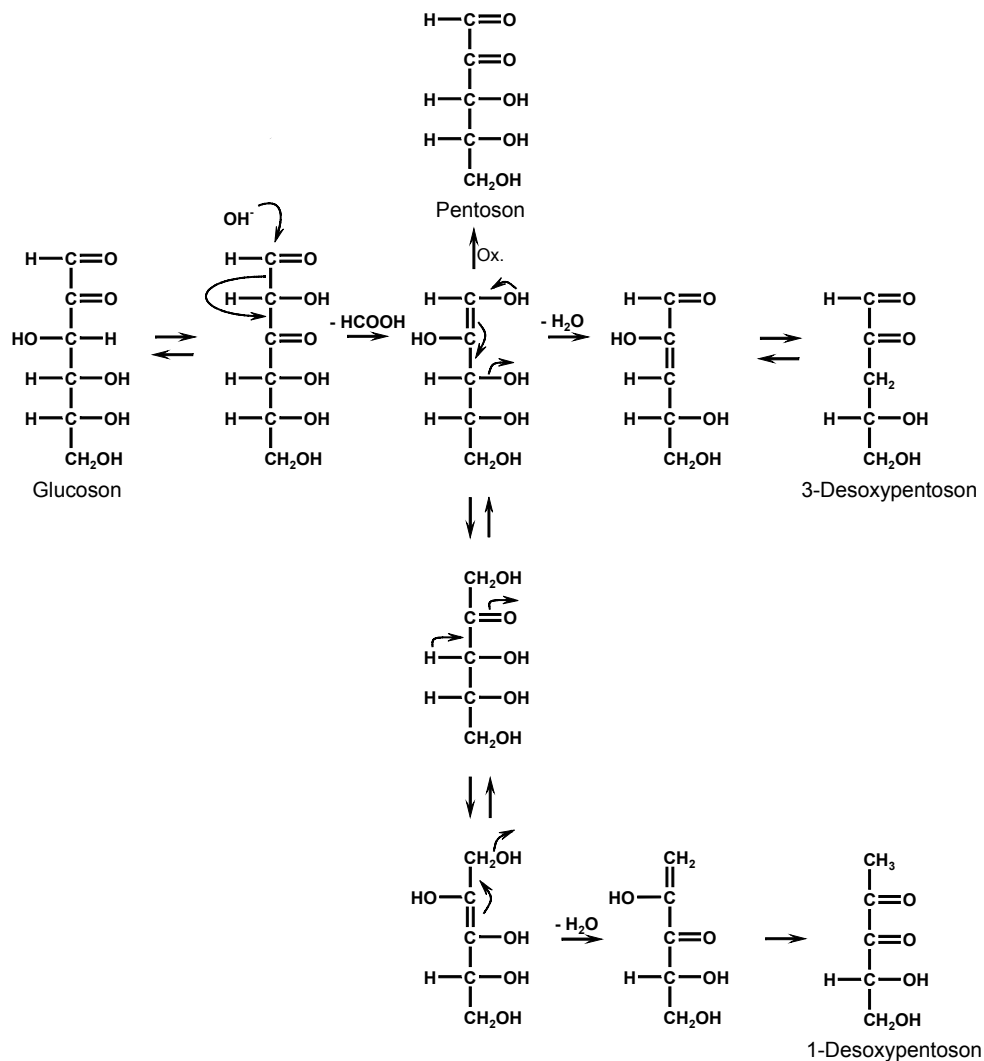


Abbildung 38: Postulierter Reaktionsweg für die Bildung von Pentoson, 3-Desoxypentose und 1-Desoxypentose aus Glucoson

4.1.5.3 Modelluntersuchungen zum Abbau von 3-Desoxyglucoson

Neben Glucoson wurde der Abbau von 3-Desoxyglucoson untersucht. Zur Untersuchung der Bildung von α -Dicarbonylen aus 3-Desoxyglucoson wurde das synthetisierte 3-Desoxyglucoson mit Lysin über einen Zeitraum von 48 h bei 50 °C aerob und anaerob inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde ein Aliquot der Lösung entnommen, mit OPD versetzt und 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert. 3-Desoxyglucoson ist eine sehr stabile Verbindung. In den ersten fünf Stunden verlief der Abbau nur sehr langsam (Abb. 39). Nach 8 h Inkubationszeit wurden 83 % des Dicarbonyls ermittelt. Nach 24 h sind von der 42 mM Ausgangs-

konzentration noch 28 mM (66 %) vorhanden. Die ermittelte Halbwertszeit von 3-Desoxyglucoson liegt bei 40 h.

Nach 48 h Inkubationszeit wurden keine Abbauprodukte (α -Dicarbonyle) detektiert.

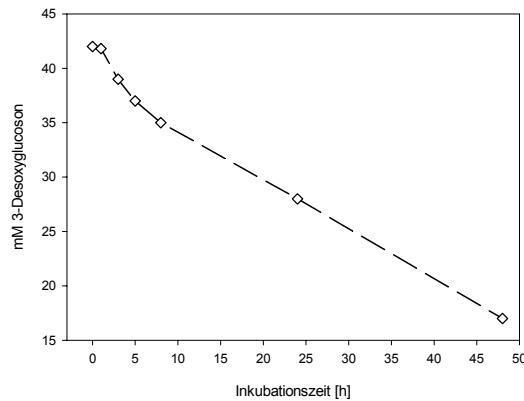


Abbildung 39: Bestimmung der Halbwertszeit von 3-Desoxyglucoson

4.1.5.4 Modelluntersuchungen zum Abbau der Amadori-Verbindung

Zur Untersuchung der Bildung von α -Dicarbonylen aus der Amadori-Verbindung wurde das synthetisierte Amadori-Produkt mit Lysin und OPD über einen Zeitraum von 24 h bei 50 °C aerob und anaerob inkubiert. Es wurden Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, Lederer Glucoson-Q, Threoson-Q, 3-Desoxythreoson-Q und 1-Desoxythreoson-Q quantifiziert (Abb. 40 und Abb. 41). In hohen Konzentrationen wurde das Glucoson-Q (20,97 mmol/mol Amadori, 24 h) unter aeroben Bedingungen gebildet. Dagegen wurden 1-Desoxyglucoson-Q (3,41 mmol/mol Amadori) und 3-Desoxyglucoson-Q (1,20 mmol/mol Amadori) in deutlich geringeren Konzentrationen unter aeroben Bedingungen detektiert. Das Lederer Glucoson-Q wurde unter aeroben Bedingungen in so geringen Konzentrationen gebildet, dass eine Quantifizierung nicht möglich war.

Unter anaeroben Bedingungen wurde 1-Desoxyglucoson-Q (8,32 mmol/mol Amadori, 24 h) als dominierendes Chinoxalin detektiert. 3-Desoxyglucoson-Q (1,17 mmol/mol Amadori), Lederer Glucoson-Q (0,19 mmol/mol Amadori) und Glucoson-Q (0,58 mmol/mol Amadori) wurden in geringeren Mengen nachgewiesen.

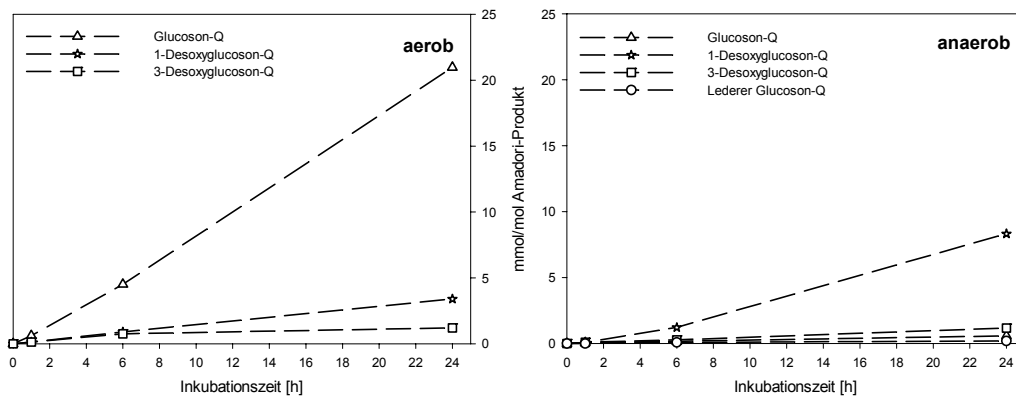


Abbildung 40: Bildung von Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q und Lederer Glucoson-Q aus der Amadori-Verbindung (in Anwesenheit von OPD)

Mit einer Konzentration von 0,67 mmol/mol Amadori-Verbindung dominiert das Threoson-Q unter oxidativen Bedingungen. 1-Desoxythreoson-Q (0,12 mmol/mol Amadori, 24 h) und 3-Desoxythreoson-Q (0,05 mmol/mol Amadori) wurden in geringeren Konzentrationen quantifiziert. Unter nicht-oxidativen Bedingungen wurde mit einer Konzentration von 0,26 mmol/mol Amadori das 1-Desoxythreoson-Q gebildet. 3-Desoxythreoson-Q (0,12 mmol/mol Amadori) und Threoson-Q (0,15 mmol/mol Amadori) wurden in geringeren Konzentrationen identifiziert.

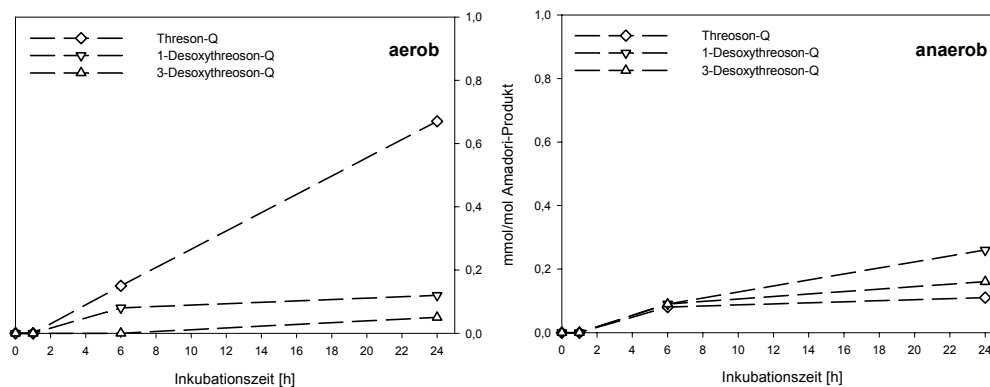


Abbildung 41: Bildung von Threoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxythreoson-Q aus der Amadori-Verbindung (in Anwesenheit von OPD)

4.1.6 Zusammenfassung

α -Dicarbonyle sind Schlüsselverbindungen in der Maillard Reaktion von Kohlenhydraten und sie unterliegen unterschiedlichen Bildungswegen. Auf Grundlage der Untersuchungen von Glucose in An- und Abwesenheit von OPD wurden Abbaureaktionen von Glucoson, 3-Desoxyglucoson und der Amadori-Verbindung untersucht.

Aus Glucoson wurden Threoson, 3-Desoxypentosen, 1-Desoxypentosen, Pentosen, Methylglyoxal und Glyoxal als spezifische Abbauprodukte nachgewiesen. Dabei bilden Threoson und 3-Desoxypentosen die wichtigsten Intermediate unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Bildung von Methylglyoxal und Glyoxal ist unabhängig von Sauerstoff. Die Bildung von 1-Desoxypentosen aus Glucose wird über Glucoson postuliert. 3-Desoxyglucoson ist eine sehr stabile α -Dicarbonylverbindung. Es wurden keine Abbauprodukte (Dicarbonylstrukturen) nach einer Halbwertszeit von 40 h nachgewiesen.

Aus der Amadori-Verbindung, der ersten analytisch erfassbaren Zwischenstufe der Maillard-Reaktion, entstehen Glucoson und 1-Desoxyglucoson als die dominierenden Dicarbonylintermediate. Dagegen ist die Bildung von 3-Desoxyglucoson und dem Lederer Glucoson sehr gering. Threoson bildet das wichtigste Intermediat mit fragmentiertem Kohlenstoffskelett unter aeroben Bedingungen, während 1-Desoxythreoson das dominierende Chinoxalin unter anaeroben Bedingungen bildet. Der Nachweis von 3-Desoxythreoson ist sehr gering. Dicarbonylstrukturen wie Pentosen-Derivate und Methylglyoxal und Glyoxal wurden nicht identifiziert.

Auf Grundlage der Untersuchungsergebnisse aus den verschiedenen Modellreaktionen und der Literatur nach Voigt und Glomb [25] wurde nachfolgender Reaktionsmechanismus postuliert (Abb. 42). Es lässt sich erkennen, dass aus 1-Desoxyglucoson die C-4-Fragmente hervorgehen. Glucoson dagegen ist ein Precursor für die Bildung von C-5-Fragmenten. Glyoxal und Methylglyoxal wurden aus dieser Graphik ausgeschlossen. Sie entstehen aus Glucoson und 1-Desoxyglucoson, bzw. direkt aus der Glucose.

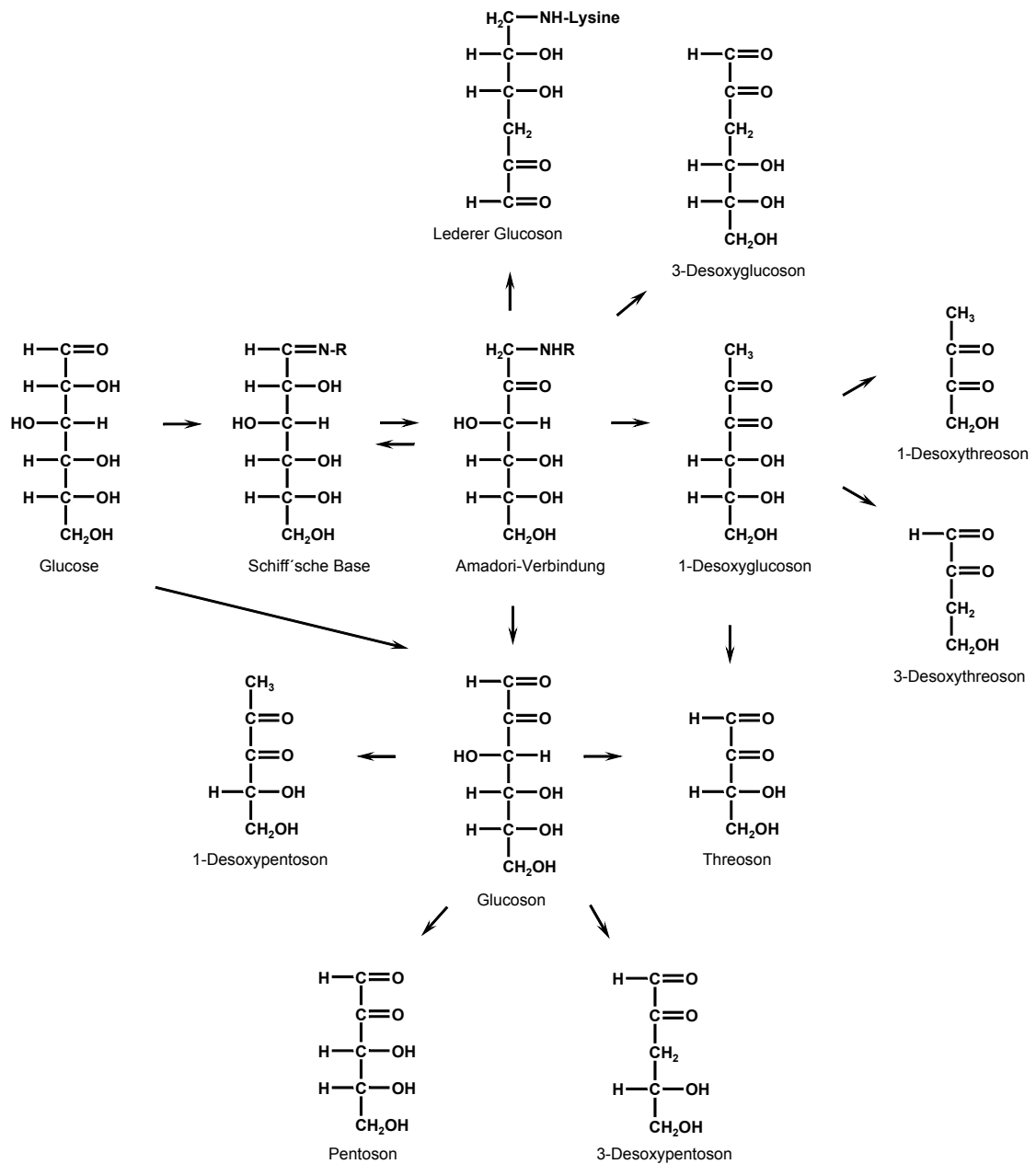


Abbildung 42: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Bildung von α -Dicarbonylen aus Glucose

4.2 Qualitative und quantitative Untersuchungen von α -Dicarbonylchinoxalinen aus Maltose und Lactose

4.2.1 Isolierung von α -Dicarbonylen aus Maltose

Zur Isolierung der Chinoxaline aus den Reaktionsansätzen (vgl. 6.4.11) wurden die Ethylacetat- und die wässrige Phase mittels MLCCC fraktioniert. Da die Ethylacetat Phase des anaeroben Ansatzes und die wässrige Phase des aeroben Inkubationsansatzes die größten Ausbeuten lieferten, wurden diesen beiden Phasen für die Substanzisolierung eingesetzt (Abb. 43). Aus der Ethylacetat Phase des anaeroben Ansatzes wurden zehn Substanzen und aus der wässrigen Phase des aeroben Ansatzes wurden acht Substanzen isoliert und identifiziert.

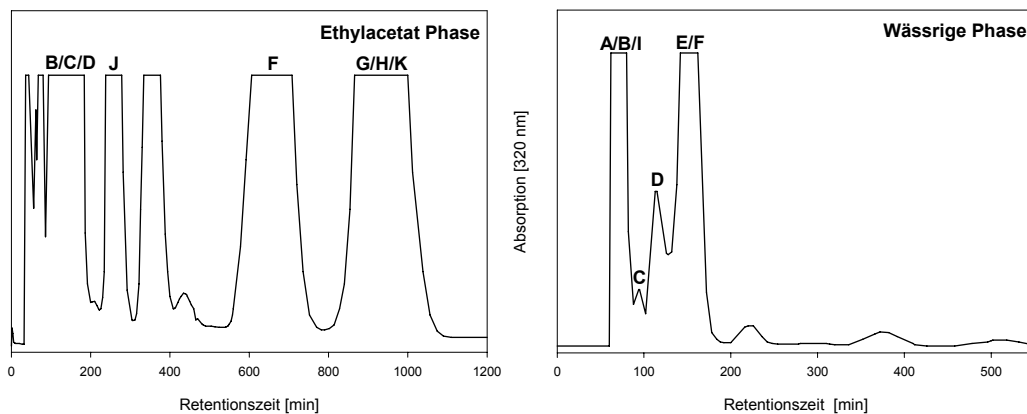


Abbildung 43: MLCCC Chromatogramme der Ethylacetat- (anaerob) und der wässrigen Phase (aerob) aus Maltose

Maltoson-Q, 1-Desoxymaltoson-Q und 3-Desoxymaltoson-Q wurden aus MLCCC Fraktion I und Glucoson-Q wurde aus Fraktion A der wässrigen Phase des aeroben Inkubationsansatzes isoliert. 3-Desoxyglucoson-Q wurde aus Fraktion B, 4-Desoxyglucoson-Q wurde aus Fraktion C, 1-Desoxyglucoson-Q wurde aus Fraktion D und 1,2,3-Tricarbonsyl-Q wurde aus Fraktion F aus der Ethylacetat- und der wässrigen Phase isoliert. 3-Desoxypentoson-Q wurde aus Fraktion E der wässrigen Phase des aeroben Ansatzes isoliert. 2,3,4-Tricarbonsyl-Q wurde ebenfalls aus dem aeroben Ansatz der Ethylacetat Phase gewonnen. 1,4-Didesoxyglucoson-Q wurde aus Fraktion J, 3,4-Didesoxypentoson-Q wurde aus Fraktion H, 3-Desoxythreoson-Q wurde aus Fraktion G und 1-Desoxythreoson-Q

wurde aus Fraktion K der Ethylacetat Phase des anaeroben Ansatzes isoliert. Diacetyl-Q, Methylglyoxal-Q, Glyoxal-Q und Glyoxalsäure-Q wurden aus der stationären Phase isoliert.

4.2.1.2 *Strukturaufklärung der isolierten Chinoxaline aus Maltose*

Die Strukturen der isolierten Chinoxaline wurden mittels GC/MS, hochauflösender Massenspektrometrie und NMR- (^1H , ^{13}C , HMBC und HMQC) Experimenten aufgeklärt. Die ^1H -, ^{13}C -NMR-, GC/MS- und HR/MS-Daten sind im Anhang aufgeführt. 4-Desoxyglucoson-Q wurde vorrangig aus dem anaeroben Ansatz in Mengen von ca. 10 mg pro Ansatz isoliert werden. 4-Desoxyglucoson-Q eluiert im GC/MS-System bei 23,34 min und besitzt dreifach silyliert eine molare Masse von 450 g/mol. Durch NMR-Experimente wurde die Struktur aufgeklärt. Charakteristisch für dieses Desoxyoson ist das Signal an Position 9, welches ein Singulett bei 5,02 ppm ergibt. Das Duplett von Dupletts in Position 10 ergibt im ^1H -Spektrum 3,19 ppm und 3,24 ppm. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum ergibt 38,1 ppm. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=257,0897$ [$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Die NMR-Daten stimmen mit den Daten von Morita et al. [43] überein.

1,4-Didesoxyglucoson-Q wurde aus dem anaeroben Inkubationsansatz der Ethylacetat Phase isoliert. Dieses Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 24,12 min und besitzt nach zweifacher Silylierung eine molare Masse von 362 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=272$, 259 und 158. Das ^1H -NMR-Spektrum ergibt mit einem Signal bei 2,46 ppm den Hinweis auf die endständige CH_3 -Gruppe am Chinoxalinring. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 21,5 ppm. Des Weiteren sind die charakteristischen Signale der CH_2 -Gruppe an Position 10 sichtbar. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum beträgt 38,1 ppm. Im ^1H -Spektrum sind bei 2,89 ppm und 2,85 ppm die zu erwartenden Dupletts von Dupletts sichtbar. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=241,0947$ [$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$], $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Die Ergebnisse stimmen mit den NMR-Daten von Bravo et al. [42] überein.

1,2,3-Tricarboxyl-Q wurde aus dem aeroben und anaeroben Inkubationsansatz in Mengen von ca. 5 mg pro Ansatz isoliert. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 25,67 min und besitzt nach zweifacher Silylierung eine molare Masse

von 376 g/mol. Die Verifizierung dieser Struktur erfolgte mittels NMR-Experimenten. Das H-Atom in Position 9 ergibt ein Singulett mit einer chemischen Verschiebung von 6,09 ppm. Des Weiteren sind die charakteristischen Signale der CH₂-Gruppe in Position 10 sichtbar. Die chemische Verschiebung im ¹³C-Spektrum beträgt 34,7 ppm. Im ¹H-Spektrum sind bei 3,19 ppm und 3,14 ppm die zu erwartenden Dupletts von Dupletts sichtbar. Für die in Position 9 befindliche Carbonylfunktion wird im ¹³C-Spektrum ein Signal bei ca. 200 ppm erwartet. Da dieses Signal nicht gefunden wurde, wird vermutet, dass durch Halbacetalbildung ein tertiäres C-Atom vorliegt. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=255,0737$ [C₁₂H₁₂N₂O₃Na], [M+Na]⁺.

3,4-Didesoxyentoson-Q wurde aus der Ethylacetat Phase in Mengen von ca. 3 mg pro Ansatz isoliert. Das Chinoxalin eluiert im GC/MS-System bei 22,21 min und besitzt einfach silyliert eine molare Masse von 260 g/mol. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=245$, 171 und 144. Mittels NMR wurde die Struktur identifiziert. Das ¹H-Spektrum zeigt die Anwesenheit des endständigen H-Atoms (C-7) am Chinoxalinring. Die chemische Verschiebung im ¹H-Spektrum ergibt ein Signal bei 8,76 ppm. Die CH₂-Gruppe an Position 9 ergibt das zu erwartende Triplett mit einer chemischen Verschiebung bei 3,07 ppm. Das ¹³C-Spektrum ergibt bei 31,4 ppm ein Signal. Ebenfalls wurde die CH₂-Gruppe in Position 10 als Multiplett mit einer chemischen Verschiebung bei 2,05 ppm verifiziert. Das ¹³C-Spektrum zeigt bei 32,1 ppm ein Signal. Die Hochauflösung ergibt eine Molekularmasse von $m/z=189,1022$ [C₁₁H₁₂N₂O₂Na], [M+H]⁺. Die NMR-Daten stimmen mit den Daten von Mavric und Henle [18] überein.

Maltoson-Q (m/z 413,2658 (gefunden), m/z 413.2656 (berechnet) [C₁₈H₂₃O₉N₂] [M+H]⁺), 1-Desoxymaltoson-Q (m/z 435,1164 (gefunden), m/z 435.1158 (berechnet) [C₁₈H₂₄O₈N₂K] [M+K]⁺), 3-Desoxymaltoson-Q (m/z 435,1164 (gefunden), m/z 435.1158 (berechnet) [C₁₈H₂₄O₈N₂K] [M+K]⁺) und 2,3,4-Tricarboxyl-Q (m/z 255.0740 (gefunden), m/z 255.0741 (berechnet) [C₁₂H₁₂N₂O₃Na] [M+Na]⁺) wurden mittels hochauflösender Massenspektrometrie identifiziert. Für das 2,3,4-Tricarboxyl-Q existieren keine NMR-Daten. Die Substanz zersetzte sich bei der Aufreinigung.

Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, 3-Desoxyentoson-Q, 3-Desoxythreoson-Q und 1-Desoxythreoson-Q wurden mit den aus der Glucose isolierten Chinoxalinstandards identifiziert.

Glyoxal-Q, Methylglyoxal-Q, Diacetyl-Q und Glyoxylsäure-Q wurden anhand käuflich erworbener Chinoxaline identifiziert. 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q wurde mit Hilfe eines synthetisierten Standards (vgl. 4.3) nachgewiesen.

Aus den Maltoseansätzen wurden 19 Verbindungen isoliert (Abb. 44). Die identifizierten α -Dicarbonylchinoxaline wurden als authentische Standardsubstanzen für qualitative und quantitative Untersuchungen der Maillard-Reaktion von Disacchariden eingesetzt.

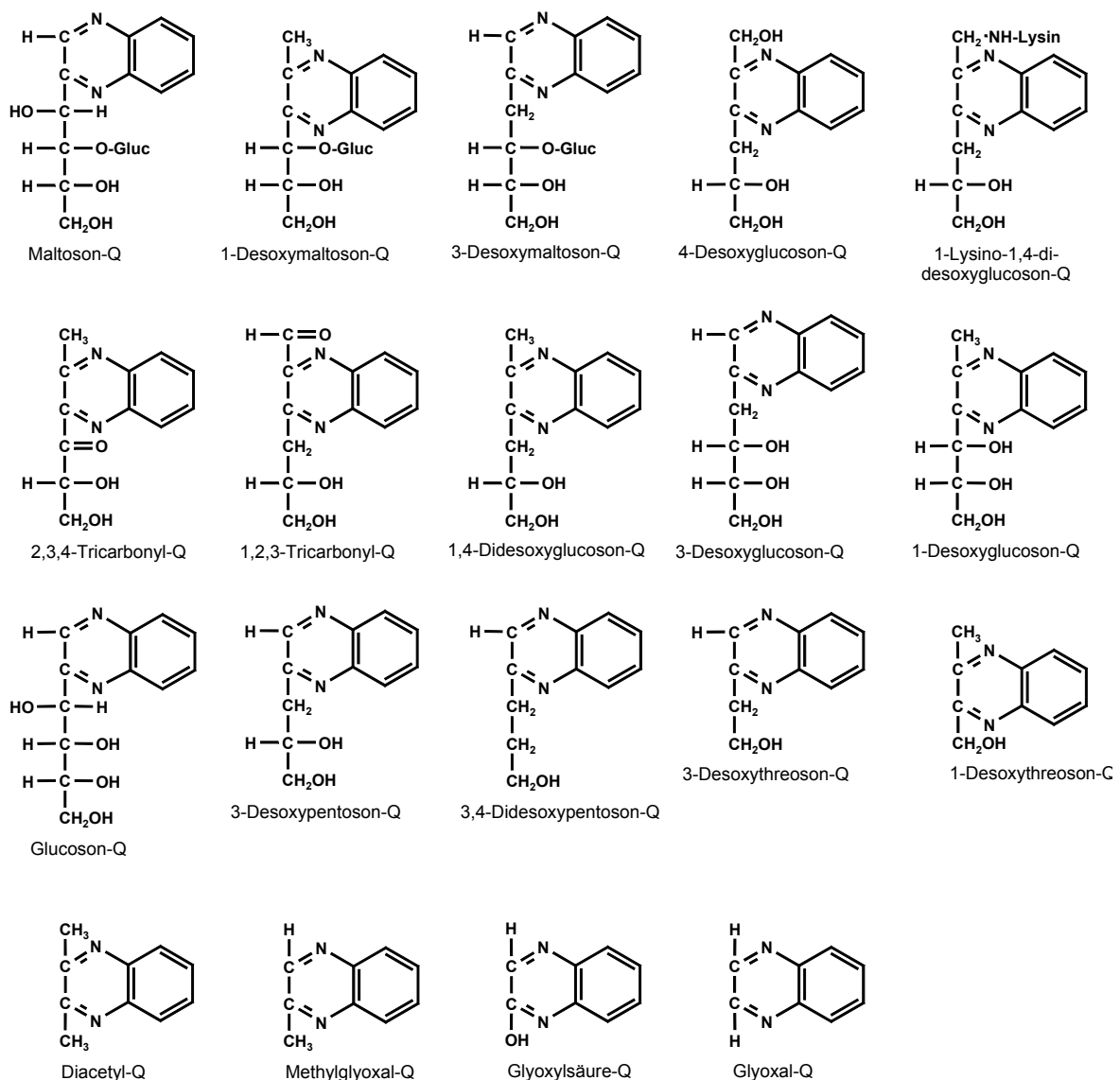


Abbildung 44: Identifizierte Chinoxaline aus Maltose

Nach Isolierung der α -Dicarbonylchinoxaline aus Maltose und Strukturaufklärung war es nun möglich den Signalen im HPLC-Chromatogramm (Abb. 45) das jeweilige Chinoxalin zu zuordnen.

1-Desoxymaltoson-Q (9) eluiert nach 16,0 min, Maltoson-Q (25) nach 16,9 min, Glucoson-Q (13) nach 18,0 min, 1-Desoxyglucoson-Q (7) nach 24,8 min, 3-Desoxymaltoson-Q (11) nach 25,7 min, 4-Desoxyglucoson-Q (15) nach 28,7 min, 3-Desoxyglucoson-Q (6) nach 29,5 min, Glyoxalsäure-Q (26) nach 34,8 min, 3-Desoxypentoson-Q (16) nach 36,8 min, 1,2,3-Tricarbonyl-Q (27) nach 40,7 min, 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q (10) nach 46,5 min, 2,3,4-Tricarbonyl-Q (29) nach 46,5 min, 1,4-Didesoxyglucoson (14) nach 48,8 min, 3-Desoxythreoson-Q (20) nach 48,4 min, 1-Desoxythreoson-Q (21) nach 50,2 min, Glyoxal-Q (23) nach 55,9 min, 3,4-Didesoxypentoson-Q (17) nach 55,9 min, Methylglyoxal-Q (22) nach 62,7 min und Diacetyl-Q (28) nach 68,0 min von der Säule.

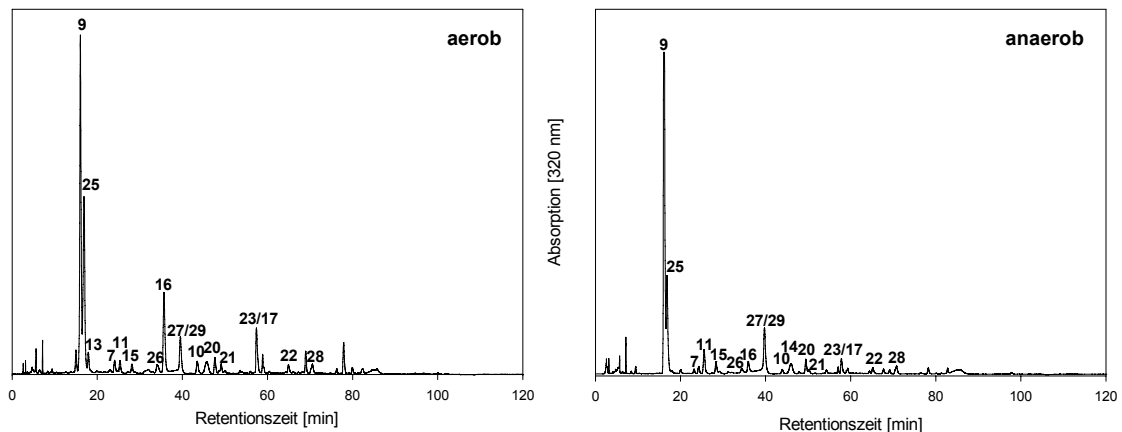


Abbildung 45: HPLC-Chromatogramm Maltose (7 Tage, aerob/anaerob)

4.2.2 **Quantitative und mechanistische Untersuchungen der Maltoseinkubationen**

4.2.3.1 **Quantifizierung der gebildeten α -Dicarbonylverbindungen aus Maltose in Anwesenheit von OPD**

Die quantitative Bildung der α -Dicarbonyle aus Maltose wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen unter aeroben und anaeroben Bedingungen verfolgt. Dazu wurde täglich der Gehalt der α -Dicarbonyle bestimmt. Im Folgenden wird die Bildung der α -Dicarbonyle aus Maltose in Anwesenheit von OPD dargestellt.

Maltoson-Q (6,41 vs. 1,30 mmol/mol Maltose, 7 Tage) wurde bevorzugt unter oxidativen Bedingungen gebildet. Die Mengen unter anaeroben Bedingungen sind

sehr gering. Unter anaeroben Bedingungen wurde doppelt so viel 1-Desoxymaltoson-Q nachgewiesen wie unter aeroben Bedingungen (10,72 vs. 18,11 mmol/mol Maltose). Dagegen ist die Bildung von 3-Desoxymaltoson-Q unabhängig von Sauerstoff (0,68 vs. 0,76 mmol/mol Maltose). In Abbildung 46 ist die Bildung der Chinoxaline aus Maltose mit intaktem Kohlenstoffgerüst dargestellt.

Morita et al. [44] und Beck et al. [45] beschreiben die Bildung dieser α -Dicarbonylstrukturen. Morita et al. [44] weisen erstmals die Chinoxaline dieser Verbindungen aus Maltose im sauren Milieu nach. Beck et al. [45] beschreiben die Bildung von 1-Desoxymaltoson und 3-Desoxymaltoson aus der Amadori-Verbindung. 1-Desoxymaltoson resultiert dabei als Hauptkomponente.

Die Bildung von 1-Desoxymaltoson und 3-Desoxymaltoson erfolgt nicht-oxidativ über Enolisierung und Dehydrierung. Die Redoxaktivität von 1-Desoxymaltoson ist sehr hoch, daher wird unter aeroben Bedingungen weniger detektiert als unter anaeroben Bedingungen. 3-Desoxymaltoson ist dagegen sehr stabil. Maltoson wird oxidativ aus Maltose gebildet. Die Bildung dieser Verbindungen aus Maltose ist vergleichbar mit der Bildung von 1-Desoxyglucoson, 3-Desoxyglucoson und Glucoson aus Glucose.

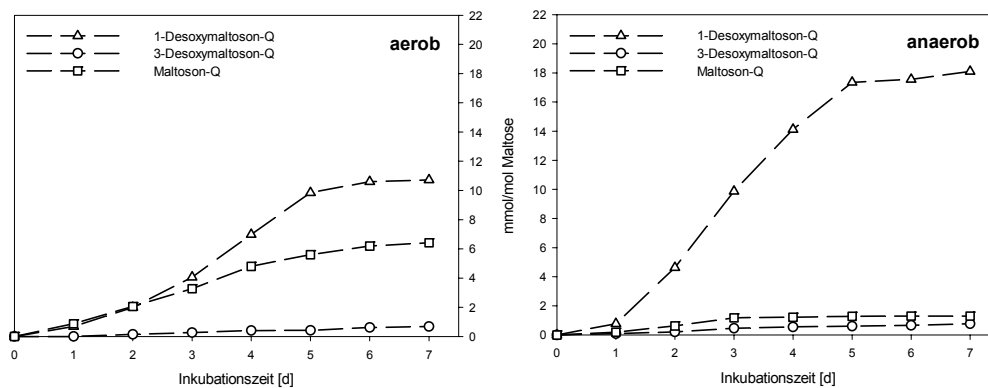


Abbildung 46: Bildung von Maltoson-Q, 1-Desoxymaltoson-Q und 3-Desoxymaltoson-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)

Glucoson-Q wurde nur unter aeroben Bedingungen detektiert (1,40 mmol/mol Maltose), wohingegen 1,4-Didesoxyglucoson-Q bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet wurde (2,13 mmol/mol Maltose). Der Nachweis von 1-Desoxyglucoson-Q erfolgte bevorzugt unter Ausschluss von Sauerstoff (0,21 vs. 0,42 mmol/mol Maltose). Dagegen ist die Bildung von 4-Desoxyglucoson-Q unabhängig von Sauerstoff (0,85 vs. 0,84 mmol/mol Maltose). Die doppelte Menge an 1,2,3-

Tricarbonyl-Q wurde unter anaeroben Bedingungen quantifiziert (5,82 vs. 10,40 mmol/mol Maltose). Eine signifikante Bildung unter anaeroben Bedingungen zeigte das 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q (0,24 vs. 2,04 mmol/mol Maltose). 2,3,4-Tricarbonyl-Q wurde bevorzugt unter anaeroben Bedingungen (1,05 vs. 1,30 mmol/mol Maltose) nachgewiesen. Die Bildung der C-6-Verbindungen ist in Abbildung 48 dargestellt.

Huber und Ledl [7] erwähnen erstmals die Existenz von 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson. Reihl et al. [8] schlagen einen Bildungsweg ausgehend von Disacchariden vor. In der vorliegenden Arbeit wurde 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson bevorzugt unter anaeroben Bedingungen gebildet. Die Bildung erfolgt über eine 2,3-Enolisierung.

Hollnagel und Kroh [40] postulieren einen Bildungsweg für 1,4-Didesoxyglucoson via „Peeling off“ aus Oligosacchariden. Bravo et al. [42] identifiziert diese Verbindung erstmals in Bier. In der vorliegenden Arbeit wurde 1,4-Didesoxyglucoson nur unter anaeroben Bedingungen detektiert, d.h. die Bildung ist unabhängig von Sauerstoff. Ein möglicher Precursor für die Bildung dieser Verbindung ist 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson.

Larsen et al. [46] beschreiben die Bildung des 1,2,3-Tricarbonyls in Modellreaktionen mit Oxomolybdoenzym. Gabriel et al. [47] identifizieren das 1,2,3-Tricarbonyl in Reaktionen von Xylose und 6-Desoxy-D-glucose mit Enzymen. In dieser Studie ist die Bildung von 1,2,3-Tricarbonyl unabhängig von Sauerstoff. Als Ausgangsverbindung für die Bildung des 1,2,3-Tricarbonyls wird das 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson vorgeschlagen. Diese Verbindung zeigt eine Redoxaktivität. Zum einen wird die Dicarbonylstruktur reduziert und dann das Amin eliminiert, woraus 1,4-Didesoxyglucoson resultiert. Auf der anderen Seite kann die Aminofunktion zum 1,2,3-Tricarbonyl oxidiert werden.

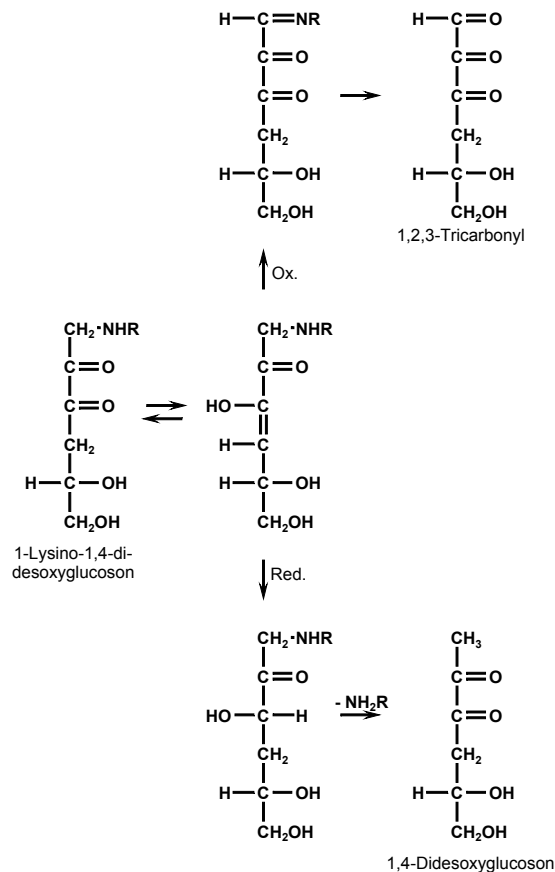


Abbildung 47: Redoxaktivität von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson

4-Desoxyglucoson wurde aus Polysacchariden von Whistler und BeMiller [48] isoliert. Morita et al. [43] identifizieren das Chinoxalin dieser Verbindung in Inkubationen von Maltose mit OPD. 4-Desoxyglucoson-Q wurde in gleichen Mengen unter aeroben und anaeroben Versuchsbedingungen quantifiziert. Die Bildung verläuft nicht-oxidativ über eine 2,3-Enolisierung. Die Bildung dieser C-6-Verbindung ist unabhängig von der Anwesenheit der Aminosäure. Lysin katalysiert die Bildung, ist jedoch nicht direkt beteiligt.

In der Literatur gibt es bisher keine Angaben über die Bildung von 2,3,4-Tricarboxyl.

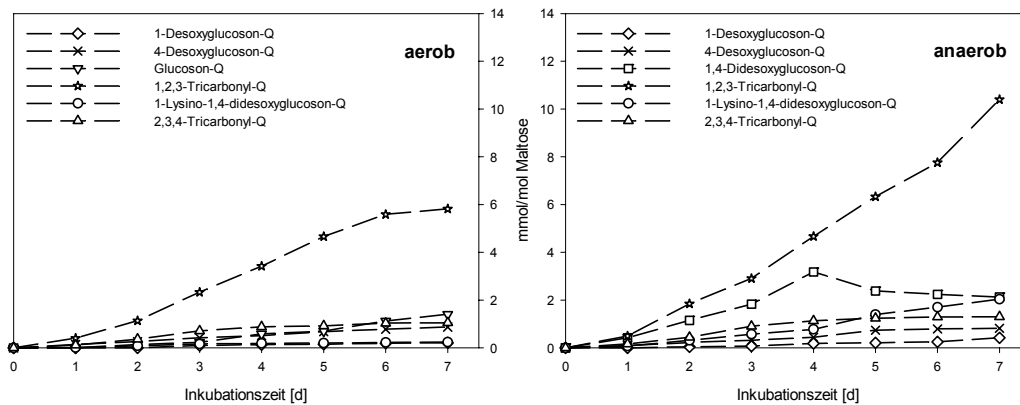


Abbildung 48: Bildung von 1-Desoxyglucoson-Q, 4-Desoxyglucoson-Q, Glucoson-Q, 1,2,3-Tricarboxyl-Q, 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q, 2,3,4-Tricarboxyl-Q und 1,4-Didesoxyglucoson-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)

3-Desoxypentosen-Q wurde bevorzugt unter aeroben Bedingungen (10,02 vs. 1,39 mmol/mol Maltose) gebildet. In sehr geringen Konzentrationen wurde 3,4-Didesoxypentosen-Q sowohl unter oxidativen als auch nicht-oxidativen Bedingungen quantifiziert (0,07 vs. 0,87 mmol/mol Maltose). Die Bildung ist unabhängig von Sauerstoff. Die Kinetik der C-5-Fragmente aus Maltose ist in Abbildung 50 dargestellt.

Hollnagel und Kroh [17] charakterisieren 3-Desoxypentosen als Reaktionsprodukt der Maltose. Es wird angenommen, dass das 2,3-Enaminol über eine Eliminierung des Glucosylrestes am C-4-Atom zum 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson reagiert. Durch Umlagerung und anschließender Retro-Claisen entsteht unter Freiwerden von Ameisensäure ein Pentosen-Intermediat, welches zum 3-Desoxypentosen oxidiert. Mavric und Henle [18] isolieren 3-Desoxypentosen aus Lactose.

In der vorliegenden Arbeit war die Bildung von 3-Desoxypentosen aus Maltose abhängig von Sauerstoff. Ein möglicher Precursor für die Bildung ist das Maltoson, welches oxidativ gebildet wird. Durch Abspaltung von Ameisensäure entsteht aus dem Maltoson-Derivat ein 1,2-Endiol. Da die Abspaltung der Glucose gegenüber einer Enolisierung begünstigt ist, kommt es nach Eliminierung der Glucose im darauffolgenden Schritt zur Bildung von 3-Desoxypentosen (Abb. 49). Während aus der Glucose über das Glucoson das 1-Desoxypentosen gebildet wird (vgl. 4.1.5.2), entsteht aus dem Maltoson kein 1-Desoxypentosen, weil eine weitere Enolisierung zum 2,3-Endiol nicht begünstigt ist.

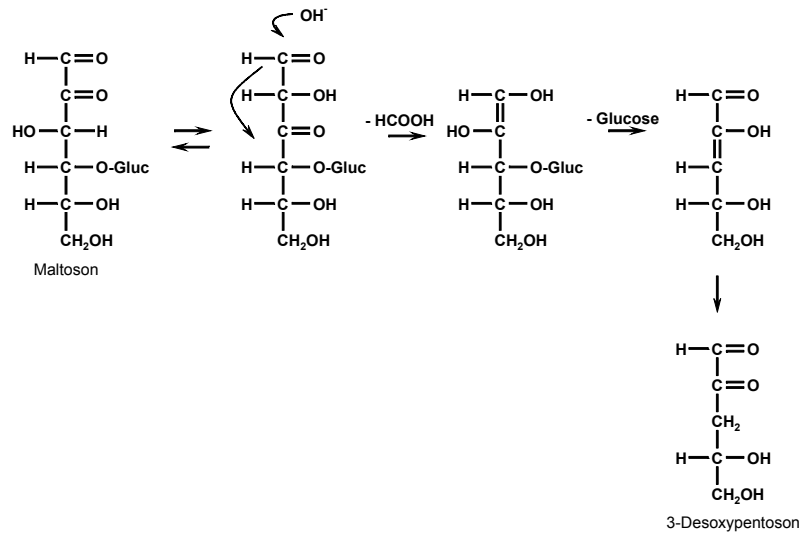


Abbildung 49: Bildung von 3-Desoxypentosen aus Maltoson

Mavric und Henle [18] gelang es das Chinoxalin von 3,4-Didesoxypentosen als ein spezifisches Spaltungsprodukt von Oligosacchariden mit 1,4-Verknüpfung zu isolieren.

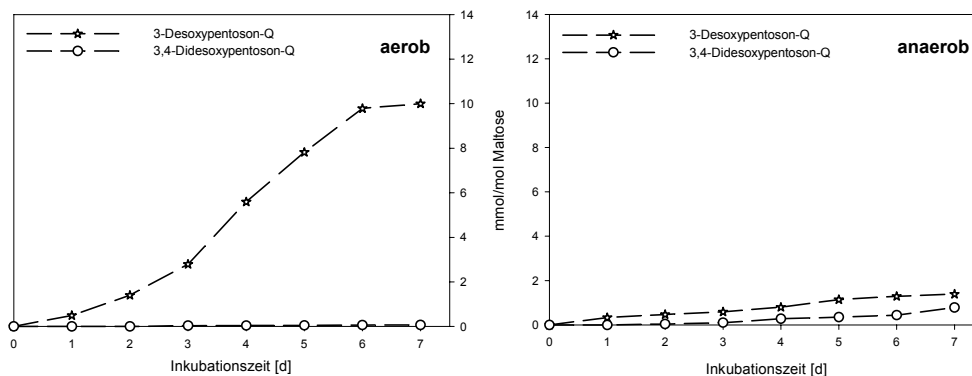


Abbildung 50: Bildung von 3-Desoxypentosen-Q und 3,4-Didesoxypentosen-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)

Die doppelte Menge an 3-Desoxythreoson-Q wurde unter anaeroben Bedingungen quantifiziert (2,33 vs. 4,20 mmol/mol Maltose). In deutlich geringeren Konzentrationen erfolgte die Bildung von 1-Desoxythreoson-Q (0,88 vs. 1,32 mmol/mol Maltose). Diacetyl-Q wurde unter anaeroben Bedingungen in sehr geringen Konzentrationen (4,19 vs. 0,34 mmol/mol Maltose) nachgewiesen. Die Bildung der C-4-Fragmente aus Maltose ist in Abbildung 51 dargestellt.

Hollnagel und Kroh [26] identifizieren Diacetyl als Reaktionsprodukt aus Glucose und Maltose in Anwesenheit eines Amins. Desweiteren wurde Diacetyl als

Aromakomponente in Bier [42, 49], Wein [50] und Kaffee [51] gefunden. In der vorliegenden Studie wurde Diacetyl bevorzugt unter aeroben Bedingungen gebildet. Da Diacetyl in den Glucoseinkubationen nicht nachgewiesen wurde, verläuft die Bildung vermutlich über die Disaccharidchemie.

1-Desoxythreoson und 3-Desoxythreoson entstehen in der Hexosenchemie (Glucose) aus 1-Desoxyglucoson (vgl. 4.1.6). Dabei entsteht mehr 1-Desoxythreoson als 3-Desoxythreoson. In Inkubationen mit Maltose entsteht deutlich mehr 3-Desoxythreoson als 1-Desoxythreoson. Dies lässt vermuten, das 3-Desoxythreoson nicht aus dem 1-Desoxyglucoson, und damit nicht aus der Glucose hervorgeht. Die Bildung des 3-Desoxythreosons erfolgt vermutlich über den Abbau der Disaccharide. 1-Desoxythreoson entsteht dagegen aus der Glucose.

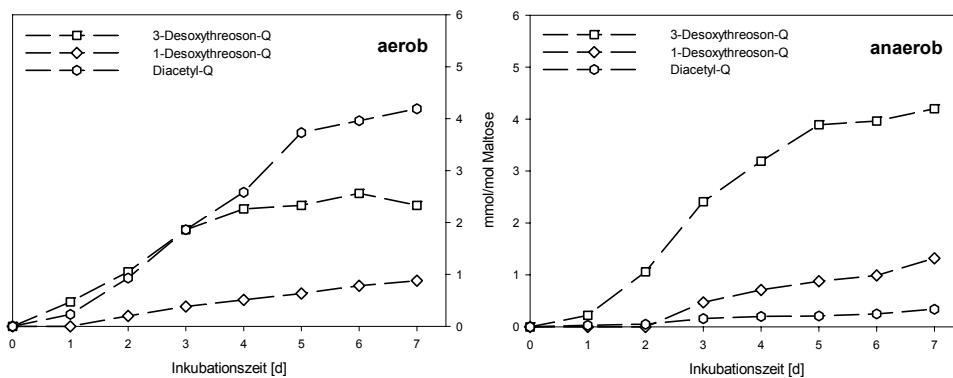


Abbildung 51: Bildung von 3-Desoxythreoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und Diacetyl-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)

Aus Abbildung 52 geht hervor, dass die Bildung von Methylglyoxal-Q unabhängig von Sauerstoff ist (0,35 vs. 0,40 mmol/mol Maltose). Dagegen wurde Glyoxal-Q bevorzugt unter aeroben Bedingungen quantifiziert (5,73 vs. 1,01 mmol/mol Maltose). Glyoxal-Q entstand bevorzugt aerob (1,40 vs. 1,09 mmol/mol Maltose). Glyoxal-Q entstand bevorzugt aerob (1,40 vs. 1,09 mmol/mol Maltose).

Velisek et al. [52] beschreiben Glyoxal-Q als Reaktionsprodukt aus Glyoxal und Glycerin. Pickett und Yap [53] identifizieren diese Verbindung als Produkt aus Oxalaldehyd. Durch Oxidation entsteht aus Glycol Glyoxal-Q [5]. In Inkubationen mit Glucose wurde keine Glyoxal-Q identifiziert. Die Verbindung kann daher nicht aus dem Glyoxal hervorgehen. Die geringen Mengen an Methylglyoxal und Glyoxal lassen darauf schließen, dass diese beiden α -Dicarbonyl-Abbauprodukte der Glucose sind.

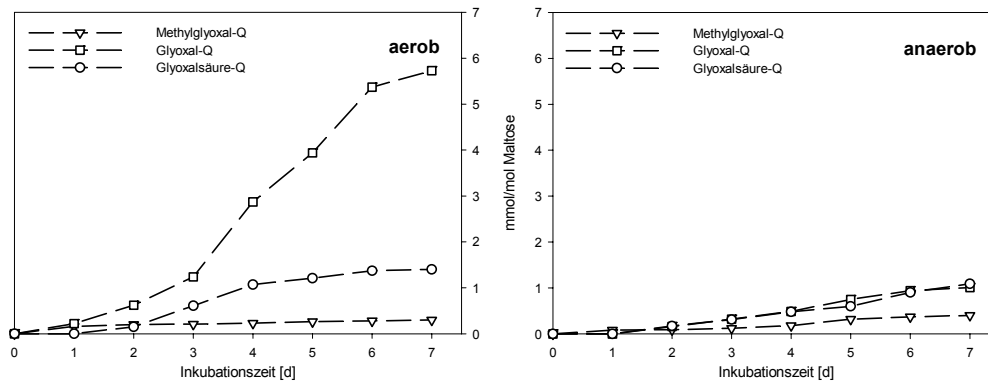


Abbildung 52: Bildung von Methylglyoxal-Q, Glyoxal-Q und Glyoxalsäure-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)

4.2.3.2 Modelluntersuchungen zum Abbau von Maltose und Lysin in Abwesenheit von OPD

In den Untersuchungen zur Bildung von α -Dicarbonylen aus Maltose und Lysin in Abwesenheit von OPD wurden die α -Dicarbonylverbindungen aus den Modelluntersuchungen direkt nach definierten Reaktionszeiten mit OPD in stabile Chinoxaline überführt. Es wurde die Bildung der α -Dicarbonyle nach 0, 1, 3, 5 und 7 Tagen untersucht.

3-Desoxymaltoson-Q wurde in hohen Konzentrationen unter aeroben und anaeroben Bedingungen nachgewiesen (1,68 vs. 1,55 mmol/mol Maltose, 7 Tage). Die Bildung dieser α -Dicarbonylverbindung ist unabhängig von Sauerstoff. 1-Desoxymaltoson-Q wurde bevorzugt anaerob gebildet (0,36 vs. 0,58 mmol/mol Maltose). Dagegen erfolgte die Bildung des Maltoson-Q bevorzugt oxidativ (0,26 vs. 0,18 mmol/mol Maltose). Abbildung 53 stellt die Bildung der Chinoxaline aus Maltose mit vollständigem Kohlenstoffgerüst dar.

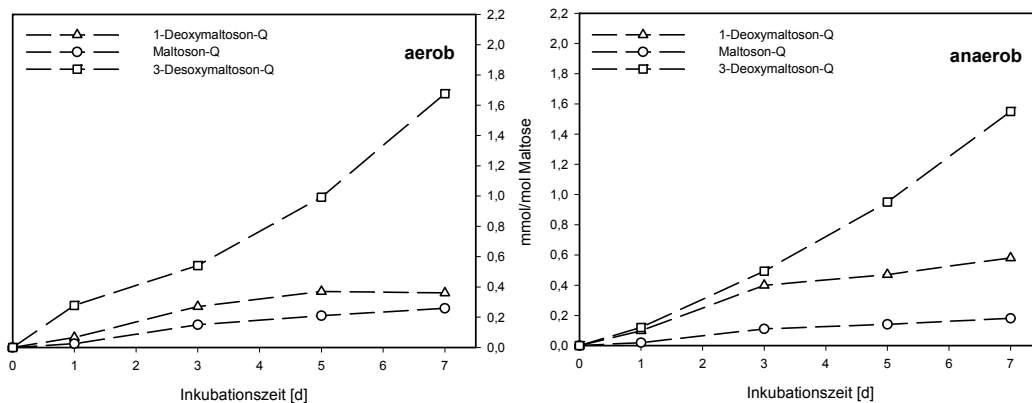


Abbildung 53: Bildung von 3-Desoxymaltoson-Q, 1-Desoxymaltoson-Q und Maltoson-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD)

Aus Abbildung 54 geht hervor, dass 1,2,3-Tricarboxyl-Q mit einer Konzentration von 0,51 mmol/mol Maltose das dominierende Chinoxalin darstellt. In deutlich geringeren Konzentrationen wurden 4-Desoxyglucoson-Q (0,05 mmol/mol Maltose), Glucoson-Q (0,05 mmol/mol Maltose) und 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q (0,08 mmol/mol Maltose) detektiert. Glucoson-Q wurde nur unter aeroben Bedingungen nachgewiesen. Unter Ausschluss von Sauerstoff wurden 1,2,3-Tricarboxyl-Q (2,57 mmol/mol Maltose) und 1,4-Didesoxyglucoson-Q (1,65 mmol/mol Maltose) in hohen Konzentrationen detektiert. Die Bildung von 1,4-Didesoxyglucoson-Q erfolgte unter Ausschluss von Sauerstoff. 0,43 mmol/mol Maltose wurden an 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q unter anaeroben Bedingungen detektiert. Die Bildung von 4-Desoxyglucoson-Q (0,03 mmol/mol Maltose) war unabhängig von Sauerstoff. 2,3,4-Tricarboxyl-Q wurde in Abwesenheit von OPD nicht nachgewiesen.

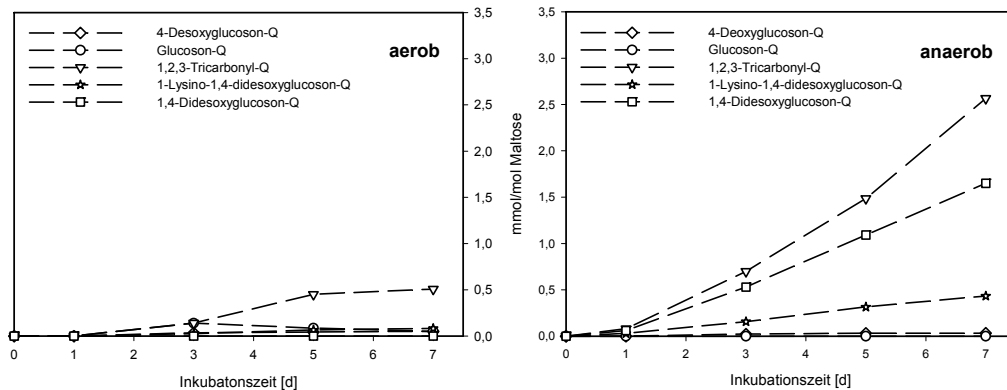


Abbildung 54: Bildung von 4-Desoxyglucoson-Q, Glucoson-Q, 1,2,3-Tricarbonsyl-Q, 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q und 1,4-Didesoxyglucoson-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD)

3,4-Didesoxy-pentosen-Q entstand nahezu unabhängig von Sauerstoff (0,39 vs. 0,37 mmol/mol Maltose). Deutlich bevorzugt wurde 3-Desoxy-pentosen-Q, jedoch in geringeren Konzentrationen (0,25 vs. 0,14 mmol/mol Maltose). 3-Desoxy-threosen-Q wurde bevorzugt unter nicht-oxidativen Bedingungen gebildet (0,06 vs. 0,12 mmol/mol Maltose). Diacetyl-Q bildete das Hauptchinoxalin unter anaeroben Bedingungen mit einer Konzentration von 1,26 mmol/mol Maltose. Geringere Mengen wurden unter aeroben Bedingungen quantifiziert (0,24 mmol/mol Maltose). Abbildung 55 stellt die Bildung der C-4- und C-5-Fragmente aus Maltose dar.

3,4-Didesoxy-pentosen wurde in Anwesenheit von OPD bevorzugt nicht-oxidativ gebildet. Diacetyl zeigte dagegen eine Abhängigkeit von Sauerstoff. In OPD-Abwesenheit erfolgte die Bildung genau entgegengesetzt.

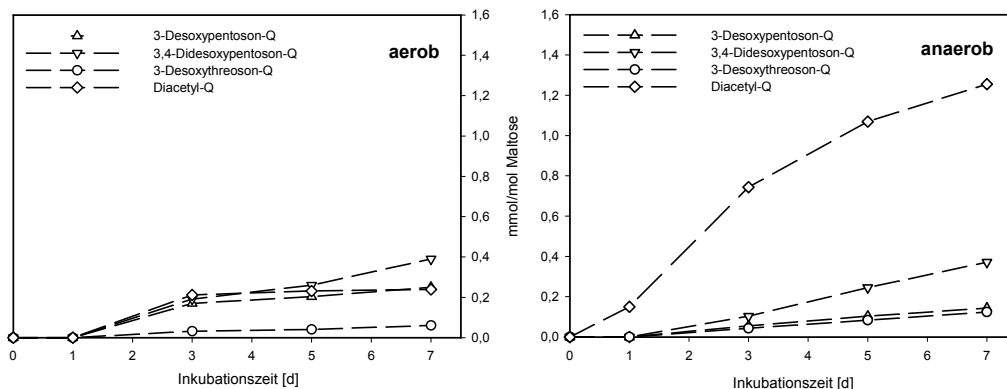


Abbildung 55: Bildung von 3-Desoxy-pentosen-Q, 3,4-Didesoxy-pentosen-Q, 3-Desoxy-threosen-Q und Diacetyl-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD)

Glyoxal-Q zeigte eine bevorzugte Bildung unter oxidativen Bedingungen (0,25 vs. 0,06 mmol/mol Maltose). Dagegen wurden Methylglyoxal-Q (0,02 vs. 0,03 mmol/mol Maltose) unabhängig und Glyoxalsäure-Q (0,02 vs. 0,15 mmol/mol Maltose) bevorzugt unter nicht-oxidativen Bedingungen nachgewiesen (Abb. 56).

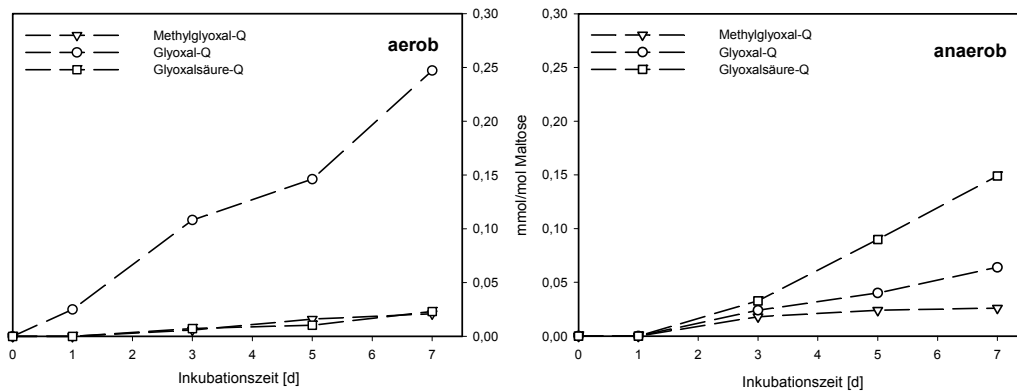


Abbildung 56: Bildung von Methylglyoxal-Q, Glyoxal-Q und Glyoxalsäure-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD)

4.2.4 Zusammenfassung

Als spezifische α -Dicarbonylverbindungen in Inkubationen von Maltose wurden Maltoson-Q, 1-Desoxymaltoson-Q, 3-Desoxymaltoson-Q, 4-Desoxyglucoson-Q, 1,2,3-Tricarbonyl-Q, 2,3,4-Tricarbonyl-Q, 1,4-Didesoxyglucoson-Q, 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q, 3-Desoxypentosen-Q, 3,4-Didesoxypentosen-Q, Diacetyl-Q, und Glyoxalsäure-Q identifiziert.

In Anwesenheit von OPD wurden Maltoson, 1-Desoxymaltoson, 1,2,3-Tricarbonyl, 3-Desoxypentosen, 3-Desoxythreoson als Chinoxaline in hohen Konzentrationen quantifiziert, während in Abwesenheit von OPD 3-Desoxymaltoson-Q, 1,4-Didesoxyglucoson-Q und 1,2,3-Tricarbonyl-Q als dominierende α -Dicarbonyle nachgewiesen wurden.

In Abwesenheit eines Abfangreagenzes werden hochreaktive Verbindungen, wie das 1,2,3-Tricarbonyl und 2,3,4-Tricarbonyl sofort nach deren Bildung abgebaut. Strukturen mit geringerer Reaktivität, z.B. 3-Desoxymaltoson, häufen sich dagegen in Abwesenheit von OPD an. Verbindungen die aus der Glucose entstehen, z.B. 3-Desoxyglucoson, 1-Desoxyglucoson und 1-Desoxythreoson wurden in Abwesenheit von OPD auf Grund der geringen Konzentrationen nicht mehr nachgewiesen.

Während bei der Glucose die β -Dicarbonylspaltung im Vordergrund steht, spielt bei der Bildung der Fragmente in Maltoseuntersuchungen die Qualität der Abgangsgruppen, insbesondere die 1,4-glycosidische Bindung, eine entscheidende Rolle. Für 3,4-Didesoxypentosen, 3-Desoxythreosen, Glyoxalsäure und Diacetyl wurden keine Bildungsmechanismen postuliert. Diesbezüglich müssen weitere Abbaureaktionen bzw. Untersuchungen mit markierter Maltose durchgeführt werden. In Abbildung 57 wird die Bildung der α -Dicarbonyle aus Maltose dargestellt.

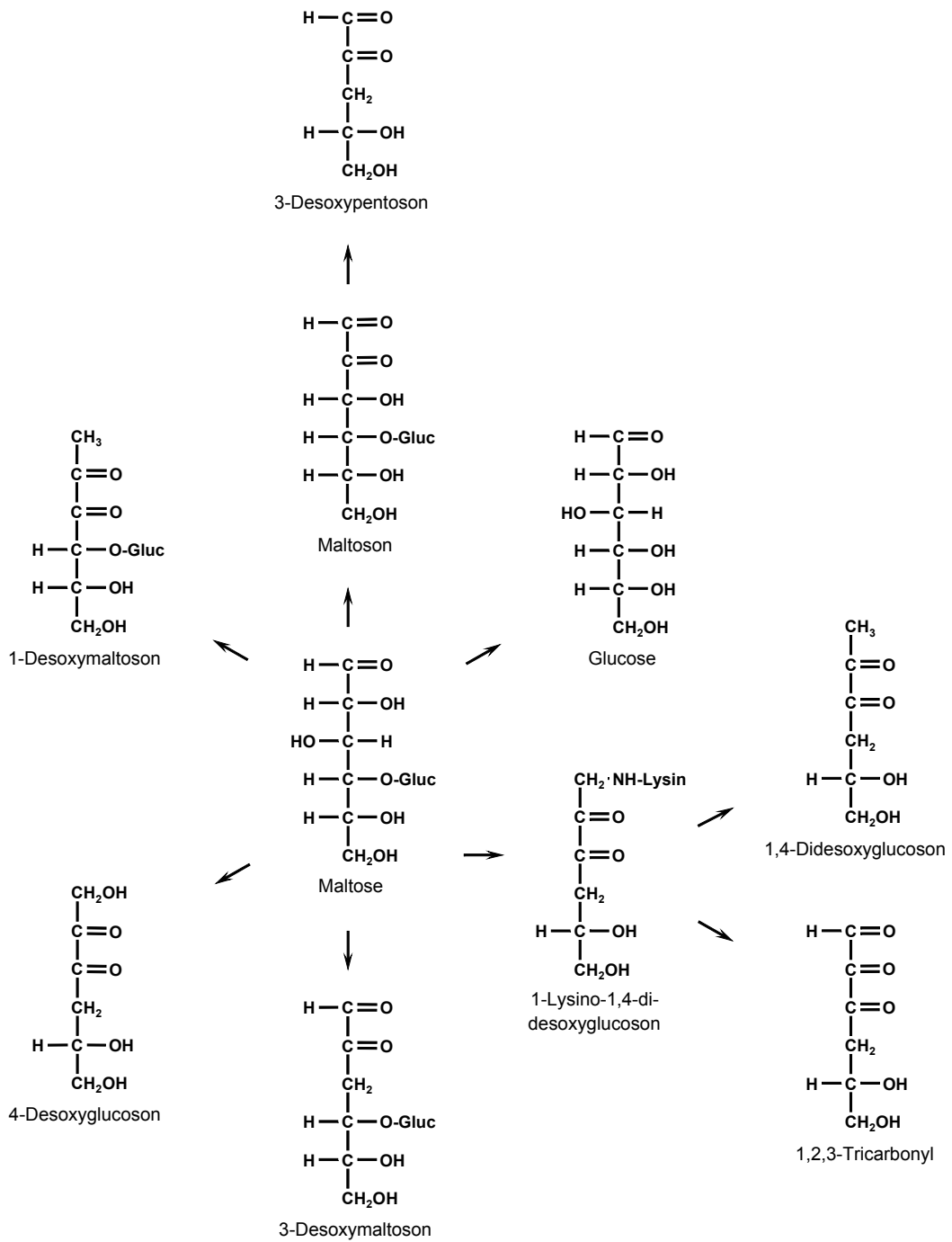


Abbildung 57: Reaktionswege für die Bildung von α -Dicarbonylen aus Maltose

4.3 Modellreaktionen zum Abbau von Lactose in Gegenwart von OPD

Die quantitative Bildung der α -Dicarbonyle aus Lactose in Anwesenheit von OPD wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen unter aeroben und anaeroben Bedingungen verfolgt. Die Probenahme erfolgte nach 0, 2, 4, 6 und 7 Tagen.

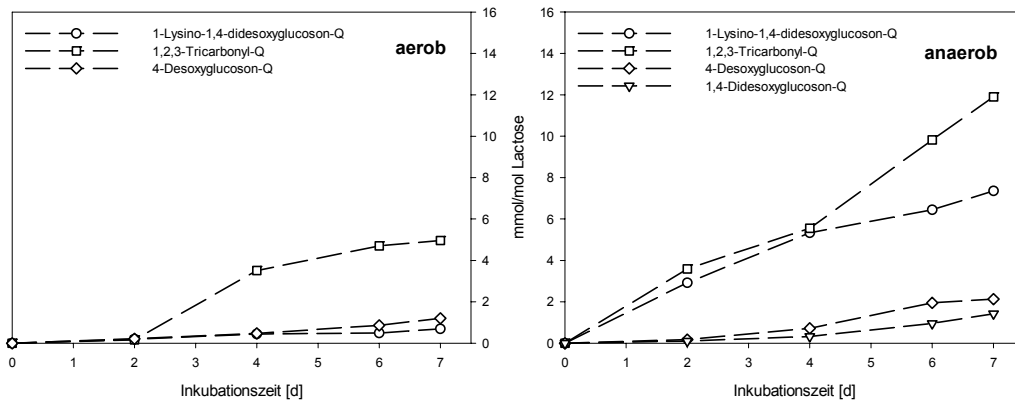


Abbildung 58: Bildung von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson-Q, 1,2,3-Tricarbonyl-Q, 4-Desoxyglucoson-Q und 1,4-Dideoxyglucoson-Q aus Lactose (in Anwesenheit von OPD)

Die doppelte Menge an 1,2,3-Tricarbonyl-Q bildete sich unter anaeroben Bedingungen (4,96 vs. 11,90 mmol/mol Lactose, 7 Tage). 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson-Q (0,69 vs. 7,35 mmol/mol Lactose) und 4-Desoxyglucoson-Q (1,20 vs. 2,13 mmol/mol Lactose) wurden bevorzugt unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen. 1,4-Dideoxyglucoson-Q wurde ausschließlich unter anaeroben Bedingungen gebildet (1,42 mmol/mol Lactose).

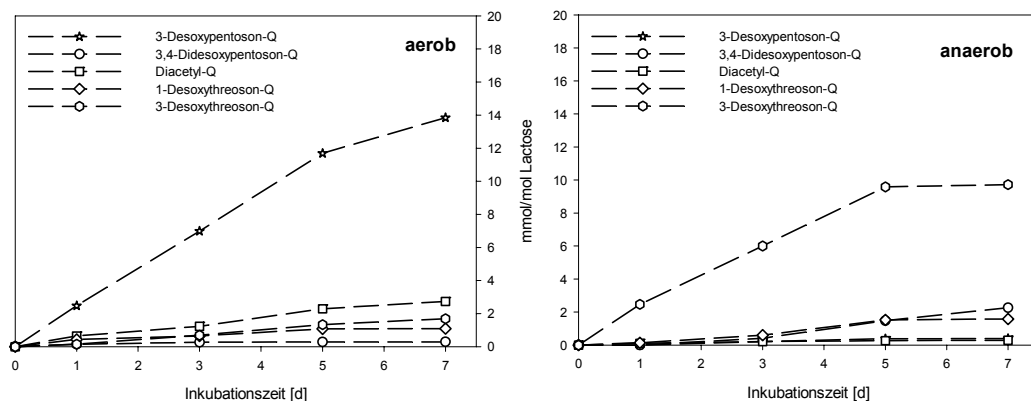


Abbildung 59: Bildung von 3-Desoxypentosen-Q, 3,4-Dideoxypentosen-Q, Diacetyl-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxythreoson-Q aus Lactose (in Anwesenheit von OPD)

3-Desoxypentosen-Q (13,84 vs. 0,39 mmol/mol Lactose) wurde als dominierendes Chinoxalin in Lactoseinkubationen unter aeroben Bedingungen nachgewiesen. Unter Ausschluss von Sauerstoff ist die Konzentration sehr gering. Dem gleichen Muster, in geringeren Konzentrationen folgte das Diacetyl-Q (2,73 vs. 0,29 mmol/mol Lactose). Dagegen ist die Bildung von 3,4-Didesoxypentosen-Q (0,29 vs. 2,26 mmol/mol Lactose), 1-Desoxythreosen-Q (1,09 vs. 1,58 mmol/mol Lactose) und 3-Desoxythreosen-Q (1,69 vs. 9,72 mmol/mol Lactose) unabhängig von Sauerstoff. Die höchste Konzentration zeigte das 3-Desoxythreosen-Q unter anaeroben Bedingungen.

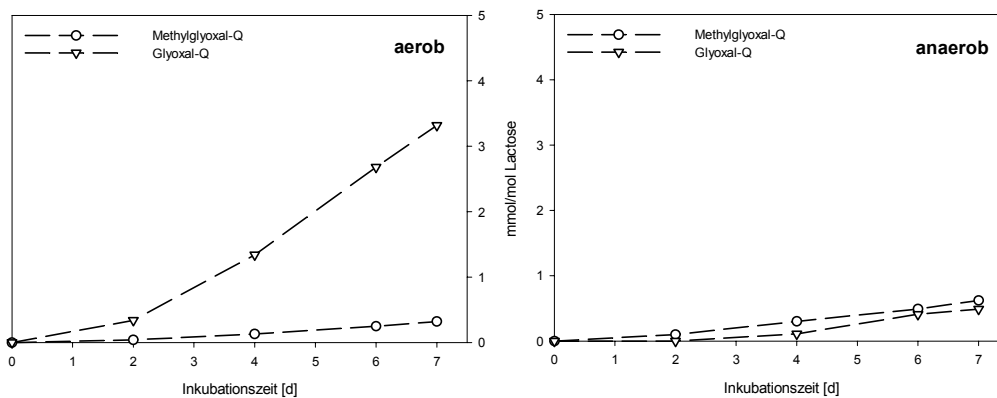


Abbildung 60: Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Lactose (in Anwesenheit von OPD)

Die Bildung von Glyoxal-Q ist abhängig von Sauerstoff (3,32 vs. 0,49 mmol/mol Lactose). Dagegen ist die Bildung von Methylglyoxal-Q unabhängig von Sauerstoff (0,32 vs. 0,62 mmol/mol Lactose).

Die Lactosone, 1-Desoxyglucoson, Glucoson und 2,3,4-Tricarbonyl wurden in den Inkubationen der Lactose nicht identifiziert.

In Untersuchungen zum Abbau von Lactose wurden elf Substanzen quantifiziert. Die Daten korrelieren mit den Daten zum Abbau von Maltose in Anwesenheit von OPD. Einen Unterschied zeigt die Bildung von 4-Desoxyglucoson. Unter anaeroben Bedingungen wurde mehr 4-Desoxyglucoson nachgewiesen als unter aeroben Bedingungen. In Inkubationen mit Maltose ist die Konzentration unter oxidativen und nicht-oxidativen Bedingungen annähernd gleich.

Da eine Übereinstimmung der Konzentrationen, mit Ausnahme von 4-Desoxyglucoson, vorliegt, kann gesagt werden, dass die Untersuchungen der Lactose die Ergebnisse der Maltose bestätigen.

4.4 Synthese von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson

1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson ist eine bedeutende α -Dicarbonylstruktur beim Abbau von lebensmittelrelevanten Disacchariden. In der vorliegenden Arbeit wird die Bildung von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson in Reaktionsgemischen von Glucose und Maltose mit Lysin untersucht. Abschließende Aussagen zur Reaktivität und damit zur Bedeutung von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson auf den Abbau von Disacchariden lassen sich jedoch erst nach Synthese der authentischen Referenz treffen.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Hiller [54] wurde erfolgreich das Chinoxalin von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucosons (Abb. 61) synthetisiert. Die Synthese wurde in fünf Stufen durchgeführt. Der erste Schritt der Synthese besteht in der Herstellung des Chinoxalins aus Maltose und OPD. Die Synthese findet im alkalischen Milieu statt, da hier verstärkt die gewünschte Enolisierung reduzierender Zucker auftritt. Anschließende Glucoseabspaltung in β -Position führt zum 4-Desoxyglucoson, das mit OPD zum Chinoxalin kondensiert. Im darauffolgenden Schritt werden die beiden Hydroxylgruppen der Dihydroxypropylseitenkette durch Benzylidierung geschützt. In der dritten Stufe der Synthese wird die freie Hydroxylgruppe der Hydroxymethylseitenkette zur Carbonylfunktion oxidiert. Durch milde Säurehydrolyse wird die Benzylidenschutzgruppe abgespalten. Als Aminkomponente wird N^{α} -t-BOC-Lysin eingesetzt. Durch Zugabe von Salzsäure wird im fünften Schritt die t-BOC-Gruppe abgespalten.

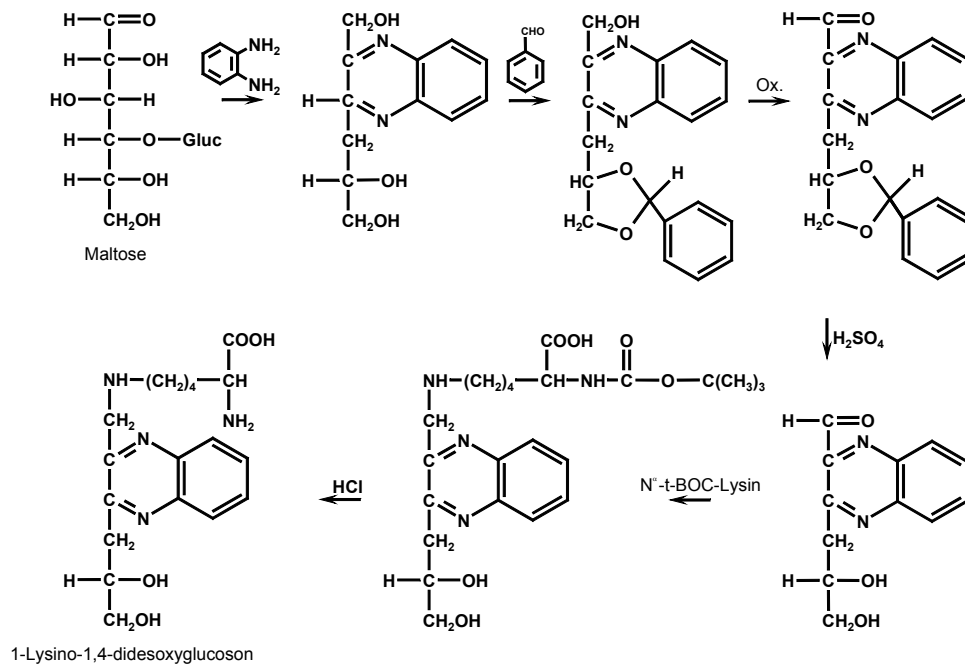


Abbildung 61: Synthese 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson nach Hiller [54]

1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson-Chinoxalin wurde im Rahmen dieser Arbeit als Referenzsubstanz für qualitative und quantitative Untersuchungen von Glucose und Maltose verwendet.

In dieser Arbeit soll das 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson als freie α -Dicarbonylverbindung synthetisiert werden. Für die Synthese wird der in Abbildung 62 dargestellte Syntheseweg vorgeschlagen. Als Ausgangsstoff für die Synthese dient 4,5-Dihydroxy-2-oxo-pentansäure. Da diese Verbindung verschiedene reaktive funktionelle Gruppen aufweist, wird als erster Schritt die Einführung einer Schutzgruppe vorgeschlagen. Dazu wird das 1,3-Dioxolan gewählt. Die Schutzgruppe kann leicht im Säuren abgespalten werden [55]. Geschützt wird die an Position C-2 befindliche Carbonylfunktion. Im zweiten Schritt wird aus der Säuregruppe ein Säurehalogenid gebildet. Dies ist notwendig, um im dritten Schritt die Kohlenstoffkette, unter Verwendung von Diazomethan, um eine Methylgruppe zu erweitern. Im vierten Schritt der Synthese wird ein geschütztes Lysin an die Methylgruppe gebunden und somit die Aminofunktion eingeführt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen erhält man das 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson.

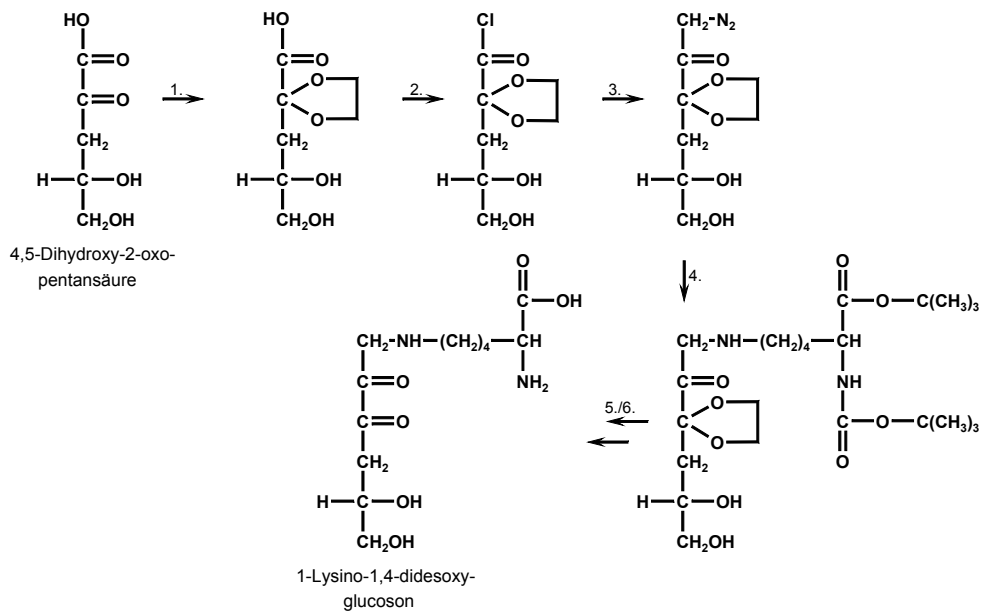


Abbildung 62: Möglicher Syntheseweg von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson

Um die verschiedenen Synthesestufen im Einzelnen zu testen, wurden verschiedene Modellversuche durchgeführt. Dazu wurden einfache Verbindungen wie Brenztraubensäure, Buttersäure und Buttersäurechlorid verwendet. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Synthesestufen vorgestellt.

4.4.1 Stufe 1: Einführung einer Schutzgruppe

Die Einführung der 1,3-Dioxolanschutzgruppe erfolgte nach Bogatskii et al. [56]. Es wurde Brenztraubensäure und Ethylenglycol in Toluol gelöst und nach Zugabe eines Kationenaustauschers unter Rückfluss gekocht (Abb. 63). Nach der Vakuumdestillation wurden vier Fraktionen erhalten, die mittels GC/FID und GC/MS vermessen wurden.

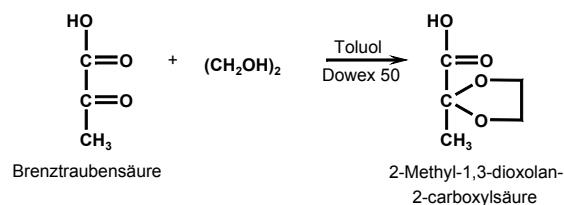


Abbildung 63: Darstellung von 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure

Dazu wurde ein Aliquot der Lösung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid silyliert bzw. mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert. In Abbildung 64 sind die GC/MS Messungen der silylierten bzw. der derivatisierten Probe dargestellt.

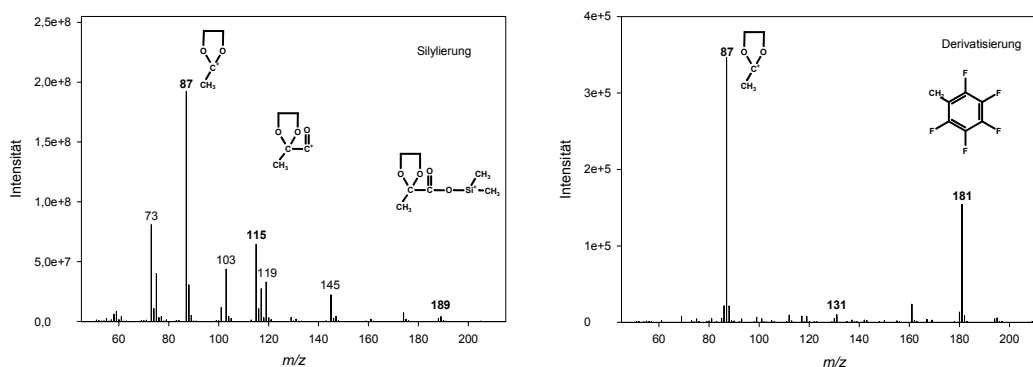


Abbildung 64: GC/MS Silylierung und Derivatisierung

Die molare Masse der silylierten 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure beträgt $m/z=204$. Es wurden folgende charakteristische Fragmentationen identifiziert $m/z=189$, 115 und 87. Die molare Masse der derivatisierten 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure beträgt $m/z=312$. Charakteristische Fragmentationen sind $m/z=181$, 131 und 87. Anhand der GC/MS-Messung wurde die geschützte Brenztraubensäure identifiziert.

4.4.2 Stufe 2: Chlorierung der 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure

Im zweiten Schritt der Synthese wurde die Säurefunktion in ein Säurehalogenid umgewandelt (Abb. 65). Ein wichtiger Faktor hierbei war, dass der ganze Prozess unter milden pH-Bedingungen stattfindet, da die Dioxolan-Schutzgruppe durch Säure leicht abgespalten werden kann. Entsprechend der Literatur nach Devos et al. [57] wurde die geschützte Brenztraubensäure mit 1-Chloro-N,N-dimethyl-2-propenylamin in Dichlormethan umgesetzt. Das Säurehalogenid (gelbe Lösung) wurde am Hochvakuum durch Abziehen des Lösungsmittels erhalten.

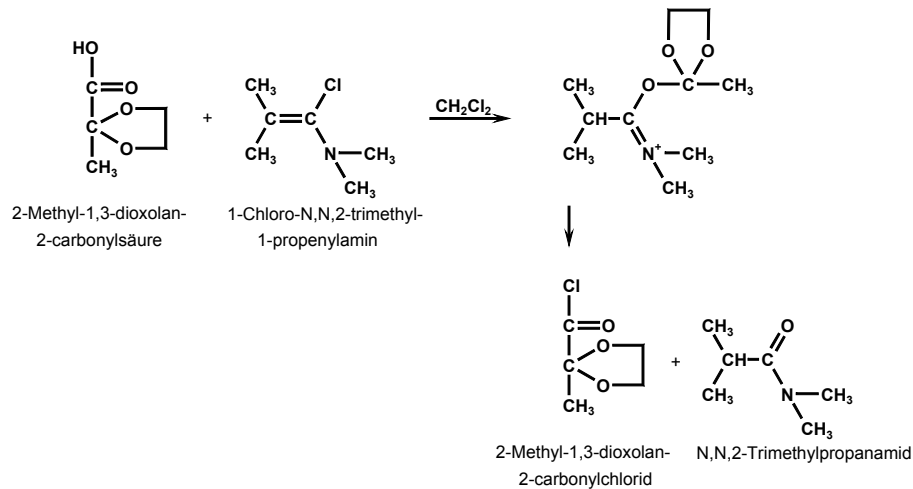


Abbildung 65: Chlorierung von 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carbonsäure

Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels GC/MS (Abb. 66). Es wurden folgende charakteristische Fragmentationen ermittelt. 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carbonylchlorid besitzt eine molare Masse von $m/z=150$ (^{35}Cl) bzw. $m/z=152$ (^{37}Cl). Es wurden die Massen 151 ($^{35}\text{Cl}_{M+1}$) und 153 ($^{37}\text{Cl}_{M+1}$) gefunden. Nach Abspaltung der Cl-Gruppe ergibt sich eine molare Masse von $m/z=116$. Weitere charakteristische Fragmentationen sind $m/z=87$ und 72 .

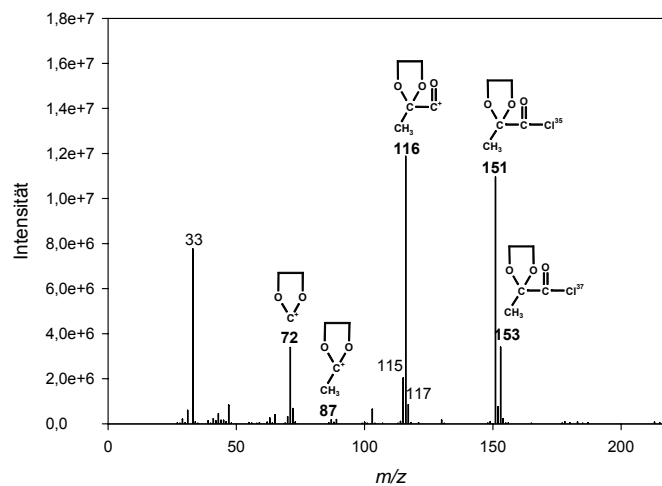


Abbildung 66: GC/MS-Messung von 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carbonylchlorid

4.4.3. Herstellung von Diazomethan

Die Herstellung von Diazomethan erfolgte nach Hudlicky [58]. Es wurde Diazald (*N*-Methyl-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamid) mit Kaliumhydroxid umgesetzt (Abb. 67). Diazomethan wurde als gelbes Gas in Diethylether aufgefangen. Für die Umsetzung mit dem Säurechlorid wurde ein Überschuss der etherischen Diazomethanlösung verwendet.

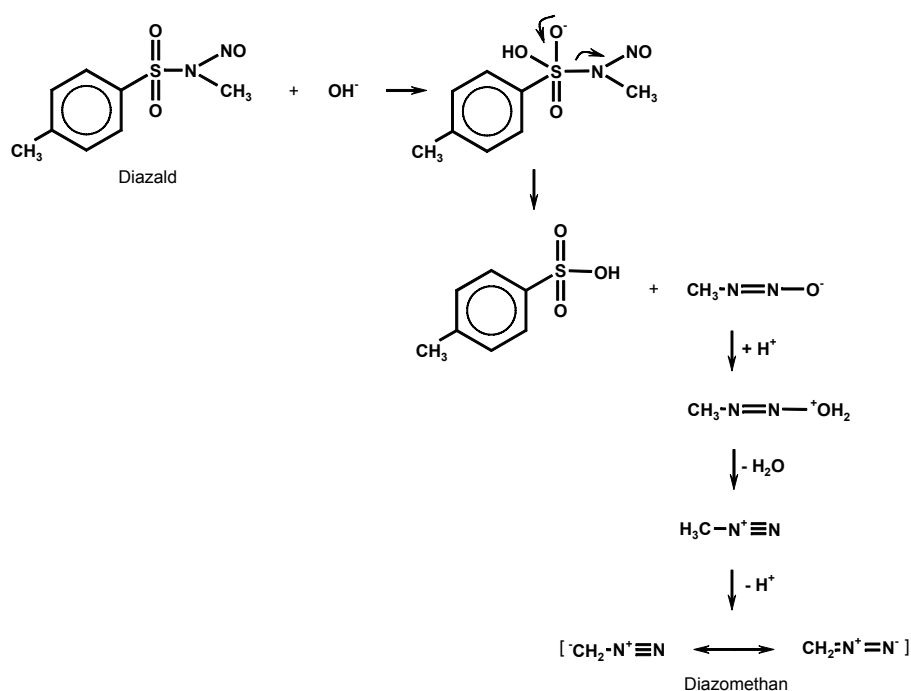


Abbildung 67: Darstellung von Diazomethan aus Diazald

4.4.4 Stufe 3: Kettenverlängerung um eine Methylgruppe

In der folgenden Synthesestufe wurde 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carbonylchlorid um eine Methylgruppe verlängert. Für die Kettenverlängerung wurde Diazomethan eingesetzt. Die Herstellung wird unter 4.3.3 beschrieben. Diazomethan wurde im Überschuss zum Säurechlorid gegeben und einige Minuten gerührt. Als Alternative zu 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carbonylchlorid wurde Buttersäurechlorid mit Diazomethan umgesetzt (Abb. 68).

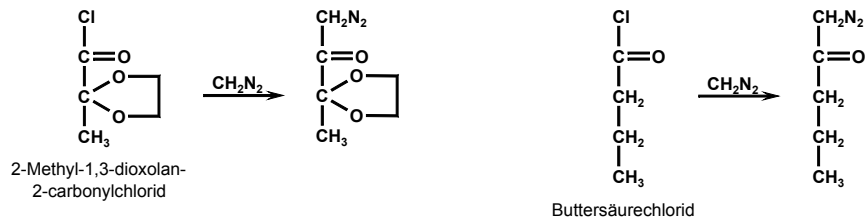


Abbildung 68: Umsetzung des Säurechlorids mit Diazomethan

4.4.5 Darstellung von N^α -t-BOC-Lysin-t-Butylester

N^α -t-BOC- N^ϵ -CBZ-Lysin wurde mit t-Butylester unter Säurekatalyse zu N^α -t-BOC-Lysin-t-Butylester umgewandelt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC. Nach Abziehen des Lösungsmittels und Reinigen über Säulenchromatographie wurden die Fraktionen vereinigt. Im zweiten Schritt der Synthese wurde durch Hydrogenolyse die Benzylidenschutzgruppe an der ϵ -Aminogruppe abgespalten. Es resultierte ein gelbliches Öl. In Abbildung 69 ist die Bildung von N^α -t-BOC-Lysin-t-Butylester dargestellt.

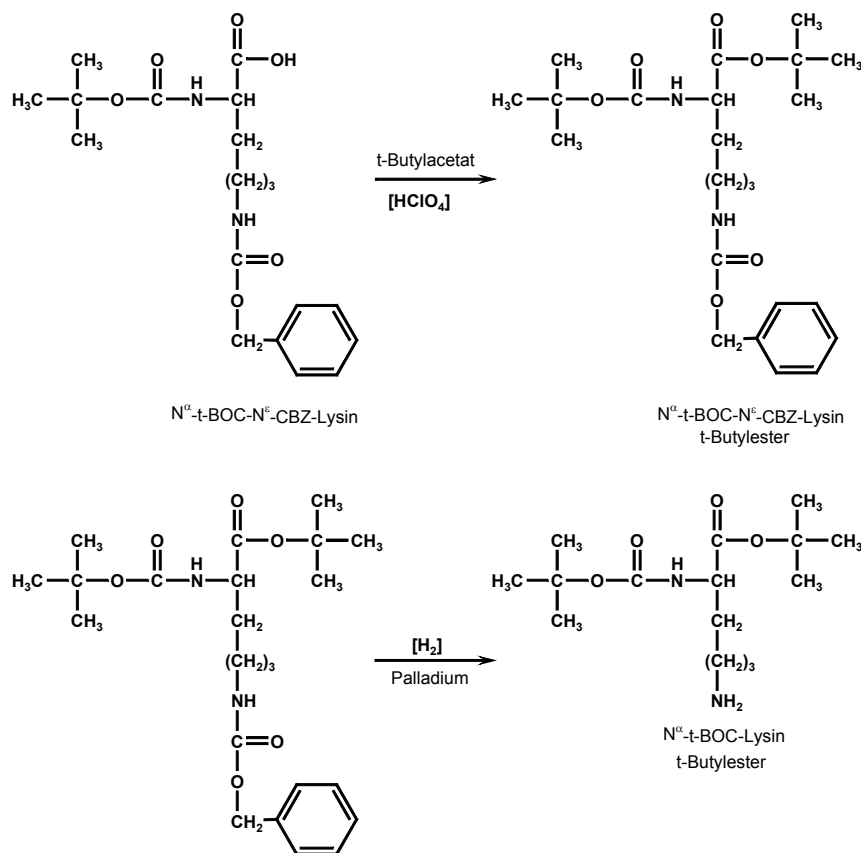


Abbildung 69: Darstellung von N^α -t-BOC-Lysin-t-Butylester

4.4.6 Stufe 4: Umsetzung von Buttersäurechlorid mit N^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester

Für die Umsetzung mit N^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester wurde in diesem Zusammenhang ein um eine Methylgruppe erweitertes Buttersäurechlorid verwendet (Abb. 70). Das Reaktionsgemisch wurde einen Tag gerührt. Es wird N^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester verwendet, da hier die Aminogruppe am α -C-Atom durch eine t-Butoxycarbonylgruppe geschützt vorliegt und damit gezielt die Aminogruppe der Seitenkette als einziger Reaktionspartner für die Aminierung zur Verfügung steht. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockne eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels NMR (Anhang).

Das ^1H -NMR-Spektrum ergibt mit einem Signal bei 0,93 ppm ein Hinweis auf die endständige CH_3 -Gruppe. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum ergibt 14,5 ppm. Des Weiteren ist das charakteristische Signal an Position 5 im ^{13}C -Spektrum zu sehen. Die chemische Verschiebung beträgt 61,5 ppm. Die CH_2 -Gruppen in Position 1'-4' ergeben Signale (Multipllett) zwischen 1,39-2,89 ppm. Das H-Atom in Position 5' der CH-Gruppe ergibt im ^1H -Spektrum ein Triplett bei 3,30 ppm. Die chemische Verschiebung im ^{13}C -Spektrum ergibt 55,8 ppm.

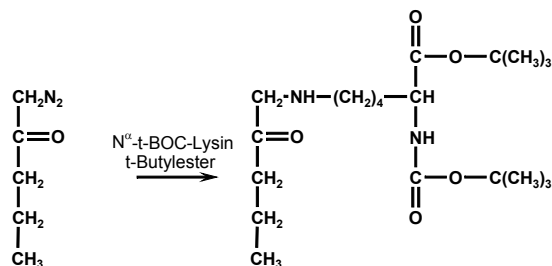


Abbildung 70: Umsetzung Buttersäurechlorid mit N^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese zum 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson nicht beendet. Die erfolgreiche Umsetzung des Lysinderivats mit dem Buttersäurechlorid belegen jedoch die prinzipielle Durchführbarkeit der Synthesestrategie.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation liefert einen Beitrag zur Bildung von α -Dicarbonylen beim Maillard-induzierten Abbau von Mono- und Disacchariden. Im Vordergrund stand die Aufklärung der Bildungswege von α -Dicarbonylverbindungen aus Glucose und Maltose/Lactose. Dazu wurden Inkubationen in An- und Abwesenheit von Sauerstoff untersucht.

Um qualitative und quantitative Aussagen über die Bildung von α -Dicarbonylen machen zu können, wurden die benötigten Referenzsubstanzen erstmals mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) aus den Inkubationsansätzen isoliert. Dafür wurde Glucose bzw. Maltose mit Lysin in Anwesenheit von *o*-Phenylendiamin (OPD) inkubiert. Aus den Glucoseinkubationen wurden elf und aus den Maltoseansätzen wurden 19 α -Dicarbonylchinoxaline isoliert. Die mit GC/MS, hochauflösender Massenspektrometrie und NMR identifizierten Chinoxaline wurden als authentische Standardsubstanzen für qualitative und quantitative Untersuchungen der Maillard-Reaktion von Mono- und Disacchariden eingesetzt.

In Inkubationen mit Glucose wurden Glucoson, 3-Desoxyglucoson, 1-Desoxyglucoson, Lederer Glucoson, 3-Desoxypentosen, 1-Desoxypentosen, Threoson, 3-Desoxythreoson, 1-Desoxythreoson, Methylglyoxal und Glyoxal in Form ihrer Chinoxaline (Q) mit HPLC-UV identifiziert und quantifiziert.

In den Inkubationsansätzen in Anwesenheit des Abfangreagens OPD wurden Glucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q und das Lederer Glucoson-Q als die dominierenden Chinoxaline mit intaktem Kohlenstoffskelett detektiert. 1-Desoxypentosen-Q, Threoson-Q und 1-Desoxythreoson-Q wurden als Hauptchinoxaline der Fragmente nachgewiesen. Oxidativ bevorzugt wurden Glucoson-Q, 1-Desoxypentosen-Q und Threoson-Q gebildet. Unter anaeroben Bedingungen wurden 1-Desoxyglucoson-Q, Lederer Glucoson-Q und 1-Desoxythreoson-Q in höheren Konzentrationen quantifiziert.

In den Inkubationsansätzen in Abwesenheit von OPD wurden dagegen 3-Desoxyglucoson-Q, 3-Desoxypentosen-Q und 3-Desoxythreoson-Q in hohen Konzentrationen detektiert. Die Bildung von 3-Desoxyglucoson und 3-Desoxythreoson ist unabhängig von Sauerstoff, wohingegen 3-Desoxypentosen eine Abhängigkeit von Sauerstoff zeigt. Die kleinsten Dicarbonylverbindungen Methylglyoxal-Q und

Glyoxal-Q wurden in geringen Konzentrationen in An- und Abwesenheit von OPD nachgewiesen. Methylglyoxal-Q zeigte keine Abhängigkeit von Sauerstoff, während die Bildung von Glyoxal-Q bevorzugt oxidativ erfolgte.

Die Untersuchungen zum Abbau von Glucose in An- bzw. Abwesenheit von OPD zeigen die Vor- und Nachteile des Einsatzes eines Abfangreagenzes auf. In Abwesenheit eines Abfangreagenz werden hochreaktive Reduktonstrukturen sofort nach deren Bildung abgebaut. Stabile Strukturen wie 3-Desoxyglucoson, 3-Desoxypentosen und 3-Desoxythreoson häufen sich dagegen an. Diese 3-Desoxyisomere besitzen eine deutlich geringere Reaktivität als Verbindungen mit Reduktonstruktur.

Untersuchungen mit ^{13}C -markierter Glucose gaben Aufschluss darüber, dass die Dicarbonylverbindungen 3-Desoxypentosen, 1-Desoxypentosen, Threoson, 1-Desoxythreoson und 3-Desoxythreoson aus dem Bereich $\text{C}_2\text{-C}_6$ des Glucose-Skeletts entstehen.

Zur weiteren Aufklärung der Bildung von α -Dicarbonylen wurden Abbaureaktionen von Glucoson und 3-Desoxyglucoson untersucht. Nach 48 h Inkubationszeit wurden keine α -Dicarbonyle aus 3-Desoxyglucoson nachgewiesen. Dagegen wurden 3-Desoxypentosen, 1-Desoxypentosen, Threoson, Methylglyoxal und Glyoxal in Form ihrer Chinoxaline aus Glucoson nachgewiesen. Threoson-Q wurde bevorzugt oxidativ gebildet. 3-Desoxypentosen-Q und 1-Desoxypentosen-Q wurden bevorzugt unter anaeroben Bedingungen detektiert. Glyoxal-Q und Methylglyoxal-Q wurden in gleichbleibend geringen Konzentrationen unter aeroben und anaeroben Bedingungen quantifiziert.

1-Desoxypentosen wurde erstmals aus Glucose nachgewiesen. Auf Grundlage der Untersuchungen von Glucose und Glucoson wurde ein nicht-oxidativer Bildungsweg über das Glucoson postuliert.

Basierend auf den Untersuchungsergebnissen aus den verschiedenen Modellreaktionen können nachfolgende Aussagen postuliert werden. Glucoson ist ein Precursor für die Bildung von C-5-Fragmenten. 3-Desoxyglucoson bildet auf Grund seiner stabilen Struktur keine α -Dicarbonylfragmente. Aus der Literatur von Voigt und Glomb [25] und aus eigenen Untersuchungen geht hervor, dass die C-4-Fragmente aus dem 1-Desoxyglucoson gebildet werden. β -Dicarbonylspaltung ist eine bedeutende Reaktion beim Abbau von Hexosen.

Die Reaktionswege der Bildung der α -Dicarbonyle ausgehend von Glucose sind vereinfacht in Abbildung 71 dargestellt.

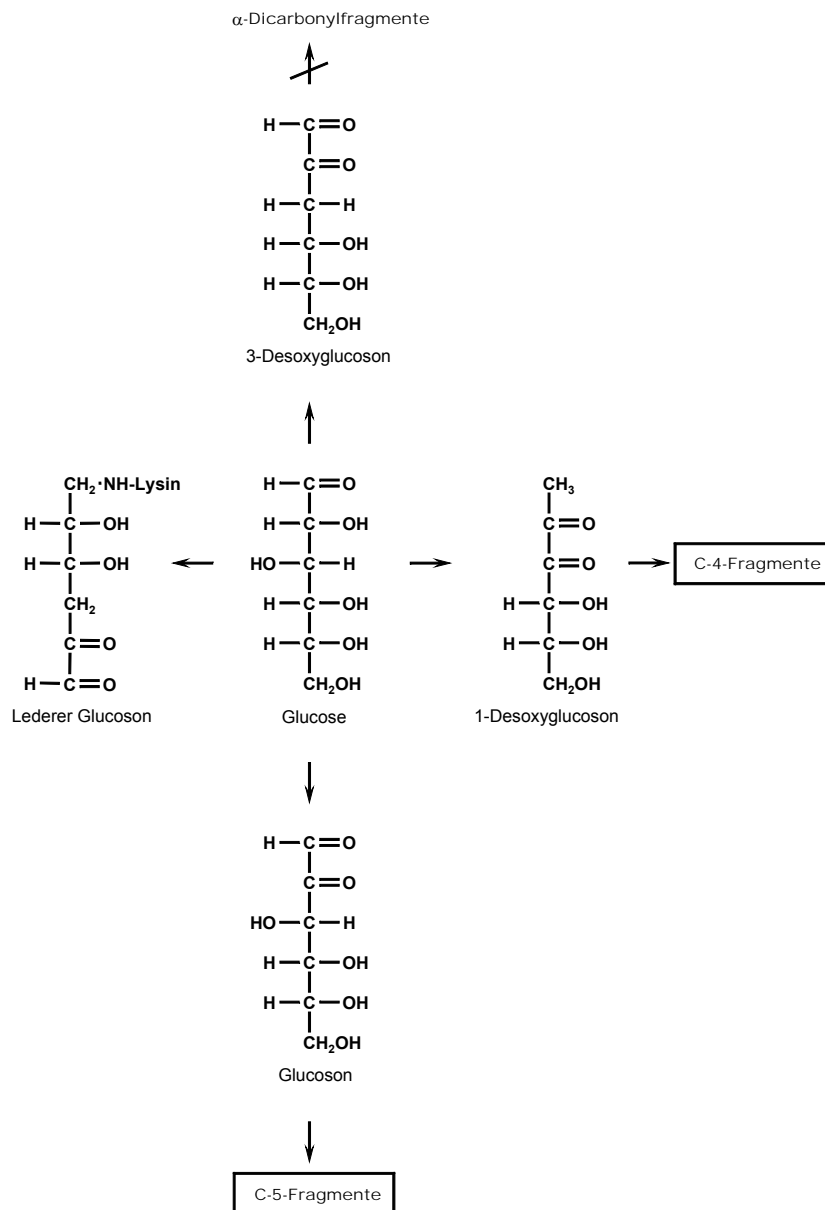


Abbildung 71: Bildung von α -Dicarbonylverbindungen aus Glucose

In Inkubationen mit Maltose wurden 1-Desoxymaltoson-Q, 3-Desoxymaltoson-Q, Maltoson-Q, Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, 4-Desoxyglucoson-Q, 1,4-Didesoxyglucoson-Q, 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q, 1,2,3-Tricarbonyl-Q, 2,3,4-Tricarbonyl-Q, 3-Desoxypentoson-Q, 3,4-Didesoxypentoson-Q, 3-Desoxythreoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q, Diacetyl-Q, Methylglyoxal-Q, Glyoxalsäure-Q und Glyoxal-Q identifiziert.

In Inkubationen in Anwesenheit von OPD wurden Maltoson, 1-Desoxymaltoson, 1,2,3-Tricarbonyl, 3-Desoxypentosen, 3-Desoxythreoson als Chinoxaline in hohen Konzentrationen quantifiziert, während in Abwesenheit von OPD 3-Desoxymaltoson-Q und 1,2,3-Tricarbonyl-Q als dominierende α -Dicarbonyle nachgewiesen wurden.

1,2,3-Tricarbonyl-Q wurde in hohen Konzentrationen unter aeroben und anaeroben Bedingungen nachgewiesen. Die Bildung erfolgte unabhängig von Sauerstoff. Es wurde ein Bildungsweg über das 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson aus Maltose postuliert. 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson ist eine Struktur mit Redoxaktivität. Zum einen wird die an Position eins befindliche Aminofunktion zum 1,2,3-Tricarbonyl oxidiert. Auf der anderen Seite kann die Aminofunktion zum 1,4-Didesoxyglucoson reduziert werden. 1,4-Didesoxyglucoson-Q wurde nur unter anaeroben Bedingungen quantifiziert.

3-Desoxypentosen-Q wurde in hohen Konzentrationen unter oxidativen Bedingungen gebildet. Es wurde ein Bildungsweg ausgehend vom Maltoson, welches ebenfalls bevorzugt unter aeroben Bedingungen gebildet wurde, postuliert.

1-Desoxyglucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, Glucoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q, Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q sind Abbauprodukte der Glucose. Sie wurden in geringen Konzentrationen unter aeroben und anaeroben Bedingungen quantifiziert. 3-Desoxythreoson-Q wurde in hohen Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen gebildet. In den Maltoseinkubationen wurde deutlich mehr 3-Desoxythreoson als 1-Desoxythreoson quantifiziert. Die Bildung dieser α -Dicarbonylverbindung verläuft vermutlich nicht über die Hexosenchemie (Glucose). Diacetyl und Glyoxalsäure wurden dagegen als typische Verbindungen für Disaccharidinkubationen etabliert.

Die Ergebnisse der Lactoseinkubationen korrelieren mit denen der Maltose. Sie bestätigen damit die Untersuchungsergebnisse der Maltose.

Während beim Abbau von Hexosen die β -Dicarbonylspaltung eine entscheidende Rolle spielt, ist die Qualität der Abgangsgruppe in der Disaccharidchemie von großer Bedeutung. Insbesondere die Abspaltung der 1,4-glucosidischen Bindung beeinflusst die Produktbildung.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde eine vollständige Übersicht der gebildeten α -Dicarbonyle aus Mono- und Disacchariden dargestellt. Die

MLCCC wurde erstmals benutzt, um die Chinoxaline aus den Reaktionsansätzen zu isolieren. Aerobe und anaerobe Inkubationen gaben Einblick in die Bildung der α -Dicarbonylstrukturen.

.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien

D-Glucose, D-Maltose Monohydrat, D-Galactose, Lactose Monohydrat, Methanol (HPLC Reinheit), Phenylhydrazin, Benzaldehyd, Kaliumdihydrogenphosphat, di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, Ethanol, Ninhydrin, Ethylenglycol, Buttersäure, Buttersäurechlorid, Carbitol (Diethylenglycolmonoethylether) und Diethylentriaminpentaessigsäure wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Chinoxalin, 2-Methylchinoxalin, Dimethylchinoxalin, *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid, [1-¹³C] Glucose und [6-¹³C] Glucose, 2-Oxobuttersäure, Propylamin, Diazald (*N*-Methyl-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamid), 1-Chloro-*N,N*,2-trimethyl-1-propenylamin, *o*-Phthaldialdehyd (OPA), Borsäure, Brij® 35 und 2-Mercaptoethanol wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), L-Lysin Monohydrochlorid, *o*-Phenylendiamin (OPD), Pyridin, Essigsäure, Pentylamin, Brenztraubensäure, Natriumborhydrid, *t*-Butylacetat, Essigsäureanhydrid, Glyoxalsäure, Boc-Lys-OH, Heptafluorbuttersäure (HFBA) und Palladium (auf Aktivkohle) wurden von Fluka (Taufkirchen, Deutschland), Methanol-d₄, Deuteriumoxid wurden von Chemotrade (Leipzig, Deutschland) und Kaliumhydroxid (Plätzchen), Triethylamin, Essigsäureethylether, Diethylether, Dichlormethan, Toluol, 1-Butanol und Hexan wurden von Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

6.2 Synthesen

6.2.1 *D*-Arabino-hexos-2-ulose (Glucoson)

10,0 g wasserfreie Glucose wurden mit 22,7 ml Phenylhydrazin, 12,7 ml Eisessig und 500 ml dest. Wasser in einem 2 l Dreihalskolben vereint. Die Mischung wurde auf ca. 90 °C erhitzt, wobei es zur Bildung eines gelben Niederschlages kam. Nach Abkühlen der Lösung wurde der Filterkuchen mit je 100 ml 10 %-iger Essigsäure, dest. Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen. Der gewaschene Rückstand wurde in einem 2 l Dreihalskolben mit 500 ml Ethanol zum Sieden gebracht und so lange weiteres Ethanol zugetropft, bis sich die Lösung klärte. Danach wurde weitere 15 Minuten gekocht. Die Lösung wurde abgekühlt und über

Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Niederschlag wurde am folgenden Tag abgesaugt und mit 50 ml Ethanol und Diethylether gewaschen. Das Zwischenprodukt (Phenylosazon) wurde getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt. Zur Entfernung von Oxidations- und Polymerisationsprodukten musste der im zweiten Schritt eingesetzte Benzaldehyd frisch destilliert werden. Die Destillation wurde bei einem Druck von 100 mbar und einer Temperatur von 80-90 °C durchgeführt.

8,0 g des Zwischenproduktes wurden in 240 ml vergälltem Ethanol suspendiert und in 400 ml Wasser eingerührt (2 l Dreihalskolben). Nach Zugabe von 4,8 ml Eisessig und 12,8 ml frisch destilliertem Benzaldehyd wurde solange unter Rückfluss gekocht, bis sich alles löste. Nach weiteren 1,5 h des Siedens, wurde der Ethanol abdestilliert (ca. 250 ml). Gleichzeitig tropfte man 400 ml dest. Wasser dazu. Es fiel ein Präzipitat aus, welches über Nacht im Kühlschrank gefällt wurde. Nach Filtration wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer ($T < 30$ °C) auf ca. 200 ml eingengt. Anschließend wurde das Filtrat viermal mit je 80 ml Diethylether gewaschen. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase eingefroren und lyophilisiert. Die Auswaage betrug 2,7 mg (34 %).

6.2.1.1 Reinheitsbestimmung von D-Arabinohexose-2-ulose (Glucoson)

Etwa 2,5 mg Glucoson und 2,5 mg Galactose wurden in ein Samplerfläschen eingewogen und in 200 µl Wasser gelöst. Man fügte ca. 7 mg NaBH₄ zu und lies mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren. Durch Zugabe von Eisessig wurde die Reaktion gestoppt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel abgezogen und der noch feuchte Rückstand in wenig 1 %-iger methanolischer Salzsäure gelöst. Die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Vorgang wurde vier- bis fünfmal wiederholt. Noch vorhandene Spuren an Essigsäure wurden am Hochvakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und die anorganischen Salze abfiltriert. Nach Trocknen am Rotationsverdampfer wurde die Lösung in 500 µl Methanol aufgenommen. Ein Aliquot (100 µl) der Lösung wurde mit je 50 µl Pyridin/ N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid silyliert und gaschromatographisch (FID) analysiert.

Temperaturprogramm

100°C $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 150°C(20min) $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$ 270°C(20min)

$t_r = 35,6$ min (Mannit)

$t_r = 35,8$ min (Sorbit)

$t_r = 35,9$ min (Galactit)

Reinheit: 59 %

6.2.2 3-Desoxy-D-erythro-hexos-2-ulose (3-Desoxyglucoson) und Amadori-Verbindung

3-Desoxyglucoson und die Amadori-Verbindung wurden im Arbeitskreis synthetisiert. Die Synthese von 3-Desoxyglucoson erfolgte nach Madson und Feather [59]. Bei der Synthese von 3-Desoxyglucoson bildet sich ausgehend von Glucose, p-Toluidin und Benzoylhydrazin das 3-Desoxyglucosonbis-(benzoylhydrazon), welches in der Umsetzung mit Benzylaldehyd zum 3-Desoxyglucoson reagiert. Die Ausbeute betrug 83 %.

Die Amadori-Verbindung wurde nach Glomb und Monnier [60] synthetisiert. Die Ausbeute betrug 100 %.

6.3 Reagenzien

6.3.1 Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,4

Zur Herstellung von einem Liter Phosphatpuffer wurden 18,8 g (82,4 mmol) di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat und 2,4 g (17,6 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat in 800 ml Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde ein pH-Wert von 7,4 mit Phosphorsäure (2 N) bzw. Kaliumhydroxidlösung (1 N) eingestellt.

Zur Herstellung von anaerobem Puffer wurde zusätzlich 0,393 g (1,0 mmol) Diethylentriaminpentaessigsäure dazugegeben. Um eine anaerobe Atmosphäre zu erzeugen, wurde die Pufferlösung mit Helium und Argon begast.

6.3.2 OPA-Reagenz

o-Phthaldialdehyd (OPA) wurde mit Ethanol versetzt und im Ultraschallbad gelöst. Die Borsäure wurde in 800 ml bidest. Wasser gelöst und mit 22 %-iger Kaliumhydroxid-Lösung auf pH = 9,75 eingestellt. Danach gab man das gelöste OPA hinzu und füllte die gesamte Lösung auf 1 l auf. In eine Saugflasche wurde

Brij® 35 vorgelegt und das Derivatisierungsreagenz dazu membranfiltriert. Danach gab man das 2-Mercaptoethanol hinzu und entgaste bei 280 mbar solange, bis das Brij® 35 vollständig gelöst war.

6.4 Inkubationsansätze

6.4.1 *Inkubationen Glucose/Maltose unter aeroben Bedingungen*

7,6 g (42 mmol) Glucose bzw. 15,1 g (42 mmol) Maltose wurden mit 7,6 g (42 mmol) Lysin Monohydrochlorid und 0,5 g (5 mmol) *o*-Phenylendiamin (OPD) in einem Liter aeroben Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4) gelöst. Der Ansatz wurde im Trockenschrank für 7 Tage bei 50 °C inkubiert.

6.4.2 *Inkubationen Glucose/Maltose unter anaeroben Bedingungen*

7,6 g (42 mmol) Glucose bzw. 15,1 g (42 mmol) Maltose wurden mit 7,6 g (42 mmol) Lysin Monohydrochlorid und 0,5 g (5 mmol) *o*-Phenylendiamin (OPD) in einem Liter anaeroben Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4) gelöst. Zur Erzeugung der anaeroben Atmosphäre wurde Argon eingeleitet. Der Ansatz wurde anschließend im Trockenschrank für 7 Tage bei 50 °C inkubiert.

6.4.3 *Inkubationen ¹³C-markierte Glucose unter aeroben Bedingungen*

3,8 mg (42 mmol) Glucose (1-¹³C und 6-¹³C) wurden mit 3,8 mg (42 mmol) Lysin Monohydrochlorid und 2,3 mg (5 mmol) *o*-Phenylendiamin (OPD) in 500 µl aeroben Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4) gelöst. Der Ansatz wurde im Trockenschrank für 7 Tage bei 50 °C inkubiert.

6.4.4 *Inkubationen ¹³C-markierte Glucose unter anaeroben Bedingungen*

3,8 mg (42 mmol) Glucose (1-¹³C und 6-¹³C) wurden mit 3,8 mg (42 mmol) Lysin Monohydrochlorid und 2,3 mg (5 mmol) *o*-Phenylendiamin (OPD) in 500 µl anaeroben Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4) gelöst. Zur Erzeugung der anaeroben Atmosphäre wurde Argon eingeleitet. Der Ansatz wurde anschließend im Trocken-

schrank für 7 Tage bei 50 °C inkubiert. Vor und nach den Probenahmen wurde jeweils eine Minute Argon eingeleitet.

6.4.5 Inkubationen von Glucoson unter aeroben Bedingungen

Es wurde jeweils eine 84 mM Lösung von Glucoson und Lysin (7,7 mg/500 µl aerober Phosphatpuffer) hergestellt. Da Glucoson eine Reinheit von 59 % aufwies, wurden 12,5 mg in 500 µl Phosphatpuffer gelöst. Je 150 µl der Glucoson- und der Lysinlösung wurden vereinigt und bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurden 30 µl einer 165 mM OPD-Lösung (35,6 mg/2 ml) zugegeben. Es wurde 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

6.4.6 Inkubationen von Glucoson unter anaeroben Bedingungen

Es wurde jeweils eine 84 mM Lösung von Glucoson und Lysin (7,7 mg/500 µl anaerober Phosphatpuffer) hergestellt. Da Glucoson eine Reinheit von 59 % aufwies, wurden 12,5 mg in 500 µl Phosphatpuffer gelöst. Je 150 µl der Glucoson- und der Lysinlösung wurden vereinigt, mit Argon begast und bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurden 30 µl einer 165 mM OPD-Lösung (35,6 mg/2 ml) zugegeben. Es wurde 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

6.4.7 Inkubationen von 3-Desoxyglucoson unter aeroben Bedingungen

Es wurde jeweils eine 84 mM Lösung von 3-Desoxyglucoson und Lysin (7,7 mg/500 µl aerober Phosphatpuffer) hergestellt. Da 3-Desoxyglucoson eine Reinheit von 83 % aufwies, wurde von dieser Verbindung 8,2 mg/500 µl Phosphatpuffer eingesetzt. Je 150 µl der 3-Desoxyglucoson- und der Lysinlösung wurden vereinigt und bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurde 30 µl einer 165 mM OPD-Lösung (35,6 mg/2 ml) zugegeben. Es wurde 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

6.4.8 Inkubationen von 3-Desoxyglucoson unter anaeroben Bedingungen

Es wurde jeweils eine 84 mM Lösung von 3-Desoxyglucoson und Lysin (7,7 mg/500 µl anaerober Phosphatpuffer) hergestellt. Da 3-Desoxyglucoson eine Reinheit von 83 % aufwies, wurde von dieser Verbindung 8,2 mg/500 µl Phosphatpuffer eingesetzt. Je 150 µl der 3-Desoxyglucoson- und der Lysinlösung wurden vereinigt, mit Argon begast und bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurde 30 µl einer 165 mM OPD-Lösung (35,6 mg/2 ml) zugegeben. Es wurde 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

6.4.9 Inkubationen der Amadori-Verbindung unter aeroben Bedingungen

Es wurde jeweils eine 84 mM Lösung der Amadori-Verbindung (17,1 mg/500 µl) und Lysin (7,7 mg/500 µl aerober Phosphatpuffer) hergestellt. Je 150 µl der Amadori-Verbindung und der Lysinlösung wurden vereinigt und bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurde 30 µl einer 165 mM OPD-Lösung (35,6 mg/2 ml) zugegeben. Es wurde 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

6.4.10 Inkubationen der Amadori-Verbindung unter anaeroben Bedingungen

Es wurde jeweils eine 84 mM Lösung der Amadori-Verbindung (17,1 mg/500 µl) und Lysin (7,7 mg/500 µl anaerober Phosphatpuffer) hergestellt. Je 150 µl der Amadori-Verbindung und der Lysinlösung wurden vereinigt, mit Argon begast und bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurde 30 µl einer 165 mM OPD-Lösung (35,6 mg/2 ml) zugegeben. Es wurde 5 h bei Raumtemperatur nachinkubiert.

6.4.11 Inkubationsansätze Glucose/Maltose unter aeroben Bedingungen (für MLCCC-Standardgewinnung)

7,6 g (42 mmol) Glucose bzw. 15,1 g (42 mmol) Maltose wurden mit 7,7 g (42 mmol) Lysin Monohydrochlorid und 0,5 g (5 mmol) *o*-Phenylendiamin (OPD) in einem Liter aeroben Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4) gelöst. Der Ansatz wurde im

Trockenschrank bei 50 °C für 7 Tage inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung wurde dreimal mit je 150 ml Ethylacetat extrahiert. Die unpolaren Substanzen gehen hierbei in die Ethylacetat Phase über, während die polaren Substanzen in der wässrigen Phase zurück bleiben. Die organischen bzw. wässrigen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die eingeeengte organische und wässrige Phase wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

6.4.12 Inkubationsansätze Glucose/Maltose unter Rückfluss (für MLCCC Standardgewinnung)

7,6 g (42 mmol) Glucose bzw. 15,1 g (42 mmol) Maltose wurden mit 7,7 g (42 mmol) Lysin Monohydrochlorid und 0,5 g (5 mmol) *o*-Phenylendiamin in einem Liter anaeroben Phosphatpuffer (0,1 M pH 7,4) gelöst. Unter Rühren und Einleiten von Argon wurde der Ansatz in einem 2 l Dreihalskolben unter Rückfluss gekocht. Die größte Ausbeute an Chinoxalinen aus Glucose ergab sich nach 3,5 h, für Maltose nach 5,5 h.

6.5 Isolierung, Strukturaufklärung und Quantifizierung der α -Dicarbonyle

6.5.1 MLCCC-Trennung

Die zur Trockne eingeeengte Ethylacetat Phase, sowie wässrige Phase wurden der MLCCC zugeführt. Die durchschnittliche Probenaufgabemenge betrug ca. 5 g. Die getrockneten Rückstände wurden in gleichen Volumina stationärer und mobiler Phase gelöst. Nach Aufgabe der stationären Phase (keine Rotation der Spule) erfolgte die Aufgabe der mobilen Phase (Spule in Rotation). Die Probenaufgabe erfolgte nach Durchbruch der mobilen Phase. Das Fließmittelsystem setzte sich aus den zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten Ethylacetat und Wasser im Verhältnis 1:2 zusammen. Nach 24-stündiger Sättigung beider Phasen miteinander wurden diese im Scheidetrichter getrennt.

| | |
|---------------------|------------------------------------------------------|
| MLCCC Chromatograph | Nachbau nach Ito Multilayer Coil Separator-Extractor |
| Rotationsmotor | T-Verter E2-2P5-H1F, Rechtslauf (800 U/min) |

| | |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pumpe | Waters Chromatography Pump 6000 A Head → Tail |
| UV-Detektor | Kontron UV-Detektor Range: 2 ABS, Resp. Time: 5 s Wellenlänge: 320 nm |
| Schreiber | Servogor 210 Papierschub: 3 cm/h |
| Fraktionssammler | LKB Bromma 2070 Ultrorac II Pro Fraktion 18 ml |
| Trennsäule | W. Hahn GmbH Co. KG NW-PTFE Isolier- schlauch Durchmesser: 1,9 * 0,3 mm Fassungsvolumen: 270 ml, Länge: ca. 95 m |
| Fließmittel | Ethylacetat/Wasser (1/2/v/v), 24-stündige Sätti- gung Stationäre Phase: gesättigte EtAc-Phase Mobile Phase: gesättigte wässrige Phase |
| Fließgeschwindigkeit | 2 ml/min |
| Injektionsvolumen | 6-10 ml |

6.5.2 HPLC-UV (Identifizierung und Quantifizierung von α -Dicarbonylverbindungen)

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Pumpe | Jasco PU-2080 |
| Gradienteneinheit | Jasco LG-2080-02 Ternary Gradient Unit |
| Entgaser | Jasco DG-2080-54 4 Line Degasser |
| Injektor | Waters 717 plus Autosampler Injektionsvolumen: 50 μ l |
| Channel Box | Jasco LC-Net II/ADC |
| Säule | Knauer Eurospher 100-5 C18, 250 * 4,6 mm |
| UV-Detektor | Kontron UV-Detektor Range: 2 ABS, Resp. Time: 5 s |
| Fließmittel | A: Wasser + 0,6 ml HFBA/l B: Wasser/Methanol (30/70) + 0,6 ml HFBA/l |

| | |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fließgeschwindigkeit | 1 ml/min |
| Gradientenprogramm | 80:20 (A/B) → 60:40 (A/B, in 40 min) → 30:70 (A/B, in 15 min) → 30:70 (A/B, 5 min) → 0:100 (A/B, in 30 min) → 0:100 (A/B, 10 min) → 80:20 (A/B, in 5 min) → 80/20 (A/B, 15 min) |
| Software | Borwin 1.5 |

6.5.3 Fluoreszenz-HPLC (Aminosäureanalyse)

| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pumpe | JASCO PU-980 |
| Gradienteneinheit | JASCO LG-980-02 |
| Entgaser | JASCO DG-980-50 |
| Injektor | Autosampler JASCO 851-AS |
| Säule | VYDAC RP-18 CAT.#218TP54; Proteine & Peptide C18 4,6 * 2,5 cm |
| Derivatisierungs-Pumpe | Merck-Hitachi Reaction Pump |
| Fluoreszenz-Detektor | JASCO FP-920 340 nm (Ex.)/ 455 nm (EM.) |
| Fließmittel | A: Wasser + 1,2 ml HFBA/l B: Wasser/Methanol (30/70) + 1,2 ml HFBA/l |
| Derivatisierungsreagenz | OPA-Reagenz |
| Fließgeschwindigkeit | 1 ml/min 0,5 ml/min (Nachsäulenderivatisierung) |
| Gradientenprogramm | 90:10 (A:B) 10 min halten, in 50 min auf 82:18 (A:B), in 5 min auf 0:100 und 20 min halten, in 5 min auf 90:10 und 15 min halten |
| Software | Borwin 1.5 |

6.5.4 GC/MS (Identifizierung von α -Dicarbonylverbindungen)

Zur ersten Strukturanalyse der α -Dicarbonylchinoxaline wurde eine gaschromatographische Bestimmung durchgeführt. Ca. 1 mg des Chinoxalins wurde in 50 μ l Pyridin gelöst und anschließend mit 50 μ l *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid silyliert.

Zur vollständigen Silylierung wurde die Probe 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 1 µl Probe injiziert.

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GC/MS-Gerät | Thermo Electron Corporation, Finnigan Trace GC Ultra mit Trace DSQ |
| Trägergas | Helium 5.0, 1,3 ml/min (30 cm/s) |
| Trennsäule | DB-5 MS, 30 m * 0,32 mm * 0,25 µm |
| Injektion | Split Modus, T=220 °C, Split-Verhältnis: 1:50 Split-Fluß: 65 ml/min, Gas-Saver: 10 ml/min ab 2 min |
| Temperaturprogramm | 50 °C → 100 °C (5 °C/min) → 270 °C (10°C/min) → 270 °C (20 min) |
| MS-Modus | EI (70 eV), Full-Scan 20-600 m/z |
| Software | Xcalibur 1.3 |

6.5.5 GC/FID (Reinheitsbestimmung D-Arabino-hexos-2-ulose)

| | |
|----------------------|-----------------------------------------|
| GC-Gerät | Agilent 6890 N Network GC System |
| Detektor | Flammenionisationsdetektor |
| Säule | 30 m * 0,32 mm, HP-5, Filmdicke 0,25 µm |
| Injektortemperatur | 250 °C |
| Trägergas | Helium 4.6 |
| Flussrate | 1,8 ml/min |
| Flussgeschwindigkeit | 30 cm/s |
| Software | Agilent Chem Station |

6.5.6 Hochauflösendes MS (Strukturaufklärung der α -Dicarbonylverbindungen)

| | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| MS-Gerät | Bruker Apex III 70e FT-ICR-MS mit IRMPD („Infrared Multiphoton Dissociation“) |
| Ionenquellen | ESI, APCI und Nanospray |
| Trägergas | Stickstoff |

Injektor 150 °C

6.5.7 LC/MS (Untersuchungen zur Isotopenverteilung der α -Dicarbonyle)

Gerät Applied Biosystems Linear Ion Trap Quadrupole
LC/MS/MS Mass Spectrometer 4000 Q Trap

HPLC

Pumpe Jasco PU 2080 Plus Intelligent HPLC Pump
Gradienteneinheit Jasco LG 2080 Quarternary Gradient Unit
Entgaser Jasco DG 2080-54 4-Line-Degasser
Autosampler Jasco AS-2057 Plus Intelligent Sampler
Säule Knauer Eurospher 100-5 C18, 250 * 4,6 mm
Fließmittel A: Wasser + 0,6 ml HFBA/
B: Wasser/Methanol (30/70) + 0,6 ml HFBA/
Gradient 80:20 (A/B) → 60:40 (A/B, in 40 min) → 30:70
(A/B, in 15 min) → 30:70 (A/B, 5 min) → 0:100
(A/B, in 30 min) → 0:100 (A/B, 10 min) → 80:20
(A/B, in 5 min) → 80/20 (A/B, 15 min)
Injektionsvolumen 50 μ l

Massenspektrometer

Scan Type Q1 MS
Polarität Positiv
Ion Source Turbo Spray
Curtain Gas 40
Ion Spray Voltage 4500
Ion Source Gas 1 50
Ion Source Gas 2 50
Declustering Potential 50
Entrance Potential 10

6.5.8 Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR)

Die Strukturaufklärung der isolierten Chinoxalinstandards erfolgte mittels NMR. Die Daten wurden am Varian Unity Inova-500 aufgenommen. Um die Strukturen abzusichern, wurden folgende NMR-Daten ermittelt: ^1H , ^{13}C , HMQC, HMBC, und H,H-cosy.

6.5.9 Dünnschichtchromatographie (DC)

Sprühreagenz 1

1 g Diphenylamin und 1 ml Anilin wurden in 40 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 5 ml Phosphorsäure wurde mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt.

Sprühreagenz 2

50 mg Ninhydrin wurden in 1-Butanol gelöst. Nach Zugabe von 1,25 ml Eisessig wurde mit 1-Butanol auf 25 ml aufgefüllt.

Sprühreagenz 3

Es wurde eine 4%-ige Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in Methanol hergestellt. Kurz vor Anwendung des Sprühreagenz wurde die TTC-Lösung im Verhältnis 1:1 mit 1 N NaOH-Lösung gemischt.

Bestimmung von Kohlenhydraten

| | |
|--------------------|----------------------------------------------------|
| Dünnschicht-Platte | Kieselgel 60, 10 x 10 cm, Merck |
| Laufmittel | Chloroform/Eisessig/Methanol/Wasser (12:3,6:2,5:1) |
| Detektion | Sprühreagenz 1 oder Sprühreagenz 3 |

Bestimmung von Aminogruppen

| | |
|--------------------|--------------------------------------------------|
| Dünnschicht-Platte | Kieselgel 60 _{F254} , 10 x 10 cm, Merck |
| Laufmittel | 1-Butanol/Eisessig/Wasser (25:3:5) |
| Detektion | Sprühreagenz 2 |

6.5.10 Lyophilisation

Nach Isolierung der Chinoxaline mittels MLCCC wurden die jeweiligen Fraktionen am Lyophilisator getrocknet. Die getrockneten α -Dicarbonylchinoxaline standen dann als Standardsubstanzen für die Strukturaufklärung zu Verfügung.

6.6 Synthese von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson

6.6.1 1,3-Dioxolan-Schutzgruppe

115,6 ml (0,6 mol) Brenztraubensäure, 278,6 ml (0,2 mol) Ethylenglycol und ca. 2 g Kationenaustauscher (Dowex 50) wurden in 300 ml Toluol gelöst und zwei Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurde der Ionenaustauscher abfiltriert und anschließend das Toluol am Rotationsverdampfer abrotiert. Anschließend wurde mittels Vakuumdestillation (300 mbar, 160 °C) die geschützte Brenztraubensäure aus der Lösung isoliert.

6.6.1.1 Silylierung (Produktkontrolle)

Ein Aliquot (5 μ l) der geschützten Brenztraubensäure wurde mit je 100 μ l Pyridin/*N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid silyliert und gaschromatographisch (GC/FID) und mittels GC/MS analysiert.

Temperaturprogramm

$100^{\circ}\text{C} \xrightarrow{5^{\circ}\text{C}/\text{min}} 150^{\circ}\text{C}(20\text{min}) \xrightarrow{10^{\circ}\text{C}/\text{min}} 270^{\circ}\text{C}(20\text{min})$

6.6.1.2 Derivatisierung (Produktkontrolle)

Ein Aliquot (5 μ l) der geschützten Brenztraubensäure wurde mit 100 μ l Pentafluorbenzylbromid und 4 μ l Triethylamin (Katalysator) für 1 h bei 110 °C im Trockenschrank derivatisiert.

6.6.2 Chlorierung der geschützten Brenztraubensäure

200 μ l 1-Chloro-*N,N*,2-trimethyl-1-propenylamin und 100 μ l der geschützten Brenztraubensäure wurden in 500 μ l Dichlormethan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde die chlorierte Brenztraubensäure am Hochvakuum (110 °C) abgezogen. Die Kontrolle erfolgte mittels GC/MS (Temperaturprogramm siehe Silylierung).

6.6.3 Herstellung von Diazomethan

In einem Dreihalskolben wurden 18 g (0,32 mol) KOH in 30 ml Wasser, 105 ml Carbitol (Diethylenglycolmonoethylether) und 30 ml Diethylether gelöst. In einen Tropftrichter wurde 64,2 g (0,3 mol) Diazald in 375 ml Diethylether gelöst. Zwischen dem Dreihalskolben und einem Erlmeyerkolben, in dem sich Diethylether befindet, wurde eine Brücke mit Trockeneis und Aceton befüllt. Der zwischen Brücke und Erlmeyerkolben befindliche Absperrhahn wurde geschlossen. Nachdem alle Glasgeräte gefüllt wurden, wurde das Wasserbad, in dem sich der Dreihalskolben befand, auf 60 °C erwärmt. Die Diazaldlösung wurde in kurzen Abständen in den Dreihalskolben getropft. Das sich dabei entwickelnde gelbe Gas kondensierte an der Brücke. Nach Öffnen des Hahnes sammelte sich das Kondensat in einem Überlauf, um zu verhindern, das unkondensiertes Gas in den Erlmeyerkolben gelangt. Erst wenn an der Brücke kein gelbes Gas mehr kondensiert, war alles Diazald verbraucht. Es wurden 400 ml etherische Diazomethanolösung erhalten. Die Ausbeute betrug 90 %.

6.6.4 Darstellung von *N* ^{α} -*t*-BOC-Lysin-*t*-Butylester

3,8 g (10 mmol) *N* ^{α} -*t*-BOC-*N* ^{ϵ} -CBZ-Lysin, 150 ml (1,12 mol) *t*-Butylacetat und 350 μ l Perchlorsäure (60 %) wurden in einem 250 ml Kolben 60 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über die Dünnschichtchromatographie mit Ethylacetat/Hexan (30:70) als Laufmittel. Mit Ninhydrin (siehe *Sprühreagenz 2* Abschnitt 6.5.9) wurden die Spots detektiert.

Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile aufgeteilt und das Lösungsmittel am Hochvakuum über Nacht abgezogen. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst, auf

Kieselgel gezogen und über eine Kieselgelsäule gereinigt. Es wurden ca. 18 Fraktionen erhalten. Die Reaktion wurde mit Dünnschichtchromatographie (Ethylacetat/Hexan (30:70)) überprüft. Detektiert wurde mit Ninydrin. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden vereinigt, das Lösemittel abgezogen und ausgewogen. Die Auswaage betrug ca. 9 g.

6.6.4.1 Hydrogenolyse von *N^α-t-BOC-Lysin-t-Butylester*

0,5 g *N^α-t-BOC-N^ε-CBZ-Lysin-t-Butylester* wurden in 3 ml Ethanol gelöst und 10 min mit Argon begast. Danach wurde 50 mg Palladium (auf Aktivkohle) zugegeben und mit Argon begast. Dann wurde dem Reaktionsansatz unter Rühren 90 min lang H₂ zugeführt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit Dünnschichtchromatographie (MeOH) und Ninhydrin. Das Palladium wurde abfiltriert, der Filter mit MeOH nachgespült und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abrotiert. Die Ausbeute betrug ca. 0,4 g.

7. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: | Bildung der Amadori-Verbindung aus Glucose ($R_2=H$) und Maltose ($R_2=Glucose$) | 3 |
| Abbildung 2: | Bildung von α -Dicarbonylverbindungen aus der Amadori-Verbindung..... | 5 |
| Abbildung 3: | Bildungsweg der Didesoxyosone 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson und Lederer Glucoson nach Reihl et al. [8]..... | 6 |
| Abbildung 4: | Oxidative Bildung von Glucoson aus der Amadori-Verbindung nach Liedke [11]..... | 7 |
| Abbildung 5: | Bildung des 1,4-Didesoxyglucoson nach Hollnagel und Kroh [13] | 7 |
| Abbildung 6: | Bildungsweg von 4-Desoxyglucoson aus Glucose nach Morita et al. [14] | 8 |
| Abbildung 7: | Bildung von 3-Desoxypentosen aus Glucose nach Usui et al. [16] und aus Maltose nach Hollnagel und Kroh [17]..... | 9 |
| Abbildung 8: | Bildung von 3,4-Didesoxypentosen nach Mavric und Henle [18] | 10 |
| Abbildung 9: | Bildungsweg von 1-Desoxypentosen nach Hauck et al. [21]..... | 11 |
| Abbildung 10: | Bildung von Threoson aus Dehydroascorbinsäure nach Nishikawa et al. [22]..... | 11 |
| Abbildung 11: | Bildung von 3-Desoxythreoson aus Glucoson, 3-Desoxyglucoson und 3-Desoxypentosen nach Usui et al. [16]..... | 12 |
| Abbildung 12: | Bildung von 1-Desoxythreoson nach Davidek et al. [24] und Voigt und Glomb [25] | 12 |
| Abbildung 13: | Bildung von Methylglyoxal nach Hollnagel und Kroh [26], Yaylayan und Keyhani [28] und Thornalley et al. [29]..... | 13 |
| Abbildung 14: | Bildungswege für Glyoxal nach Thornalley et al. [29], Wells-Knecht et al. [30], Hofmann et al. [31], Hayashi und Namiki [32] und Usui et al. [16] | 14 |
| Abbildung 15: | Übersicht über Abfangreagenzien für α -Dicarbonylverbindungen nach Glomb und Tschirnich [33] | 15 |
| Abbildung 16: | Aufbau einer MLCCC-Anlage..... | 17 |
| Abbildung 17: | Strecker-Abbau | 19 |
| Abbildung 18: | Theoretisch mögliche Retro-Aldol-Spaltungen von 1-Desoxyglucoson [38]..... | 20 |

| | | |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 19: | Allgemein postulierte α -Dicarbonylspaltung | 21 |
| Abbildung 20: | Theoretisch mögliche hydrolytische α -Dicarbonylspaltung von 1-Desoxyglucoson [38]..... | 21 |
| Abbildung 21: | Oxidative α -Dicarbonylspaltung nach Davidek et al. [39] | 22 |
| Abbildung 22: | β -Dicarbonylspaltung von 1-Desoxyglucoson [38] | 22 |
| Abbildung 23: | HPLC Chromatogramm Inkubation Glucose | 24 |
| Abbildung 24: | MLCCC Chromatogramme der Ethylacetat und der wässrigen Phase aus Glucose | 25 |
| Abbildung 25: | Identifizierte α -Dicarbonylchinoxaline aus Glucose | 30 |
| Abbildung 26: | HPLC-Chromatogramme Glucoseinkubationen (7 Tage, aerob/anaerob)..... | 31 |
| Abbildung 27: | Bildung von Glucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q, 3-Desoxy- glucoson-Q und Lederer Glucoson-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD) | 32 |
| Abbildung 28: | Bildung von 1-Desoxypentosen-Q und 3-Desoxypentosen-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD)..... | 33 |
| Abbildung 29: | Bildung von Threoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxy- threoson-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD) | 34 |
| Abbildung 30: | Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Glucose (in Anwesenheit von OPD)..... | 35 |
| Abbildung 31: | Bildung von Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxy- glucoson-Q und Lederer Glucoson-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD) | 36 |
| Abbildung 32: | Bildung von 1-Desoxypentosen-Q und 3-Desoxypentosen-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD) | 36 |
| Abbildung 33: | Bildung von Threoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxy- threoson-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD) | 37 |
| Abbildung 34: | Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Glucose (in Abwesenheit von OPD)..... | 37 |
| Abbildung 35: | Abbau von Lysin in Inkubationen mit Glucose (in Abwesenheit von OPD)..... | 38 |
| Abbildung 36: | Bestimmung der Halbwertszeit von Glucoson..... | 41 |
| Abbildung 37: | α -Dicarbonyle als Abbauprodukte in Inkubationen von Glucoson | 42 |

| | | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 38: | Postulierter Reaktionsweg für die Bildung von Pentoson, 3-Desoxypentoson und 1-Desoxypentoson aus Glucoson..... | 43 |
| Abbildung 39: | Bestimmung der Halbwertszeit von 3-Desoxyglucoson | 44 |
| Abbildung 40: | Bildung von Glucoson-Q, 3-Desoxyglucoson-Q, 1-Desoxyglucoson-Q und Lederer Glucoson-Q aus der Amadori-Verbindung (in Anwesenheit von OPD)..... | 45 |
| Abbildung 41: | Bildung von Threoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und 3-Desoxythreoson-Q aus der Amadori-Verbindung (in Anwesenheit von OPD)..... | 45 |
| Abbildung 42: | Postulierter Reaktionsmechanismus für die Bildung von α -Dicarbonylen aus Glucose | 47 |
| Abbildung 43: | MLCCC Chromatogramme der Ethylacetat (anaerob) und der wässrigen Phase (aerob) aus Maltose | 48 |
| Abbildung 44: | Identifizierte Chinoxaline aus Maltose..... | 51 |
| Abbildung 45: | HPLC-Chromatogramm Maltose (7 Tage, aerob/anaerob) | 52 |
| Abbildung 46: | Bildung von Maltoson-Q, 1-Desoxymaltoson-Q und 3-Desoxymaltoson-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD) | 53 |
| Abbildung 47: | Redoxaktivität von 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson | 55 |
| Abbildung 48: | Bildung von 1-Desoxyglucoson-Q, 4-Desoxyglucoson-Q, Glucoson-Q, 1,2,3-Tricarbonyl-Q, 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson-Q, 2,3,4-Tricarbonyl-Q und 1,4-Dideoxyglucoson-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)..... | 56 |
| Abbildung 49: | Bildung von 3-Desoxypentoson aus Maltoson | 57 |
| Abbildung 50: | Bildung von 3-Desoxypentoson-Q und 3,4-Dideoxypentoson-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)..... | 57 |
| Abbildung 51: | Bildung von 3-Desoxythreoson-Q, 1-Desoxythreoson-Q und Diacetyl-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)..... | 58 |
| Abbildung 52: | Bildung von Methylglyoxal-Q, Glyoxal-Q und Glyoxalsäure-Q aus Maltose (in Anwesenheit von OPD)..... | 59 |
| Abbildung 53: | Bildung von 3-Desoxymaltoson-Q, 1-Desoxymaltoson-Q und Maltoson-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD) | 60 |
| Abbildung 54: | Bildung von 4-Desoxyglucoson-Q, Glucoson-Q, 1,2,3-Tricarbonyl-Q, 1-Lysino-1,4-dideoxyglucoson-Q und 1,4-Dideoxyglucoson-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD) | 61 |

| | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 55: | Bildung von 3-Desoxypentosen-Q, 3,4-Didesoxypentosen-Q, 3-Desoxythreosen-Q und Diacetyl-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD)..... | 61 |
| Abbildung 56: | Bildung von Methylglyoxal-Q, Glyoxal-Q und Glyoxalsäure-Q aus Maltose (in Abwesenheit von OPD)..... | 62 |
| Abbildung 57: | Reaktionswege für die Bildung von α -Dicarbonylen aus Maltose..... | 64 |
| Abbildung 58: | Bildung von 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson-Q, 1,2,3-Tricarboxonyl-Q, 4-Desoxyglucoson-Q und 1,4-Didesoxyglucoson-Q aus Lactose (in Anwesenheit von OPD)..... | 65 |
| Abbildung 59: | Bildung von 3-Desoxypentosen-Q, 3,4-Didesoxypentosen-Q, Diacetyl-Q, 1-Desoxythreosen-Q und 3-Desoxythreosen-Q aus Lactose (in Anwesenheit von OPD)..... | 65 |
| Abbildung 60: | Bildung von Methylglyoxal-Q und Glyoxal-Q aus Lactose (in Anwesenheit von OPD)..... | 66 |
| Abbildung 61: | Synthese 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson nach Hiller [54]..... | 68 |
| Abbildung 62: | Möglicher Syntheseweg von 1-Lysino-1,4-didesoxyglucoson | 69 |
| Abbildung 63: | Darstellung von 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure | 69 |
| Abbildung 64: | GC/MS Silylierung und Derivatisierung | 70 |
| Abbildung 65: | Chlorierung von 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylsäure..... | 71 |
| Abbildung 66: | GC/MS-Messung von 2-Methyl-1,3-dioxolan-2-carboxylchlorid .. | 71 |
| Abbildung 67: | Darstellung von Diazomethan aus Diazald | 72 |
| Abbildung 68: | Umsetzung des Säurechlorids mit Diazomethan | 73 |
| Abbildung 69: | Darstellung von N ^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester | 73 |
| Abbildung 70: | Umsetzung Buttersäurechlorid mit N ^{α} -t-BOC-Lysin-t-Butylester . | 74 |
| Abbildung 71: | Bildung von α -Dicarbonylverbindungen aus Glucose..... | 77 |

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Verteilung 1-¹³C und 6-¹³C Markierung...40

9. Literaturverzeichnis

- (1) Ledl, F.; Schleicher, E. The Maillard reaction in food and in the human body - new results in chemistry, biochemistry and medicine. *Angew.Chem.* **1990**, *102* (6), 597-626
- (2) Angrick, M.; Rewicki, D. The Maillard reaction. *Chem.Unserer Zeit* **1980**, *14* (5), 149-157
- (3) Sugimura, T.; Takayama, S.; Ohgaki, H.; Wakabayashi, K.; Nagao, M. Mutagens and carcinogens formed by cooking meat and fish: heterocyclic amines. *Maillard React.Food Process., Hum.Nutr.Physiol.*, **1990**, 323-334
- (4) Schleicher, E. The significance of the Maillard reaction in human physiology. *Z Ernährungswiss* **1991**, *30* (1), 18-28
- (5) Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schleicher, E. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; 2001
- (6) Yaylayan, V. A.; Huyghues-Despointes, A. Chemistry of Amadori rearrangement products: analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1994**, *34* (4), 321-369
- (7) Huber, B.; Ledl, F. Formation of 1-amino-1,4-dideoxy-2,3-hexodiuloses and 2-aminoacetylfurans in the Maillard reaction. *Carbohydr.Res.* **1990**, *204*, 215-220
- (8) Reihl, O.; Rothenbacher, T. M.; Lederer, M. O.; Schwack, W. Carbohydrate carbonyl mobility-the key process in the formation of alpha-dicarbonyl intermediates. *Carbohydr.Res.* **2004**, *339* (9), 1609-1618
- (9) Biemel, K. M.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Unexpected carbonyl mobility in aminoketoses: the key to major Maillard crosslinks. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41* (5), 801-804
- (10) Kawakishi, S.; Tsunehiro, J.; Uchida, K. Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211* (1), 167-171
- (11) Liedke, R. Bildung von Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori-Umlagerungsprodukten. Dissertation, Universität Münster, Münster, **1999**
- (12) Barth, I. A. Beiträge zur Chemie der Ozone in der nichtenzymatischen Bräunung (Maillard-Reaktion). Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin, **2006**
- (13) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of alpha-Dicarbonyl Compounds via a "Peeling Off" Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (12), 6219-6226

-
- (14) Morita, N.; Inoue, K.; Hayashi, H.; Takagi, M. Structural changes of quinoxaline derivatives, with special reference to 2-(2',3'-dihydroxypropyl)-3-hydroxymethylquinoxaline in alkaline and acidic solutions. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47* (9), 2053-2059
- (15) 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* (3), 222-228
- (16) 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* (10), 2465-2472
- (17) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. 3-Deoxypentosulose: An alpha-Dicarbonyl Compound Predominating in Nonenzymatic Browning of Oligosaccharides in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (6), 1659-1664
- (18) Mavric, E.; Henle, T. Isolation and identification of 3,4-dideoxypentosulose as specific degradation product of oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223* (6), 803-810
- (19) Grandhee, S. K.; Monnier, V. M. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (18), 11649-11653
- (20) Rizzi, G. P. Role of phosphate and carboxylate ions in Maillard browning. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (4), 953-957
- (21) Hauck, T.; Hubner, Y.; Bruhlmann, F.; Schwab, W. Alternative pathway for the formation of 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, the proposed precursor of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone as well as autoinducer-2, and its detection as natural constituent of tomato fruit. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2003**, *1623* (2-3), 109-119
- (22) Nishikawa, Y.; Toyoshima, Y.; Kurata, T. Identification of 3,4-dihydroxy-2-oxo-butanal (L-threosone) as an intermediate compound in oxidative degradation of dehydro-L-ascorbic acid and 2,3-diketo-L-gulonic acid in a deuterium oxide phosphate buffer. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2001**, *65* (8), 1707-1712
- (23) Yaylayan, V. A.; Keyhani, A. Origin of Carbohydrate Degradation Products in L-Alanine/D-[13C]Glucose Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (6), 2415-2419
- (24) 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* (18), 6667-6676

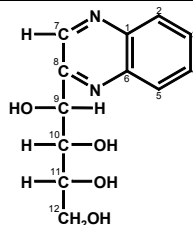
-
- (25) Voigt, M.; Glomb, M. A. Reactivity of 1-Deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose: A Key Intermediate in the Maillard Chemistry of Hexoses. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (11), 4765-4770
- (26) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Formation of alpha-dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.A* **1998**, *207* (1), 50-54
- (27) Weenen, H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62* (4), 393-401
- (28) Yaylayan, V. A.; Keyhani, A. Origin of 2,3-Pentanedione and 2,3-Butanedione in D-Glucose/L-Alanine Maillard Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (8), 3280-3284
- (29) 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* (1), 109-116
- (30) Wells-Knecht, K. J.; Zyzak, D., V; Litchfield, J. E.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **1995**, *34* (11), 3702-3709
- (31) Hofmann, T.; Bors, W.; Stettmaier, K. Studies on Radical Intermediates in the Early Stage of the Nonenzymic Browning Reaction of Carbohydrates and Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (2), 379-390
- (32) Hayashi, T.; Namiki, M. Role of sugar fragmentation in the Maillard reaction. *Dev. Food Sci.* **1986**, *13* (Amino-Carbonyl React. Food Biol. Syst.), 29-38
- (33) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of alpha -Dicarbonyl Compounds in Maillard Reaction Systems and in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (11), 5543-5550
- (34) Morita, N.; Inoue, K.; Takagi, M. Quinoxalines derived from D-glucose and O-phenylenediamine in a weakly acidic medium. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45* (11), 2665-2668
- (35) Hayashi, T.; Namiki, M. Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50* (8), 1965-1970
- (36) Hayashi, T.; Mase, S.; Namiki, M. Formation of three-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amines or amino acids. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50* (8), 1959-1964
- (37) Cämmerer, B.; Wedzicha, B. L.; Kroh, L. W. Nonenzymic browning reactions of retro-aldol degradation products of carbohydrates. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.A* **1999**, *209* (3-4), 261-265

- (38) Pfahler, C. Synthese, Strukturaufklärung und Nachweis reaktiver Abbauprodukte von 1-Desoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin, **2002**
- (39) 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* (18), 6677-6684
- (40) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of alpha-Dicarbonyl Compounds via a "Peeling Off" Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (12), 6219-6226
- (41) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Synthesis of 1-deoxy-d-erythro-hexo-2,3-diulose, a major hexose Maillard intermediate. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329* (3), 515-523
- (42) Bravo, A.; Herrera, J. C.; Scherer, E.; Yon, N.; Rubsam, H.; Madrid, J.; Zufall, C.; Rangel-Aldao, R. Formation of alpha-dicarbonyl compounds in beer during storage of pilsner. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (11), 4134-4144
- (43) Morita, N.; Mizutani, M.; Hayashi, K.; Kirihata, M.; Ichimoto, I.; Ueda, H.; Takagi, M. Quinoxalines derived from D-glucose and maltose with o-phenylenediamine under refluxed conditions in alkaline media. *Bull. Univ. Osaka Prefect.*, **1983**, *35*, 59-70
- (44) Morita, N.; Inoue, K.; Takagi, M. Quinoxalines Derived from Disaccharides with Ortho-Phenylenediamine Under Weakly Acidic Reflux Conditions. *Agricultural and Biological Chemistry* **1985**, *49* (11), 3279-3289
- (45) Beck, J.; Ledl, F.; Severin, T. Formation of glucosyl deoxyosones from Amadori compounds of maltose. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1989**, *188* (2), 118-121
- (46) Larsen, L.; Rowe, D. J.; Garner, C. D.; Joule, J. A. Model studies related to the cofactor of oxomolybdoenzymes. *J. Chem. Soc.*, **1989**, (12), 2317-2327
- (47) Gabriel, J.; Volc, J.; Kubatova, E.; Palkova, Z.; Pospisek, M. A convenient laboratory procedure for the preparation of cortalcerone, a fungal antibiotic beta -pyrone. *Carbohydr. Res.* **1994**, *252*, 297-301
- (48) Whistler, R. L.; BeMiller, J. N. 4-Deoxy-D-glycero-2,3-hexodiulose, the dicarbonyl intermediate in the formation of D-isosaccharinic acids [3-deoxy-2-(hydroxymethyl)-D-erythro-(D-threo-)pentonic acids]. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3705-3707
- (49) Pejin, J. D.; Grujic, O. S.; Marjanovic, N. J.; Vujic, D. N.; Kocic-Tanackov, S. D. Determination of diacetyl and 2,3-pentanedione in beer by GC/MS using solid-phase extraction columns. *Acta Period. Technol.* **2002**, *33*, 45-54

-
- (50) De Revel, G.; Pripis-Nicolau, L.; Barbe, J. C.; Bertrand, A. The detection of alpha -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80* (1), 102-108
- (51) Daglia, M.; Papetti, A.; Aceti, C.; Sordelli, B.; Spin, V.; Gazzani, G. Isolation and determination of alpha-dicarbonyl compounds by RP-HPLC-DAD in green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (22), 8877-8882
- (52) Velisek, J.; Davidek, J.; Pokorny, J.; Grundova, K.; Janicek, G. Reactions of glyoxal with glycine. II. Influence of reaction conditions on the course of reaction. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1972**, *149* (6), 323-329
- (53) Pickett, D. J.; Yap, K. S. Production of glyoxylic acid by the electrochemical reduction of oxalic acid solutions. *J. Appl. Electrochem.* **1974**, *4* (1), 17-23
- (54) Hiller, R. L. Bedeutung von 1-Amino-1,4-didesoxyglucoson in der Maillard-Reaktion. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, Berlin, **2000**
- (55) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. Protective Groups in organic chemistry. **1991**
- (56) Bogatskii, A. V.; Kamalov, G. L.; Luk'yanenko, N. G.; Petrenko, N. F.; Gernega, S. A. Stereochemistry of heterocycles. XLV. Synthesis and properties of 2-carboxy- and 2-alkoxy carbonyl-substituted cyclic acetals. *Zh. Org. Khim.* **1977**, *13* (6), 1330-1333
- (57) Devos, A.; Remion, J.; Frisque-Hesbain, A. M.; Colens, A.; Ghosez, L. Synthesis of acyl halides under very mild conditions. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, (24), 1180-1181
- (58) Hudlicky, M. An improved apparatus for the laboratory preparation of diazomethane. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (26), 5377-5379
- (59) Madson, M. A.; Feather, M. S. An improved preparation of 3-deoxy-D-erythro-hexos-2-ulose via the bis(benzoylhydrazone) and some related constitutional studies. *Carbohydr. Res.* **1981**, *94* (2), 183-191
- (60) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (17), 10017-10026

IV. Anhang

Strukturaufklärung (NMR-, GC/MS- und HR/MS-Daten)



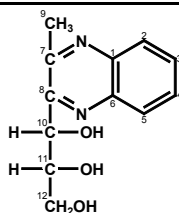
| CD ₃ OD | | Glucoson-Q | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--|
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] | |
| 1 | | 144,4 | |
| 2 | 8,05 (2H, m) | 129,4 | |
| 3 | 7,79 (2H, m) | 128,2 | |
| 4 | 7,79 (2H, m) | 128,4 | |
| 5 | 8,05 (2H, m) | 129,9 | |
| 6 | | 141,3 | |
| 7 | 9,11 (1H, s) | 151,4 | |
| 8 | | 158,2 | |
| 9 | 5,29 (1H, d) ³ J=6,0 | 72,6 | |
| 10 | 4,94 (1H, dd) ³ J=4,6, ³ J=6,2 | 74,3 | |
| 11 | 3,86 (1H, m) ³ J=3,3 ³ J=6,5 ³ J=4,9 | 71,7 | |
| 12 | 3,77 (1H, dd) ² J=12,2 ³ J=3,1 3,65 (1H, dd) ² J=12,2 ³ J=6,4 | 63,7 | |

Tabelle I: ¹H und ¹³C NMR-Daten Glucoson-Q

| C ₂₄ H ₄₆ N ₂ O ₄ Si ₄ | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄ Na | 273,0846 | 273,0849 |
| 538 (14) | | | |
| 523 (10) | | | |
| 307 (58) | | | |
| 232 (34) | | | |
| 217 (64) | | | |
| 147 (50) | | | |
| 103 (84) | | | |
| 73 (100) | | | |

Tabelle III: HR/MS-Daten Glucoson-Q

Tabelle II: GC/MS-Daten Glucoson-Q

CD₃OD

1-Desoxyglucoson-Q

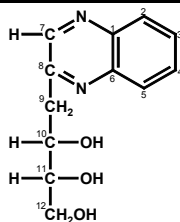
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 142,1 |
| 2 | 8,09 (1H, m) | 130,4 |
| 3 | 7,75 (2H, m) | 128,7 |
| 4 | 7,75 (2H, m) | 129,7 |
| 5 | 7,97 (1H, m) | 131,1 |
| 6 | | 141,9 |
| 7 | | 155,3 |
| 8 | | 158,1 |
| 9 | 2,86 (3H, s) | 22,6 |
| 10 | 5,09 (1H, d) ³ J=8,3 | 76,3 |
| 11 | 4,08 (1H, m) ³ J=3,1 ³ J=5,4 ³ J=8,4 | 71,9 |
| 12 | 3,92 (1H, dd) ² J=11,4 ³ J=3,2 3,86 (1H, dd) ² J=11,4 ³ J=5,6 | 64,8 |

Tabelle IV: ¹H und ¹³C NMR-Daten 1-Desoxyglucoson-Q

| <u>C₂₁H₄₃₈N₂O₃Si₃</u> | <u>[M+Na]⁺</u> | <u>m/z (kalkuliert)</u> | <u>m/z (ermittelt)</u> |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| m/z | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃ Na | 257,0896 | 257,0896 |
| 450 (2) | | | |
| 435 (8) | | | |
| 246 (88) | | | |
| 205 (50) | | | |
| 147 (70) | | | |
| 117 (46) | | | |
| 73 (100) | | | |

Tabelle VI: HR/MS-Daten 1-Desoxyglucoson-Q

Tabelle V: GC/MS-Daten 1-Desoxyglucoson-Q

CD₃OD

3-Desoxyglucoson-Q

| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 143,0 |
| 2 | 8,04 (2H, m) | 130,5 |
| 3 | 7,78 (2H, m) | 129,3 |
| 4 | 7,78 (2H, m) | 129,5 |
| 5 | 8,04 (2H, m) | 131,3 |
| 6 | | 142,4 |
| 7 | 8,84 (1H, s) | 155,8 |
| 8 | | 157,4 |
| 9 | 3,13 (1H, d) ² J=14,1 ³ J=9,3 | 40,5 |
| | 3,41 (1H, d) ² J=14,1 ³ J=3,3 | |
| 10 | 4,09 (1H, m) ³ J=2,9 ³ J=6,6 ³ J=9,5 | 76,1 |
| 11 | 3,61 (1H, m) ³ J=3,7 ³ J=6,0 ³ J=6,4 | 72,9 |
| 12 | 3,81 (1H, dd) ² J=10,9 ³ J=3,6 | 64,5 |
| | 3,65 (1H, dd) ² J=11,0 ³ J=6,0 | |

Tabelle VII: ¹H und ¹³C NMR Daten 3-Desoxyglucoson-QC₂₁H₃₈N₂O₃Si₃[M+Na]⁺

m/z (kalkuliert)

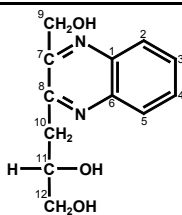
m/z (ermittelt)

m/z
450 (2)
435 (5)
360 (26)
245 (82)
217 (46)
146 (52)
73 (100)

C₁₂H₁₄N₂O₃Na 257,0896 257,0896

Tabelle IX: HR/MS-Daten 3-Desoxyglucoson-Q

Tabelle VIII: GC/MS-Daten 3-Desoxyglucoson-Q



 CD₃OD 4-Desoxyglucoson-Q

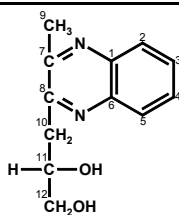
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|---------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 142,6 |
| 2 | 8,04 (1H, m) | 130,7 |
| 3 | 7,76 (1H, m) | 129,3 |
| 4 | 7,76 (1H, m) | 129,5 |
| 5 | 8,04 (1H, m) | 130,9 |
| 6 | | 141,4 |
| 7 | | 155,9 |
| 8 | | 158,9 |
| 9 | 5,02 (2H, s) | 64,4 |
| 10 | 3,19 (1H, dd) ² J=14,7 ³ J=8,2 | 38,8 |
| | 3,24 (1H, dd) ² J=14,7 ³ J=4,8 | |
| 11 | 4,28 (1H, m) | 72,9 |
| 12 | 3,66 (1H, dd) ² J=11,2 ³ J=4,9 | 67,1 |
| | 3,62 (1H, dd) ² J=11,2 ³ J=5,7 | |

Tabelle X: ¹H und ¹³C NMR Daten 4-Desoxyglucoson-Q

| C ₂₁ H ₃₈ N ₂ O ₃ Si ₃ | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃ Na | 257,0898 | 257,0897 |
| 435 (14) | | | |
| 360 (35) | | | |
| 347 (16) | | | |
| 270 (40) | | | |
| 246 (18) | | | |
| 181 (23) | | | |
| 147 (33) | | | |
| 73 (100) | | | |

Tabelle XII: HR/MS-Daten 4-Desoxyglucoson-Q

Tabelle XI: GC/MS-Daten 4-Desoxyglucoson-Q



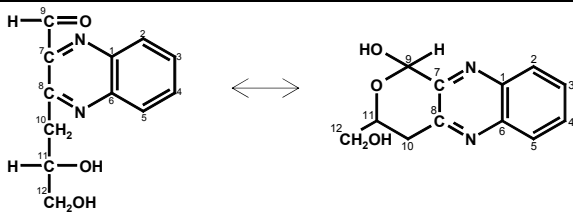
| D ₂ O | | 1,4-Dideoxyglucoson-Q | |
|------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|--|
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] | |
| 1 | | 139,2 | |
| 2 | 7,54 (1H, m) | 129,5 | |
| 3 | 7,48 (1H, m) | 126,9 | |
| 4 | 7,48 (1H, m) | 126,5 | |
| 5 | 7,54 (1H, m) | 129,8 | |
| 6 | | 138,9 | |
| 7 | | 153,9 | |
| 8 | | | |
| 9 | 2,46 (3H, s) | 21,5 | |
| 10 | 2,89 (1H, dd) ² J=14,7 ³ J=8,1 | 38,1 | |
| | 2,85 (1H, dd) ² J=14,7 ³ J=5,3 | | |
| 11 | 4,05 (1H, m) | 70,8 | |
| 12 | 3,52 (1H, dd) ² J=11,7 ³ J=4,0 | 65,1 | |
| | 3,59 (1H, dd) ² J=11,7 ³ J=6,5 | | |

Tabelle XIII: ¹H und ¹³C NMR Daten 1,4-Dideoxyglucoson-Q

| <u>C₁₈H₃₀N₂O₂Si₂</u> | <u>[M+Na]⁺</u> | <u>m/z (kalkuliert)</u> | <u>m/z (ermittelt)</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| m/z | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ Na | 241,0950 | 241,0947 |
| 347 (12) | | | |
| 272 (100) | | | |
| 259 (62) | | | |
| 243 (13) | | | |
| 158 (74) | | | |
| 147 (30) | | | |
| 73 (75) | | | |

Tabelle V: HR/MS-Daten 1,4-Dideoxyglucoson-Q

Tabelle XIV: GC/MS-Daten 1,4-Dideoxyglucoson-Q



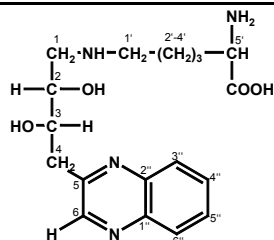
| CD ₃ OD | | 1,2,3-Tricarboxyl-Q | |
|--------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|--|
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] | |
| 1 | | 143,3 | |
| 2 | 8,04 (1H, m) | 131,7 | |
| 3 | 7,81 (1H, m) | 129,8 | |
| 4 | 7,81 (1H, m) | 129,1 | |
| 5 | 8,04 (1H, m) | 130,9 | |
| 6 | | 142,3 | |
| 7 | | 151,6 | |
| 8 | | 152,2 | |
| 9 | 6,09 (1H, s) | | |
| 10 | 3,19 (1H, dd) ² J=17,6 ³ J=9,9 | 34,7 | |
| | 3,14 (1H, dd) ² J=17,6 ³ J=5,1 | | |
| 11 | 4,64 (1H, m) | 68,7 | |
| 12 | 3,79 (1H, dd) ² J=11,7 ³ J=4,3 | 65,4 | |
| | 3,83 (1H, dd) ² J=11,7 ³ J=5,1 | | |

Tabelle XVI: ¹H und ¹³C NMR Daten 1,2,3-Tricarboxyl-Q

| C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₃ Si ₂ | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ Na | 255,0735 | 255,0737 |
| 376 (44) | | | |
| 361 (26) | | | |
| 286 (34) | | | |
| 273 (100) | | | |
| 168 (93) | | | |
| 73 (88) | | | |

Tabelle XIII: HR/MS-Daten 1,2,3-Tricarboxyl-Q

Tabelle XVII: GC/MS-Daten 1,2,3-Tricarboxyl-Q

D₂O

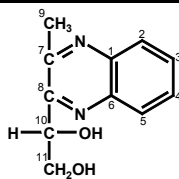
Lederer Glucoson-Q

| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 3,02 (2H, dd) | 50,1 |
| 2 | 3,82 (1H, m) | 70,7 |
| 3 | 4,02 (1H, m) | 72,8 |
| 4 | 2,90 (2H, dd) | 39,2 |
| 5 | | 154,6 |
| 6 | 8,63 (1H, s) | 146,2 |
| 1'' | 2,89 (2H, m) | 47,7 |
| 2'' | 1,6 (2H, m) | 26,1 |
| 3'' | 1,3 (2H, m) | 22,0 |
| 4'' | 1,8 (2H, m) | 27,8 |
| 5'' | 3,46 (1H, t) ₃ J=5,8 | 55,1 |
| 1'' | | 141,0 |
| 2'' | | 139,9 |
| 3'' | 7,79 (2H, m) | 127,9 |
| 4'' | 7,68 (2H, m) | 130,3 |
| 5'' | 7,68 (2H, m) | 131,1 |
| 6'' | 7,79 (2H, m) | 127,5 |

Tabelle XIX: ¹H und ¹³C NMR Daten Lederer Glucoson-Q

| [M+H] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 363,2027 | 363,2029 |

Tabelle XX: HR/MS-Daten Lederer Glucoson-Q

CD₃OD 1-Desoxypentose-Q

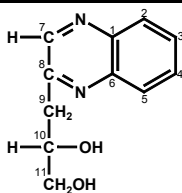
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 143,8 |
| 2 | 8,08 (1H, m) | 130,5 |
| 3 | 7,75 (2H, m) | 128,8 |
| 4 | 7,75 (2H, m) | 129,8 |
| 5 | 7,98 (1H, m) | 131,2 |
| 6 | | 141,7 |
| 7 | | 156,5 |
| 8 | | 154,7 |
| 9 | 2,84 (3H, s) | 22,3 |
| 10 | 5,15 (1H, dd) ³ J=5,6 ³ J=6,2 | 72,8 |
| 11 | 3,96 (1H, dd) ² J=11,4 ³ J=6,3 4,03 (1H, dd) ² J=11,4 ³ J=5,4 | 66,3 |

Tabelle XXI: ¹H und ¹³C NMR Daten 1-Desoxypentose-Q

| C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O ₂ Si ₂ | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ Na | 227,0791 | 227,0790 |
| 348 (30) | | | |
| 333 (20) | | | |
| 258 (36) | | | |
| 245 (60) | | | |
| 147 (26) | | | |
| 73 (100) | | | |

Tabelle XXIII: HR/MS-Daten 1-Desoxypentose-Q

Tabelle XXII: GC/MS-Daten 1-Desoxypentose-Q

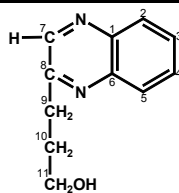


| CD ₃ OD | | 3-Desoxy-2,5-DP | |
|--------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|--|
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] | |
| 1 | | 147,8 | |
| 2 | 8,07 (2H, m) | 129,5 | |
| 3 | 7,80 (2H, m) | 131,3 | |
| 4 | 7,80 (2H, m) | 130,5 | |
| 5 | 8,07 (2H, m) | 129,4 | |
| 6 | | 144,8 | |
| 7 | 8,81 (1H, s) | 154,9 | |
| 8 | | 156,9 | |
| 9 | 3,11 (1H, dd) ² J=14,0 ³ J=8,7 | 40,9 | |
| | 3,25 (1H, dd) ² J=14,0 ³ J=4,1 | | |
| 10 | 4,16 (1H, m) | 72,8 | |
| 11 | 3,63 (1H, dd) ² J=11,3 ³ J=5,1 | 66,9 | |
| | 3,60 (1H, dd) ² J=11,2 ³ J=5,8 | | |

Tabelle XXIV: ¹H und ¹³C NMR Daten 3-Desoxy-2,5-DP

| C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O ₂ Si ₂ | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ Na | 227,0790 | 227,0789 |
| 333 (19) | Tabelle XXVI: HR/MS-Daten 3-Desoxy- pentose-2,5-DP | | |
| 258 (100) | | | |
| 245 (92) | | | |
| 169 (50) | | | |
| 144 (38) | | | |
| 73 (79) | | | |

Tabelle XXV: GC/MS-Daten 3-Desoxy-2,5-DP

CD₃OD

3,4-Dideoxypentose-Q

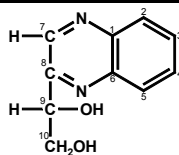
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|---------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 141,7 |
| 2 | 8,96 (1H, m) | 129,9 |
| 3 | 7,72 (1H, m) | 128,0 |
| 4 | 7,72 (1H, m) | 128,5 |
| 5 | 8,96 (1H, m) | 129,1 |
| 6 | | 140,6 |
| 7 | 8,76 (1H, s) | |
| 8 | | 157,5 |
| 9 | 3,07 (2H, t) ³ J=7,7 | 31,4 |
| 10 | 2,05 (2H, m) | 32,1 |
| 11 | 3,66 (2H, t) ³ J=6,3 | 60,8 |

Tabelle XXVII: ¹H und ¹³C NMR Daten 3,4-Dideoxypentose-Q

| C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₅ Si | [M+H] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ Na | 189,1024 | 189,1022 |
| 245 (15) | | | |
| 171 (35) | | | |
| 144 (100) | | | |
| 129 (5) | | | |
| 73 (9) | | | |

Tabelle XXIX: HR/MS-Daten 3,4-Dideoxypentose-Q

Tabelle XXIII: GC/MS-Daten 3,4-Dideoxypentose-Q

CD₃OD

Threoson-Q

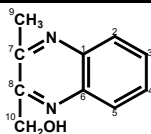
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 144,1 |
| 2 | 8,06 (2H, m) | 129,7 |
| 3 | 7,80 (2H, m) | 128,3 |
| 4 | 7,80 (2H, m) | 128,5 |
| 5 | 8,06 (2H, m) | 130,1 |
| 6 | | 141,4 |
| 7 | 9,07 (1H, s) | 151,5 |
| 8 | | 156,9 |
| 9 | 4,98 (1H, dd) ³ J=5,6 ³ J=4,3 | 73,9 |
| 10 | 3,97 (1H, dd) ² J=9,3 ³ J=5,5 3,89 (1H, dd) ² J=9,3 ³ J=4,1 | 65,6 |

Tabelle XXX: ¹H und ¹³C NMR Daten Threoson-Q

| C ₁₆ H ₂₆ N ₂ O ₂ Si ₂ | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂ Na | 213,0634 | 213,0633 |
| 334 (42) | | | |
| 319 (16) | | | |
| 231 (96) | | | |
| 146 (44) | | | |
| 103 (24) | | | |
| 73 (100) | | | |

Tabelle XXXII: HR/MS-Daten Threoson-Q

Tabelle XXXI: GC/MS-Daten Threoson-Q

CD₃OD

1-Desoxythreoson-Q

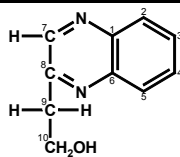
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 142,5 |
| 2 | 8,01 (1H, m) | 130,6 |
| 3 | 7,74 (2H, m) | 128,9 |
| 4 | 7,74 (2H, m) | 129,7 |
| 5 | 8,05 (1H, m) | 131,1 |
| 6 | | 141,7 |
| 7 | | 154,8 |
| 8 | | 155,9 |
| 9 | 2,75 (3H, s) | 21,8 |
| 10 | 4,92 (2H, s) | 64,6 |

Tabelle XXXIII: ¹H und ¹³C NMR Daten 1-Desoxythreoson-Q

| C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O _{Si} | [M+Na] ⁺ | <i>m/z</i> (kalkuliert) | <i>m/z</i> (ermittelt) |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>m/z</i> | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ ONa | 197,0685 | 197,0688 |
| 246 (50) | | | |
| 231 (100) | | | |
| 157 (36) | | | |
| 115 (22) | | | |
| 89 (24) | | | |
| 73 (36) | | | |

Tabelle XXXV: HR/MS-Daten
1-Desoxythreoson-Q

Tabelle XXXIV: GC/MS-Daten 1-Desoxythreoson-Q

CD₃OD

3-Desoxythreoson-Q

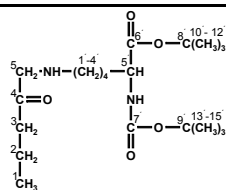
| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|-----|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | | 143,1 |
| 2 | 8,03 (2H, m) | 130,5 |
| 3 | 7,78 (2H, m) | 129,4 |
| 4 | 7,78 (2H, m) | 129,5 |
| 5 | 8,03 (2H, m) | 131,3 |
| 6 | | 142,0 |
| 7 | 8,82 (1H, s) | 147,4 |
| 8 | | 156,9 |
| 9 | 3,20 (2H, t) ³ J=6,2 | 39,9 |
| 10 | 4,12 (2H, t) ³ J=6,2 | 61,7 |

Tabelle XXXVI: ¹H und ¹³C NMR Daten 3-Desoxythreoson-Q

| C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O _{Si} | [M+Na] ⁺ | m/z (kalkuliert) | m/z (ermittelt) |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| m/z | C ₁₀ H ₁₀ N ₂ ONa | 197,0685 | 197,0687 |
| 246 (30) | | | |
| 231 (66) | | | |
| 201 (26) | | | |
| 156 (100) | | | |
| 129 (28) | | | |
| 73 (70) | | | |

Tabelle XXXIII: HR/MS-Daten 3-Desoxythreoson-Q

Tabelle XXXVII: GC/MS-Daten 3-Desoxythreoson-Q



CD₃OD Buttersäure mit N^t-t-BOC-Lysin-t-Butylester

| C/H | δ ¹ H [ppm] | δ ¹³ C [ppm] |
|---------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 0,93 (3H, t) ³ J=7,3 | 14,5 |
| 2 | 1,62 (2H, m) | 20,4 |
| 3 | 2,13 (2H, t) | 39,1 |
| 4 | | 176,1 |
| 5 | | 61,5 |
| 1' | 2,89 (2H, m) | 39,9 |
| 2' | 1,75 (2H, m) | 39,1 |
| 3' | 1,39 (2H, m) | 24,3 |
| 4' | 1,88 (2H, m) | 32,4 |
| 5' | 3,30 (1H, t) ³ J=3,2 | 55,8 |
| 6' | | 173,8 |
| 7' | | 158,1 |
| 8' | | 80,4 |
| 9' | | 82,5 |
| 10'-12' | 1,43 (3H, s) | 28,2 |
| 13'-15' | 1,50 (3H, s) | 28,7 |

Tabelle XXXIX: ¹H und ¹³C NMR Daten von Buttersäure mit t-BOC-Lysin-t-Butylester

| $[M+H]^+$ | <i>m/z</i> (kalkuliert) | <i>m/z</i> (ermittelt) |
|----------------------|-------------------------|------------------------|
| $C_{18}H_{23}N_2O_9$ | 413,2656 | 413,2658 |

Tabelle XL: HR/MS-Daten Maltoson-Q

| $[M+K]^+$ | <i>m/z</i> (kalkuliert) | <i>m/z</i> (ermittelt) |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| $C_{18}H_{24}N_2O_8K$ | 435,1158 | 435,1164 |

Tabelle XLI: HR/MS-Daten 1-Desoxymaltoson-Q

| $[M+K]^+$ | <i>m/z</i> (kalkuliert) | <i>m/z</i> (ermittelt) |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| $C_{18}H_{24}N_2O_8K$ | 435,1158 | 435,1164 |

Tabelle XLII: HR/MS-Daten 3-Desoxymaltoson-Q

| $[M+Na]^+$ | <i>m/z</i> (kalkuliert) | <i>m/z</i> (ermittelt) |
|------------------------|-------------------------|------------------------|
| $C_{12}H_{12}N_2O_3Na$ | 255,0740 | 255,0741 |

Tabelle XLIII: HR/MS-Daten 2,3,4-Tricarbonyl-Q

Lebenslauf

Persönliche Daten

Jenny Gobert
geboren am 06.09.1977 in Frankfurt/Oder,
ledig

Schulischer Werdegang

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| 09/1984-07/1990 | Karl-Marx-Oberschule in Seelow |
| 09/1990-07/1997 | Gymnasium auf den Seelower Höhen in Seelow Abschluss: Abitur |

Ausbildung

| | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 08/1997-07/1999 | Landeskontrollverband Brandenburg e.V. in Waldsiefersdorf Ausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin Abschluss: Milchwirtschaftliche Laborantin |
| 10/1999-04/2005 | Technische Universität Berlin in Berlin Studium der Lebensmittelchemie Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin |
| 06/2005-05/2009 | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle/Saale Promotion unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. M. A. Glomb angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Chemie - Lebensmittelchemie und Umweltchemie |

Selbstständigkeitserklärung

Die selbstständige und eigenhändige Anfertigung dieser Dissertationsarbeit
versichere ich an Eides statt.

Halle (Saale), 03.12.2009

Jenny Gobert