Institut für Ernährungswissenschaft
Professur für Lebensmittelwissenschaften
Justus-Liebig-Universität Gießen

Untersuchungen zur Enantiomerisierung von Aminosäuren mittels chromatographischer Methoden

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08 - Biologie und Chemie

vorgelegt von

Dipl. oec. troph. Christoph Theis

aus Bruchweiler

Gießen, Juni 2010

Tag der Disputation: 10.08.2010

Prüfungskommission:

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Brückner
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn
Prüfer: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt
Prüfer: PD Dr. R. Pätzold

Meinen Eltern und Nicole

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis VI

Tabellenverzeichnis XVI

Abkürzungsverzeichnis XX

1 Einleitung und Zielsetzung 1

1.1 Chemische Grundlagen und Definitionen 3
1.1.1 Stereochemie 3
1.1.2 Einteilung, Nomenklatur und Darstellung 5
1.2 Die Maillard-Reaktion 9
1.3 D-Aminosäuren 15
1.3.1 Entstehungsmechanismen 16
1.3.1.1 Enzymatisch induzierte Racemisierung 17
1.3.1.2 Chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung 18
1.3.1.3 Racemisierungen im Zuge der Maillard-Reaktion 22
1.3.2 Vorkommen von D-AS in Lebensmitteln 28
1.3.3 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Aminosäuren 30
1.4 Amadori-Verbindungen 32
1.4.1 Entstehung und Bedeutung 32
1.4.2 Vorkommen von Amadori-Verbindungen in Lebensmitteln 35
1.4.3 Übersicht zur Synthese, Aufreinigung und Isolierung von Amadori-Verbindungen 39
1.4.3.1 Synthese 39
1.4.3.2 Aufreinigung 42
1.4.3.3 Isolierung aus Probenmatrizes 43
1.4.4 Analytische Verfahren zur Bestimmung 44

2 Experimenteller Teil 48

2.1 Instrumentelle Anordnung und Systemeinstellungen 48
2.1.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) 48
2.1.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) 51

2.1.3 Massenspektrometer des Typs Elektronensprayionisierungs-Ion-Trap (ESI-MS) 52
2.1.4 NMR-Spektroskopie 53
2.2 Geräte und Hilfsmittel 54
2.3 Chemikalien und Probenmaterial 56
2.3.1 Chemikalien 56
2.3.2 Probenmaterial 60
2.3.3 Verwendete Aib-Peptide und native Peptaibole 62
2.3.4 Verwendete Amadori-Verbindungen 62
2.4 Synthese der verwendeten Amadori-Verbindungen 62
2.5 Herstellung der verwendeten Lösungen 63
2.5.1 Herstellung der Lösungen für die DC 63
2.5.2 Herstellung der Sprühreagenzien für die DC 64
2.5.3 Standard-Lösungen 64
2.5.3.1 L-AS-Standardgemisch (proteinogene AS) 64
2.5.3.2 DL-AS-Standardgemisch 65
2.5.3.3 Standardgemisch der proteinogenen Amadori-Verbindungen 66
2.5.3.4 Weitere Standardgemische 67
2.5.4 Reagenzien zur Probenaufarbeitung 67
2.5.5 Reagenzien zur Derivatisierung 68
2.6 Aufreinigung der Amadori-Verbindungen 68
2.6.1 Präparative Aufreinigung mittels Ionenaustauscher (Entfernung des überschüssigen Zuckers) 68
2.6.2 Präparative Trennung mittels Säulenchromatographie (Entfernung der überschüssigen Aminosäure) 69
2.6.2.1 Vorbereitung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) 69
2.6.2.2 Übertragung auf die Säulenchromatographie 70
2.7 Analytische Trennung und Massenspektrometrie der synthetisierten Amadori-Verbindungen mittels HPLC-ESI-MS 70
2.7.1 Methodenentwicklung mittels HPLC 70
2.7.2 Massenspektrometrie 71
2.8 Erhitzungsexperimente 72

2.8.1 Erhitzungsexperimente mit den proteinogenen Amadori-Verbindungen bei 130 °C 72
2.8.2 Erhitzungsexperimente der nichtproteinogenen Aminosäuren und nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen im Honig bei 130 °C 73
2.8.2.1 Erhitzungsexperimente der nichtproteinogenen Aminosäuren 73
2.8.2.2 Erhitzungsexperimente der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen 74
2.9 Probenaufbereitung 74
2.9.1 Proben für GC-SIM-MS Analysen 74
2.9.1.1 Probenaufbereitung mittels Kationenaustauscher 74
2.9.1.2 Derivatisierung der Aminosäuren für die Gaschromatographie 75
2.9.1.3 Überprüfung der Probenaufbereitung 76
2.9.1.4 Totalhydrolyse der Amadori-Verbindungen 77
2.9.1.5 Chirale GC-SIM-MS Analyse der freien Aminosäuren von verschiedenen Kaffeeprodukten 77
2.9.1.6 Chirale GC-SIM-MS Analyse der freien Aminosäuren von Honigen 79
2.9.1.7 Chirale GC-SIM-MS Analyse der proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren nach den Erhitzungsexperimenten 80
2.9.2 Proben für HPLC-ESI-MS Analysen 83
2.9.2.1 Isolierung von Amadori-Verbindungen in Honig mittels Festphasenextraktion 83
2.10 Spaltungsexperimente mit Aib-Peptiden und nativen Peptaibolen 83
2.10.1 Trifluoroacetolyse 83
2.10.2 Analyse der Spaltungsprodukte mittels HPLC-ESI-MS 84
2.11 Methodenvalidierungen und mathematische Grundlagen der Auswertung 85
2.11.1 Statistische Berechnungen 85
2.11.2 Retentionsfaktoren der Dünnschichtchromatographie 85
2.11.3 Validierung GC-MS 86
2.11.3.1 Responsefaktoren 86
2.11.3.2 Berechnung der absoluten und relativen AS-Gehalte 86

2.11.4 Validierung HPLC-ESI-MS 88

3 Ergebnisse und Diskussion 91

3.1 Chirale Aminosäureanalyse in Röstkaffee mittels Gaschromatographie–Massenspektrometrie 91

3.1.1 Diskussion 96

3.2 Synthese, Aufreinigung und Analyse von Amadori-Verbindungen (Fructose-Aminosäuren) 100

3.2.1 Synthese der Amadori-Verbindungen 100

3.2.2 Aufreinigung 104

3.2.2.1 Entfernung von Glucose 104

3.2.2.2 Methodenentwicklung zur präparativen Entfernung der freien AS mittels DC 104

3.2.2.3 Präparative Aufreinigung mittels Säulenchromatographie 106

3.2.2.4 Überprüfung der Aufreinigung mittels DC und NMR 106

3.2.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Amadori-Verbindungen mittels HPLC-ESI-MS 112

3.2.3 Analytische Trennung mittels HPLC 114

3.2.4 Diskussion 117

3.3 Analyse von AS und Amadori-Verbindungen in Honig 121

3.3.1 Chirale GC-SIM-MS Analyse der freien Aminosäuren 121

3.3.2 Nachweis von Amadori-Verbindungen in Honig mittels High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS) 125

3.3.3 Diskussion 127

3.4 Untersuchungen zur Enantiomerisierung von aus Amadori-Verbindungen freigesetzten Aminosäuren während der Maillard-Reaktion 131

3.4.1 Erhitzungsexperimente mit proteinogenen Amadori-Verbindungen 131

3.4.2 Erhitzungsexperimente mit nichtproteinogenen Aminosäuren und Amadori-Verbindungen in der Probenmatrix Honig 135

3.4.3 Qualitativer Nachweis der Bildung von nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen nach Zugabe von nichtproteinogenen AS in Honig und anschließender Erhitzung der Probenmatrix für 30, 60 und 120 Minuten bei 130 °C 142
3.4.4 Diskussion 144
3.4.4.1 Racemisierung von AS in Folge der Erhitzungsversuche 145
3.4.4.2 Nachweis der Bildung von nichtproteinogenen AV in der Probenmatrix Honig nach Zugabe der nichtproteinogenen AS und anschließender Erhitzung 156
3.4.4.3 Ergänzungen zu den postulierten Mechanismen und möglichen Ursachen für die detektierten Racemisierungen 157
3.5 Analyse des Spaltungsverhalten von nativen Peptaibolen und Modellpeptiden nach Trifluoroacetolyse mittels HPLC-ESI-CID-MS 161
3.5.1 Trifluoroacetolyse von Homooligo-Aib-Peptiden 161
3.5.2 Trifluoroacetolyse von Peptaibolen 166
3.5.3 Diskussion 171
3.5.3.1 Spaltungsstellen 172
3.5.3.2 Allgemeiner Spaltungsmechanismus 174
3.5.3.3 Z- und Ac-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu und Z-$(Aib)_7$-O*t*Bu 176
3.5.3.4 Peptaibole 178
3.5.3.5 Übereinstimmung des Trifluoroacetolyse Spaltungsmodell und der massenspektrometrischen Fragmentierung 179
3.5.3.6 Konsequenzen der Spaltungsversuche auf die Racemisierung von AS 180

4 Zusammenfassung 182

5 Literatur 186

6 Anhang 208

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Stereochemische Unterteilung der Isomere 4

Abb. 1-2 Einteilung der proteinogenen AS anhand der chemischen Eigenschaft ihrer Seitenkette 6

Abb. 1-3 Dissoziationsverhalten der AS Alanin bei verschiedenen pH-Werten; (modifiziert nach LÖFFLER et al. 2007: 50) 7

Abb. 1-4 Zweidimensionale Projektion von L- und D-Glycerinaldehyd nach Fischer 8

Abb. 1-5 Strukturen von D-Alanin und L-Alanin (2-Aminopropionsäure) 9

Abb. 1-6 Bildung des Glycosylamins mit Glucose und anschließende Amadori-Umlagerung; (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 276) 10

Abb. 1-7 Amadori-Umwandlung des relativ instabilen Imins zur Furanose (Halbacetal); (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 276) 11

Abb. 1-8 Bildung des Glycosylamins mit Fructose und anschließende Heyns-Umlagerung; (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 276) 11

Abb. 1-9 Überführung der Amadori-Verbindung in 2,3-Endiol und 1,2-Enaminol; (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 277) 12

Abb. 1-10 Struktur der 1-, 3- und 4-Desoxyosone 13

Abb. 1-11 Wege zu den für den Geschmack und Farbe wichtigsten Zwischen- und Endprodukte der Maillard-Reaktion; (modifiziert nach THIS 2002) 15

Abb. 1-12 Enzym-katalysierte AS-Racemisierung mit PLP als Cofaktor; R: AS-Seitenkette; (modifiziert nach EBBERS et al. 1997) 18

Abb. 1-13 Reaktionsmechanismus zur Bildung von D- und L-AS über ein intermediär gebildetes Carbanion am Beispiel der AS Alanin; (modifiziert nach BADA und SCHROEDER 1975) 19

Abb. 1-14 Protonenkatalysierte Enolisierung von AS; * α-C-Atom; (modifiziert nach FRANK et al. 1981) 20

Abb. 1-15 Besonderheiten (A: konjugierte Dienolstruktur; B: exozyklische Doppelbildung; C: Wasserstoffbrückenbindung) der Seitenketten der AS Asp, Pro und Ser zur Erklärung der Racemisierungsanfälligkeiten im sauren pH-Bereich; (modifiziert nach FRANK et al. 1981) 21

Abb. 1-16 Mechanismus zur Bildung von D-AS über einen planares Enol-Intermediat der AS Asp bei pH 2-3 ; *chirales α-C-Atom; (modifiziert nach ERBE und BRÜCKNER 2000b) 21

Abb. 1-17 Relativer D-AS-Gehalt (D%=(D/D+L)*100) bei verschiedenen Rösttemperaturen von Kakaobohnen; (modifiziert nach CALIGIANI et al. 2007) 23

Abb. 1-18 Racemisierungsmechanismus über die Bildung instabiler Imine (Schiff`sche Basen); Durch Reaktion einer Aldose [1] mit einer L-AS [2] oder einer D-AS [2a] kommt es zur reversiblen Bildung einer Schiff´schen Base [3] [3a]. Durch reversible Protonenabstraktion an der Schiff´schen Base entsteht ein Azomethin-Carbanion [4] welches sp^2-hybridisiert ist und somit eine Racemisierung der AS durch eine Reprotonierung ermöglicht. Zudem kann die Schiff´sche Base [3] [3a] in einer anschließenden Amadori-Umlagerung (AU) zur Amadori-Verbindung [5] umgebaut werden, welche durch Protonenabstraktion racemisieren kann; (modifiziert nach BRÜCKNER et al. 2002) 24

Abb. 1-19 Mechanismus zur Bildung von D-AS aus Amadori-Verbindungen [1]. Aus [1] entstehen durch Enolisierung 2,3-Endiole [2a] bzw. 1,2-Enaminole [2b]. Durch Protonenabstraktion werden diese Verbindungen in intermediäre Carbanionen [3a] und [3b] überführt. Durch Reprotonierung bilden sich (partiell) racemisierte AS-Derivate [4a] und [4b]. Die Mischung aus D- und L-AS [5] wird anschließend unter Bildung von 1-Desoxyosonen [6a] und 3-Desoxyosonen [6b] freigesetzt; R^1: AS-Seitenketten; R^2: $-CH_2OH$-Zuckerrest; *: chirales α-C-Atom der AS; (modifiziert nach PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a) 26

Abb. 1-20 Veränderung der Gehalte an Amadori-Verbindungen während der Verarbeitung von Kakaobohnen bei unterschiedlichen Temperaturen (HEINZLER und EICHNER 1991a); ffKTM: fettfreie Kakaotrockenmasse 37

Abb. 1-21 Mutarotation von Glucose in wässriger Lösung; (modifiziert nach BELITZ 2008: 257) 40

Abb. 1-22 Mögliche Konformationen der D-Fructose in wässrigen Lösungen (20 °C); (Daten aus BELITZ 2008: 259).....40

Abb. 1-23 Kapillargaschromatogramm der Analyse von 12 Amadori-Verbindungen nach Oximierung und Silylierung; X Xylit; S Sorbit; F Fructose; G Glucose; GA Galaktoronsäure; I Inosit; Sac Saccharose; T Trehalose; L Lactose; M Maltose; 1 Fru-Ala; 2 Fru-Gly; 3 Fru-Val; 4 Fru-Leu; 5 Fru-Ile; 6 Fru-Gaba; 7 Fru-Pro; 8 Fru-Ser; 9 Fru-Thr; 10 Fru-Asp; 11 Fru-Hyp; 12 Fru-Phe; (modifiziert nach HEINZLER und EICHNER 1991a) 45

Abb. 1-24 HPLC-Chromatogramm der Analyse von 16 Amadori-Verbindungen mittels Nachsäulenderivatisierung mit TTC; 1 Fructose; 2 Glucose; 3 Fru-Leu; 4 Fru-Phe; 5 Fru-Val; 6 Fru-Hyp; 7 Fru-Ala + Fru-Gln; 8 Fru-Asn; 9 Fru-Thr; 10 Fru-Gaba; 11 Fru-Ser; 12 Fru-Py; 13 Fru-Arg; 14 *α*-Fru-Lys; 15 *ε*-Fru-Lys; 16 Fru-Glu; 17 Fru-Asp; 18 *α,ε*-Difru-Lys; (modifiziert nach REUTTER und EICHNER 1989) 46

Abb. 2-1 Veresterung von Alanin mit Methanol 75

Abb. 2-2 Acylierung von Alaninmethylester mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) 76

Abb. 2-3 Zusammenhang zwischen Peakfläche (y in [mAU*s]) und Fru-L-Ala Konzentration (x in [mg/ml]), sowie der daraus resultierenden Kalibrierfunktion y = 45234751 x + 441468; Bestimmtheitsmaß r^2 = 0,9988; Bedingungen siehe Kapitel 2.7 88

Abb. 3-1 GC-SIM-MS eines DL-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 93

Abb. 3-2 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr.7 (Segafredo Intermezzo*)* derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 94

Abb. 3-3 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr.8 (Kopi Luwak) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 95

Abb. 3-4 Reaktionsverlauf zur Bildung von Amadori-Verbindungen 100

Abb. 3-5 HPLC-Chromatogramme Syntheseverlauf der Amadori-Verbindung Fru-Phe; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.1 / λ =265 nm ...101

Abb. 3-6 Farbveränderungen des Reaktionsgemisches während der Synthese von Fru-Phe über einen Synthesezeitraum von 360 Minuten; Synthesebedingungen siehe Kapitel 2.4 103

Abb. 3-7 Dünnschichtchromatographie der proteinogenen AS Prolin, Alanin und Phenylalanin und aus diesen synthetisierten Amadori-Verbindungen; AS: Aminosäuren; AV: Amadori-Verbindungen; S1: Ninhydrin, S2: TZB; 1: L-Pro; 2: Fru-L-Pro; 3: L-Phe; 4: Fru-L-Phe; 5: L-Ala; 6: Fru-L-Ala; Bedingungen siehe Kapitel 2.6.2.1 105

Abb. 3-8 Überprüfung der Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie der synthetisierten Amadori-Verbindung Fru-L-Ala; AS: Aminosäuren; AV: Amadori-Verbindungen; S1: Ninhydrin, S2: TZB; Bedingungen siehe Kapitel 2.6.2.1 107

Abb. 3-9 Struktur der synthetisierte Amadori-Verbindungen mit Summenformel und berechneten Molekulargewicht; Darstellung in der *β*-Pyranoid Form 108

Abb. 3-10 ^{1}H NMR Spektrum der synthetisierten Amadori-Verbindung Fru-L-Ala; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.4 111

Abb. 3-11 ^{13}C NMR Spektrum der synthetisierten Amadori-Verbindung Fru-L-Ala; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.4 112

Abb. 3-12 HPLC-ESI-MS-CID Massenspektrum der synthetisierten Verbindung Fru-L-Ala mit protonierter Molekülmasse *m/z* 251,86 und den mittels CID-MS induzierten, charakteristischen Fragmenten bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.2; M: Molekülion, AS: Aminosäure 113

Abb. 3-13 HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der proteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala, Fru-L-Pro und Fru-L-Phe mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen; Bedingungen siehe Kapitel 2.7 116

Abb. 3-14 HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen; Bedingungen siehe Kapitel 2.7 116

Abb. 3-15 GC-SIM-MS eines DL-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 122

Abb. 3-16 GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH5 (*Ägäischer Pinien Honig)* derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 123

Abb. 3-17 HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der Honigprobe BH5 mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen der detektierten AV; Bedingungen siehe Kapitel 2.7 126

Abb. 3-18 Relative D-AS (%D=D/(D+L)*100) Gehalte in verschiedenen Honigproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 128

Abb. 3-19 GC-SIM-MS eines DL-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und Methanol (Trennung auf FS-LIPODEX® E); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 132

Abb. 3-20 GC-SIM-MS der TFA/Methylester-Derivate von Alanin bzw. Prolin nach der Erhitzung bei 130°C von Fru-L-Ala (für 1 h) bzw. Fru-L-Pro (für 15 h). (a) Bestimmung der freien AS; (b) Bestimmung der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 134

Abb. 3-21 GC-SIM-MS DL-Standard (vgl. Kapitel 2.5.3.2) der nichtproteinogenen AS derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 136

Abb. 3-22 Relative D-AS Gehalte (%D=D/(D+L)*100) der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg nach Zugabe von L-Abu, L-Nva und L-Phg bzw. Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg zur Probenmatrix Honig und anschließender Erhitzung bei 130 °C über verschiedene Zeitintervalle; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 139

Abb. 3-23 GC-SIM-MS Chromatogramm der zeitabhängigen Racemisierung der nichtproteinogenen AS nach Zugabe der nichtproteinogenen AS zur Probenmatrix Honig während der Erhitzung über einen Zeitraum von 120 Minuten bei 130 °C; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7.....140

Abb. 3-24 HPLC/TIC- und SIM-ESI-MS Chromatogramme mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen der detektierten AV nach Zugabe der nichtproteinogenen AS L-Abu, L-Nva und L-Phg in die Probenmatrix und anschließender Erhitzung bei 130 °C für 120 Minuten; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.....143

Abb. 3-25 HPLC/SIM-ESI-MS Chromatogramme nach Zugabe der nichtproteinogenen AS L-Abu, L-Nva und L-Phg in die Probenmatrix und anschließender Erhitzung bei 130 °C für 30, 60 bzw. 120 Minuten; Bedingungen siehe Kapitel 2.7 144

Abb. 3-26 Zeitabhängige Racemisierung der AS aus Fru-L-Ala (orange) und Fru-L-Pro (grün) nach Erhitzung (130 °C), Totalhydrolyse und Aufarbeitung mittels Kationenaustauscher; BW = Blindwert 147

Abb. 3-27 Postulierte Bildung von 4-Desoxyosonen aus Amadori-Verbindungen [1]. Durch Enolisierung entstehen aus [1] 2,3-Endiole [2], die durch Protonenabstraktion in intermediäre Carbanionen [3] überführt werden. Durch Reprotonierung bilden sich partiell racemisierte AS-Derivate [4]. Durch anschließende Wasserabspaltung entstehen 4-Desoxyosone [5]; R^1: AS-Seitenkette; R^2: -CH_2-OH-Zuckerrest, der Stern weist auf die racemische Aminosäure hin.....155

Abb. 3-28 Postulierte Bildung von D-AS innerhalb von 4-Desoxyosonen [1] und deren anschließende Freisetzung durch Säurehydrolyse. Durch Protonenabstraktion entsteht ein Carbanion [2], aus dem durch Reprotonierung partiell racemisierte AS-Derivate [3] entstehen. Die Freisetzung der D- und L-AS [4] erfolgt durch Säurehydrolyse. R^1: AS-Seitenkette; R^2: -CH_2OH, der Stern weist auf die racemische Aminosäure hin.....156

Abb. 3-29 Sequenz der Homooligo-Aib-Peptide und Peptaibole mit zeitabhängigen Spaltungsstellen nach Trifluoroacetolyse; Bedingungen siehe Kapitel 2.10 162

Abb. 3-30 HPLC-ESI-MS-CID Massenspektrum der Verbindung Z-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu mit protonierter Molekülmasse *m/z* 1059,13 und den mittels CID-MS induzierten charakteristischen Fragmenten bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.10; M: Molekülion, b_x: Fragmentionen 163

Abb. 3-31 HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramme der Spaltungsexperimente der Verbindung Z-(Aib)10-O*t*Bu (1) und der daraus resultierenden Peptide 2-16 (vgl. Tabelle 3-12; Nummern der Peptide); Bedingungen siehe Kapitel 2.10 165

Abb. 3-32 HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramme der Spaltungsexperimente der Verbindung Trichotoxin (17) und der daraus resultierenden Peptide 8-25 (unten) mit den entsprechenden charakteristischen Ionen 17a-25a (oben); Peptid 20 konnte nicht eindeutig zugeordnet werden (vgl. Tabelle 3-13; Nummern der Peptide); Bedingungen siehe Kapitel 2.10 167

Abb. 3-33 Möglicher Spaltungsmechanismus nach Trifluoroacetolyse der Sequenz Ac-Aib-NEt_2 *via* intermediärer Bildung eines Ionen-Paares oder eines gemischten Anhydrides (Weg A) oder durch Bildung eines Oxazolons (Weg B). R=Et; HX=TFA; X^-=CF_3COO^-; Bedingungen siehe Kapitel 2.10 174

Abb. 3-34 Vorgeschlagener Mechanismus der C-terminalen Spaltung von Homooligo-$(Aib)_n$-Peptiden *via* sich wiederholender intermediären Bildungen von Oxazolinolium/Oxazolinium- (Oxazolonium) Ionen nach Trifluoroacetolyse, resultierend in der Bildung von Homooligo-$(Aib)_{n-1}$-Peptiden (linke Seite) und entsprechende Bildung einer *b*-Serie von positiven Fragment-Ionen unter den eingestellten Bedingungen des ESI-MS (rechte Seite); eingekreister Rest R repräsentiert einen *α*-Aminoisobutyryl- oder Prolyl-Rest, oder ein disubstituiertes Amin; Bedingungen siehe Kapitel 2.10 175

Abb. A-1 GC-SIM-MS eines äquimolaren L-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.1) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 219

Abb. A-2 Dünnschichtchromatographie der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg und aus diesen synthetisierten Amadori-Verbindungen; AS: Aminosäuren; AV: Amadori-Verbindungen; S1: Ninhydrin, S2: TZB; 1: L-Abu; 2: Fru-L-Abu; 3: L-Nva; 4: Fru-L-Nva; 5: L-Phg; 6: Fru-L-Phg; Bedingungen siehe Kapitel 2.6.2.1 219

Abb- A-3 HPLC-ESI-MS-CID Massenspektrum der synthetisierten Verbindung Fru-L-Nva mit protonierter Molekülmasse *m/z* 280,85 und den mittels CID-MS induzierten, charakteristischen Fragmenten bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.2; M: Molekülion, AS: Aminosäure 220

Abb. A-4 GC-SIM-MS eines äquimolaren L-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.1) derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 220

Abb. A-5 GC-SIM-MS eines äquimolaren L-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.1) derivatisiert mit TFAA und Methanol (Trennung auf FS-LIPODEX® E); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 221

Abb. A-6 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 1 (*Nescafé Gold)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 221

Abb. A-7 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 2 (*Mocca Fix Gold)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 222

Abb. A-8 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 3 (*Rondo Melange)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 222

Abb. A-9 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 4 (*Nescafé Classic)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 223

Abb. A-10 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 5 (*Granarom Finest Quality Caffee)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 223

Abb. A-11 GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 6 (*Café Gold Bellarom)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 224

Abb. A-12 GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH1 (*Kastanien Honig*); TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 224

Abb. A-13 GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH2 (*Akazienhonig);* TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 225

Abb. A-14 GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH3 (*Waldhonig);* TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6 225

Abb. A-15 GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH4 (*Tannenhonig);* TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.16 226

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Literaturübersicht über das Vorkommen von D-AS und Amadori-Verbindungen in verschiedenen Lebensmitteln 27

Tab. 1-2 Veränderung der Gehalte an Amadori-Verbindungen während des Brauprozesses von Bier (Werte aus WITTMANN und EICHNER 1989).....36

Tab. 2-1 Temperaturprogramm des GC-MS GC-17A 49

Tab. 2-2 Druckprogramm des GC-MS GC 17A.....49

Tab. 2-3 Temperaturprogramm des GC-MS HP 6890 50

Tab. 2-4 Druckprogramm des GC-MS HP 6890.....51

Tab. 2-5 Standardparameter der ausgewählten Honigproben 62

Tab. 2-6 Soll-Einwaage [mg] der nichtproteinogenen AS zur Herstellung von 50 mL einer 10 mM bzw. 20 mM DL-AS-Standard-Lösung.....65

Tab. 2-7 Soll-Einwaage [mg] der proteinogenen AS zur Herstellung von 50 mL einer 10 mM bzw. 20 mM DL-AS-Standard-Lösung.....66

Tab. 2-8 Gradientenprogramm zur analytischen Trennung und massenspektrometrischen Analyse der synthetisierten Amadori-Verbindungen 72

Tab. 2-9 Einwaagen [mg] von Fru-Ala und Fru-Pro für 0,2 M Stammlösungen in MeOH.....73

Tab. 2-10 Zeitfenster [min] und Massenfragmente [*m/z*] der Trifluorpropionyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val (Gaschromatograph 1) zur Bestimmung der freien AS in Kaffeeprodukten; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1 und 2.9.1.5 79

Tab. 2-11 Zeitfenster [min] und Massenfragmente *[m/z*] der Trifluorpropionyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val (Gaschromatograph 1) zur Bestimmung der freien AS in Honig; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1 und 2.9.1.6 80

Tab. 2-12 Zeitfenster [min] und Massenfragmente [*m/z*] der Trifluormethyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf FS-LIPODEX® E (Gaschromatograph 2) zur Bestimmung der freien AS nach Erhitzungsexperimenten; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1, 2.8.1 und 2.9.1.7 81

Tab. 2-13 Zeitfenster [min] und Massenfragmente *[m/z*] der Trifluorpropionyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val (Gaschromatograph 1) zur Bestimmung der nichtproteinogenen AS nach Erhitzungsexperimenten; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1, 2.8.2 und 2.9.1.7 82

Tab. 2-14 Gradientenprogramm zur massenspektrometrischen Analyse (HP 1100 Series; Anlage 1) der Spaltungsprodukte der Aib-Peptide und nativen Peptaibole nach Trifluoroacetolyse 84

Tab. 2-15 Retentionszeiten, Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß r^2 der synthetisierten proteinogenen Amadori-Verbindungen 89

Tab. 2-16 Relative Standardabweichung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) sowie Wiederfindungsraten der synthetisierten proteinogenen Amadori-Verbindungen 89

Tab. 3-1 Relative D-AS (%D=D/(D+L)*100) Gehalte in verschiedenen Kaffeeproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5 92

Tab. 3-2 Syntheseverlauf der Amadori-Verbindung Fru-Phe über einen Synthesezeitraum von 360 Minuten/ mAU: milli Absorption Unit (Integrierte Flächen); Synthesebedingungen siehe Kapitel 2.4 102

Tab. 3-3 ^{1}H und ^{13}C Strukturaufklärung der AV Fru-L-Abu (Hauptverbindung: *β*-Fructopyranose Isomer (71%)) 109

Tab. 3-4 ^{13}C Strukturaufklärung der AV Fru-L-Abu (Nebenverbindungen: *α*-D-Fructofuranose (11%), *β*-D-Fructofuranose (12%), *α*-D-Fructopyranose (5%) Isomere) 109

Tab. 3-5 ^{1}H Strukturaufklärung der AV Fru-L-Ala, Fru-L-Pro, Fru-L-Phe, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg (Hauptverbindung: *β*-Fructopyranose Isomer).....110

Tab. 3-6 ^{13}C Strukturaufklärung der AV Fru-L-Ala, Fru-L-Pro, Fru-L-Phe, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg (Hauptverbindung: *β*-Fructopyranose Isomer).....110

Tab. 3-7 Diagnostische Fragmente der synthetisierten AV nach Analyse mittels CID-MS bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.2 114

Tab. 3-8 Absolute L- und D-AS-Gehalte [mg/100g TM] in verschiedenen Honigproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6.....125

Tab. 3-9 Absolute Gehalte [mg/100g TM] an AV in verschiedenen Honigproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.7 127

Tab. 3-10 Relative Gehalte (%D=D/(D+L)*100) der D-Enantiomere von Alanin (%D-Ala) und Prolin (%D-Pro) nach der Erhitzung (130 °C) von Fru-L-Ala bzw. Fru-L-Pro; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 133

Tab. 3-11 Absolute Gehalte (mg/100g Honig) der D- und L-Enantiomere der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg nach Zugabe von L-Abu, L-Nva und L-Phg (Daten A + B) bzw. Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg (Daten C + D) zur Probenmatrix Honig und anschließender Erhitzung bei 130 °C über verschiedene Zeitintervalle; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7 138

Tab. 3-12 Detektierte Peptide (2 – 16), resultierend aus der Trifluoroacetolyse der Verbindung Z-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu (1) und Angabe der zur Charakterisierung bestimmten protonierten Molekülionen $[M+H]^+$; Bedingungen siehe Kapitel 2.10 161

Tab. 3-13 Detektierte Peptide (20, 21, 23, 24, 25) und TFA-Ester (18, 22), resultierend aus der Trifluoroacetolyse der Verbindung Trichotoxin (17) und Angabe der zur Charakterisierung bestimmten protonierten Molekülionen $[M+H]^+$; Bedingungen siehe Kapitel 2.10 ...168

Tab. A-1 D-AS in unbehandelten und verarbeiteten Lebensmitteln (Basen-, Säure- und/oder Hitzeeinwirkung) 208

Tab. A-2 D-AS in fermentierten Lebensmitteln 209

Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie 210

Tab. A-4 Responsefaktoren (TFAA und 1-Propanol; Trennung auf Chirasil®-L-Val) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (RF) und relative Standardabweichung (STABW) der proteinogenen AS....216

Tab. A-5 Responsefaktoren (TFAA und 2-Propanol; Trennung auf Chirasil®-L-Val) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (RF) und relative Standardabweichung (STABW) der proteinogenen AS....217

Tab. A-6 Responsefaktoren (TFAA und Methanol; Trennung auf FS-LIPODEX® E) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (RF) und relative Standardabweichung (STABW) der proteinogenen AS.....218

Tab. A-7 Responsefaktoren (TFAA und 2-Propanol; Trennung auf Chirasil®-L-Val) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (RF) und relative Standardabweichung (STABW) der nichtproteinogenen AS.....218

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung der einzelnen AS siehe Abbildung 1-2

Abb.	Abbildung
Abu	α-Aminobuttersäure
Ac	Acetyl
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
Aib	α-Aminoisobuttersäure
arb	Geräte eigene Einheit
AS	Aminosäure/n
Asx	Asparagin und/oder Asparaginsäure
AV	Amadori-Verbindung/en
BHT	Butyl-hydroxy-toluol (2,6-Ditert.-butyl-p-kresol)
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
CE	Kapillarelektrophorese
COSY	Correlation Spectroscopy
CID	“Ion source collision-induced dissociation”
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Electrospray-Ionisierung
et al.	und Andere
Et_2NH	Diethylamin
FID	Flammenionisationsdetektor
FP	Folgeprodukt
f_R	Responsefaktor
Fru	Fructose
Fru-AS	Fructose-Aminosäure (Amadori-Verbindungen)
Fru-Abu	Fructose-L-Aminobuttersäure
Fru-Ala	Fructose-L-Alanin
Fru-Nva	Fructose-L-Norvalin

Fru-Phe	Fructose-L-Phenylalanin
Fru-Phg	Fructose-L-Phenylglycin
Fru-Pro	Fructose-L-Prolin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
Glc-AS	Glucose-Aminosäuren (Heyns-Verbindungen)
Glx	Glutamin und/oder Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde(n)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMF	Hydroxymethylfurfural
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPAEC	High-Performance Anion-Exchange Chromatography, Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie
HPCEC	High-Performance Cation-Exchange Chromatography, Hochleistungs-Kationenaustauschchromatographie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HV	Heyns-Verbindungen
Hyp	Hydroxyprolin
Iva	Isovalin
i.D.	innerer Durchmesser
Lxx	Leucin oder Isoleucin
MEKC-LIF	chirale micellare elektrokinetische Chromatographie mit Laser-induzierter Fluoreszenz-Detektion
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute
MR	Maillard-Reaktion
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWG	Massenwirkungsgesetz

Nle	Norleucin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nva	Norvalin
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektiert
Orn	Ornithin
Pheol	Phenylalaninol
Phg	Phenylglycin
Pip	Pipecolinsäure
RT	Retentionszeit
SIM	Selected Ion Monitoring
Tab.	Tabelle
*t*Bu	tert. Butyl
TCE	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TIC	Total Ion Chromatogramm
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TM	Trockenmasse
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TZB	Tetrazolblau
Valol	Valinol
Vxx	Valin oder Isovalin
v/v	englisch: volume/volume (Volumen pro Volumen)
Z-Aib-O*t*Bu	Benzyloxycarbonyl-aminoisobuttersäure-tert. Butylester

1 Einleitung und Zielsetzung

Aminosäuren (AS) sind, sowohl frei als auch in Peptiden und Proteinen gebunden, wesentliche Bestandteile von Lebensmitteln. Sie beeinflussen zum einen erheblich die Parameter Geschmack, Farbe und Aroma von Lebensmitteln und liefern zum anderen wichtige Bausteine zur Proteinbiosynthese im menschlichen Körper. Während der Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln sind die Proteine, Peptide und AS oftmals an thermischen und enzymatischen Reaktionen beteiligt, aber auch Einflüsse von Säuren oder Basen verändern nicht nur ihre Konzentration, sondern auch ihre Zusammensetzung (BELITZ et al. 2008). An diesen Reaktionen sind häufig auch Kohlenhydrate beteiligt. Kohlenhydrate sind mengenmäßig die größten vorhandenen organischen Stoffe auf der Erde. Im pflanzlichen Organismus dienen sie vor allem als Gerüststoffe (z. B. Cellulose, Hemicellulosen) und als Speicherstoffe (z. B. Stärke). Im tierischen bzw. menschlichen Organismus dienen sie hauptsächlich zur Gewinnung von Energie und als Kohlenstofflieferant für die Biosynthese (FRANZKE 1996; BELITZ et al. 2008).

Werden Lebensmittel während ihrer Verarbeitung technologisch bedingt einem Wärmeeintrag ausgesetzt, so ist ein beschleunigter Umsatz der vorhandenen AS und Zuckermoleküle zu beobachten. Vor allem reduzierende Zucker, die eine freie Aldehydgruppe haben, reagieren besonders gut mit AS. Diese Reaktion wird als nichtenzymatische Bräunung bzw. als Maillard-Reaktion (MR) bezeichnet (ANGRICK und REWICKI 1980; LEDL 1988). Die ersten analytisch nachweisbaren Verbindungen dieser Reaktion sind die sogenannten Amadori- und Heyns-Verbindungen (vgl. Kapitel 1.4.1).

In vielen wissenschaftlichen Arbeiten (z. B. BRÜCKNER et al. 2001; PÄTZOLD und Brückner 2006a; KIM und LEE 2008; KIM und LEE 2009; JANKOWSKI et al. 2009; BOSSE et al. 2010) konnte zudem gezeigt werden, dass eine Erhitzung von reduzierenden Zuckern und L-AS zu einer Entstehung der korrespondierenden D-AS führen kann. Diese Reaktion wird als Racemisierung bzw. als Enantiomerisierung bezeichnet. Folglich konnte auch die Bildung von D-AS in vielen thermisch

behandelten Lebensmitteln, die einen hohen Anteil an AS und reduzierenden Zuckern aufweisen (vgl. Kapitel 1.3.2), beobachtet werden.

Des Weiteren zeigten Erhitzungsexperimente unserer Arbeitsgruppe mit synthetisierten Amadori-Verbindungen (Fructose-Phenylalanin (Fru-Phe) und Fructose-Prolin (Fru-Pro)), dass die im Anschluss der Erhitzung detektierten D-AS-Enantiomeren aus den Amadori-Verbindungen freigesetzt wurden (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005a; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005b; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006b). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Racemisierungsmechanismus postuliert (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a), der die Bildung von D-AS in zahlreichen Lebensmitteln, beispielsweise in einigen Frucht- und Gemüsesorten (BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994; BRÜCKNER und WESTHAUSER 2003), in grünen Kaffeebohnen (Arabica und Robusta) oder auch in gerösteten Kaffeebohnen (CASAL et al. 2003; CASAL et al. 2005) erklärt. Bezugnehmend auf den Racemisierungsmechanismus wird postuliert, dass D-AS nach dem Abbau der Amadori-Verbindungen oder den ähnlichen Heyns-Verbindungen entstehen (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a). Dies bestätigen auch Versuche von KIM und LEE (2008; 2009) über die Racemisierung bzw. Enantiomerisierung von AS-Enantiomeren im Zuge einer Erhitzung von AS mit Fructose bzw. Glucose in einer wässrigen Lösung.

Folglich ist die chromatographische Trennung und Identifizierung von glykosilierten AS (wie z. B. den Amadori-Verbindungen) bei gleichzeitigem Nachweis von D-AS in der Probenmatrix von Lebensmitteln, bezugnehmend auf den postulierten Mechanismus, von besonderem Interesse.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Bestätigung und Ergänzung des von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Mechanismus. Um dies zu bewerkstelligen, sollten Amadori-Verbindungen zur Verwendung als Standardmaterial synthetisiert, sowie eine effektive Aufreinigungsmethode und eine gute Methode zur Isolierung von Amadori-Verbindungen entwickelt werden. Weiterhin sollte eine HPLC-ESI-MS Methode zur analytischen Trennung und Detektion der Amadori-Verbindungen entwickelt werden.

In Erhitzungsversuchen sollte, auch unter Einbezug nichtproteinogener AS, wiederum gezeigt werden, dass die Bildung von D-AS aus den synthetisierten Amadori-Verbindungen im Zuge der Maillard-Reaktion stattfindet.

Der postulierte Mechanismus ist auf das Vorhandensein von freien AS ausgerichtet. In der Lebensmittelverarbeitung werden die eingesetzten Rohstoffe oftmals auch Säurehydrolysen unterzogen, beispielsweise bei der Herstellung von Würzsoßen, die aus Proteinhydrolysaten hergestellt werden. Dies kann über intermediär gebildete Oxazolone zur Epimerisierung von AS und deren Freisetzung aus dem Peptidverband führen. Bezugnehmend auf diese Art der Lebensmittelverarbeitung sollte ergänzend an Aminoisobuttersäure-haltigen Modellpeptiden und nativen Peptidantibiotika (sog. Peptaibolen) die Spaltungsanfälligkeit verschiedener Bindungsstellen im Peptidverband mittels Trifluoroacetolyse aufgezeigt werden und entsprechende Spaltungsmechanismen postuliert werden.

1.1 *Chemische Grundlagen und Definitionen*

1.1.1 Stereochemie

Als Isomere werden Verbindungen mit gleicher Summenformel, aber unterschiedlicher räumlicher Anordnung der einzelnen Atome bezeichnet. Dies führt zu unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Verbindungen. Abbildung 1-1 zeigt die stereochemische Unterteilung der Isomere.

Die Isomere unterscheiden sich zwischen den Konstitutionsisomeren, die bei gleicher Summenformel eine unterschiedliche Anordnung der Atome aufweisen, und den stereoisomeren Verbindungen, die sich bei gleicher Summenformel und gleicher Primärstruktur nur durch die räumliche Anordnung ihrer Atome unterscheiden. Die Stereoisomere werden weiter in Konfigurationsisomere und Konformere unterteilt (ZEECK et al. 2005).

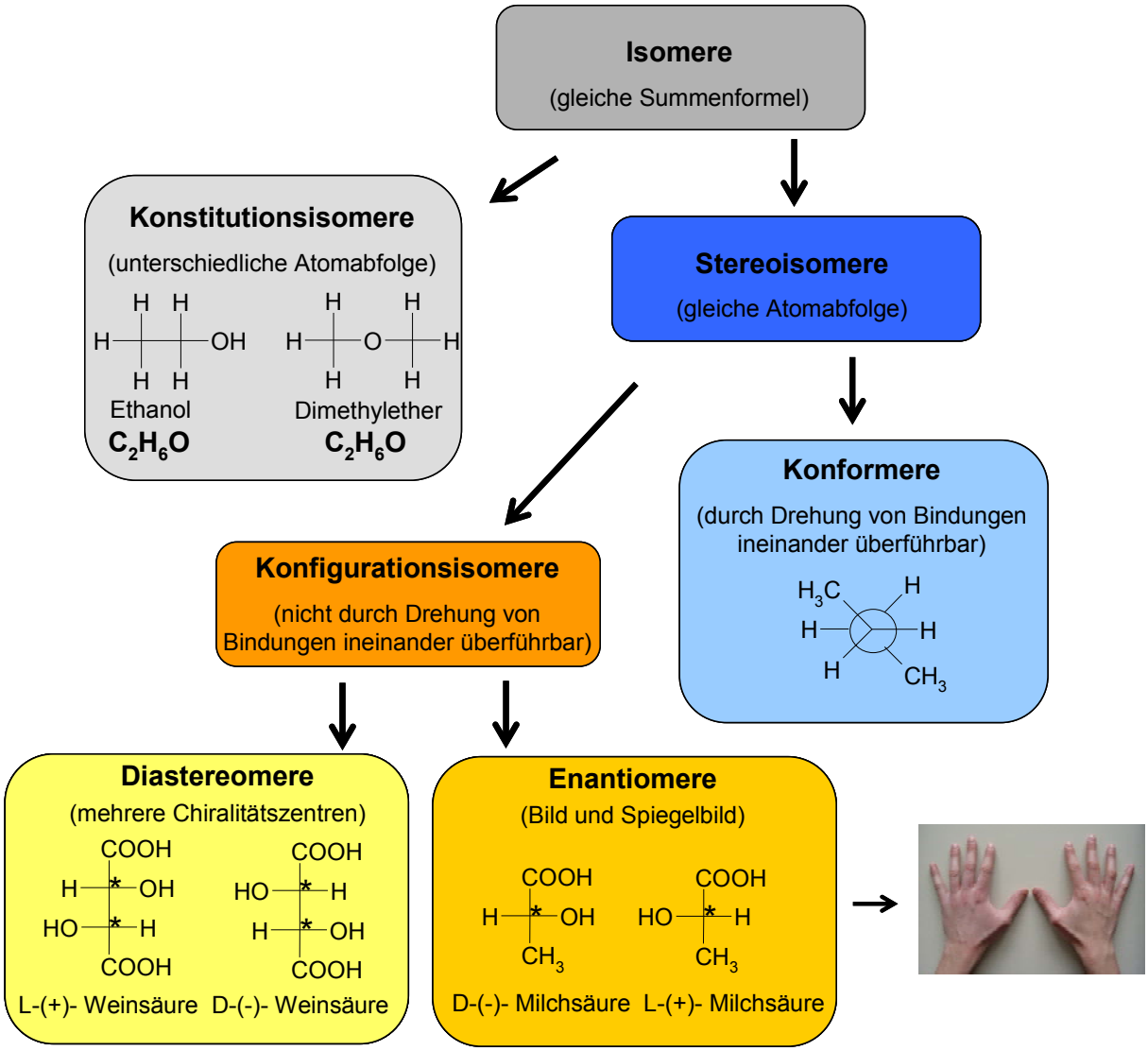


Abb. 1-1 Stereochemische Unterteilung der Isomere

Konformere sind durch Drehung von Einfachbindungen ineinander überführbar, während die Konfigurationsisomere nicht ineinander überführbar sind. Konfigurationsisomere können wiederum in die Gruppen Diastereomere und Enantiomere (optische Isomerie) unterteilt werden (MORTIMER und MÜLLER 2007).

Die für diese Arbeit wichtigste Gruppe sind die Enantiomere (vgl. Abbildung 1-1). Sie sind Stereoisomere des gleichen Moleküls und verhalten sich durch die Anordnung ihrer Atome wie Bild und Spiegelbild oder wie die rechte und die linke Hand zueinander.

Alle proteinbildenden AS, bis auf Glycin (Gly), haben mindestens ein asymmetrisches substituiertes C-Atom. Diese Eigenschaft wird als Chiralität (*Χείρ,* altgriechisch: Hand) bezeichnet (STREITWIESER und HEATHCOCK 1986). Die in nativen Proteinen vorkommenden AS haben üblicherweise eine L-Konfiguration (L-AS) an ihrem *α*-C-Atom (vgl. Kapitel 1.1.2). L- und D-AS sind Enantiomerenpaare, die sich durch identische physikalische Eigenschaften auszeichnen, gegenüber linear polarisiertem Licht zeigen sie jedoch ein unterschiedliches Verhalten (BELITZ et al. 2008).

Die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes wird durch die Enantiomerenpaare um den gleichen Betrag in unterschiedliche Richtungen gedreht. Die Dextro-Form (dextro, lat.: rechts) oder auch (+)-Enantiomer genannt, dreht die Ebene im Uhrzeigersinn und die sogenannte Laevo-Form (laevus, lat.: links) oder (-)-Enantiomer, dreht die Polarisationsebene gegen den Uhrzeigersinn. Dieser Effekt wird als optische Aktivität und die daran beteiligten Enantiomere als optische Antipoden bezeichnet. Ein racemisches Gemisch, bestehend aus der gleichen Anzahl an links- und rechtsdrehenden Enantiomeren (50:50), dreht das Licht zu gleichen Teilen in beide Richtungen und zeigt somit keine optische Aktivität (MORTIMER und MÜLLER 2007). Diese Mischung wird korrekt als Racemat bezeichnet. Speziell in der peptidchemischen Literatur wird aber vielfach von einer ‚teilweisen' oder ‚starken' Racemisierung von AS in Peptiden gesprochen, was im strengen Sinn nicht korrekt ist.
Die Umwandlung bzw. teilweise Umwandlung von einem Enantiomer in sein Spiegelbild wird in dieser Arbeit als Enantiomerisierung, Isomerisierung oder auch als Racemisierung definiert, unabhängig vom prozentualen Anteil der Umwandlung.
In der Literatur wird der Begriff Racemisierung oftmals mit einer Umwandlung der Enantiomeren bis hin zu einem Gleichgewicht (50:50 L zu D) definiert (VOLLHARDT und SCHORE 2000).

1.1.2 Einteilung, Nomenklatur und Darstellung

AS werden aus ernährungsphysiologischer Sicht in essentielle, semiessentielle und nicht-essentielle AS eingeteilt (ELMADFA und LEITZMANN 2004). Aus chemischer

Sicht werden sie nach Aufbau und Eigenschaft ihrer Seitenkette eingeteilt (vgl. Abbildung 1-2).

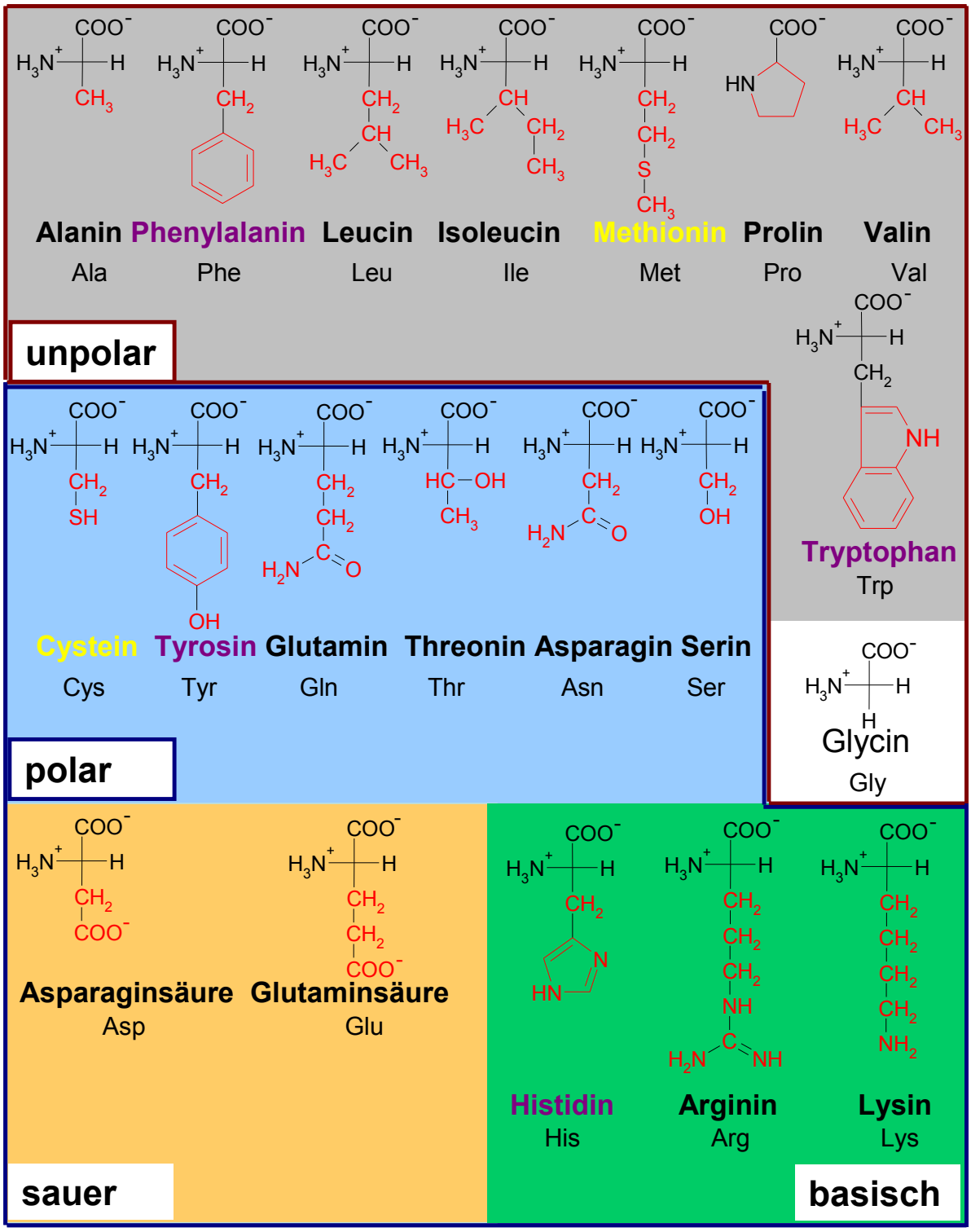
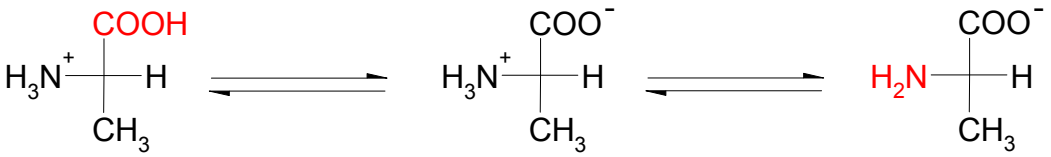


Abb. 1-2 **Einteilung der proteinogenen AS anhand der chemischen Eigenschaft ihrer Seitenkette**

Die Einteilung kann nach polar und unpolar oder nach neutralen, sauren, basischen, aromatischen, schwefelhaltigen oder zyklischen AS erfolgen. Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linearer aliphatischer Seitenkette (Glycin und Alanin), nach verzweigter Seitenkette (Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin) und nach aromatischen AS (Phenylalanin und Tryptophan). Des Weiteren werden AS unterteilt nach positiv geladener, basischer Seitenkette (Lysin, Arginin und Histidin), nach ungeladener Seitenkette (Glutamin, Asparagin, Serin, Threonin und Cystein) und nach negativ geladener saurer Seitenkette (Asparaginsäure, Glutaminsäure). Einige AS (z. B. Tyrosin) können je nach pH-Wert sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften besitzen. Diese werden als amphiphile AS bezeichnet (LÖFFLER et al. 2007).

AS besitzen aufgrund ihrer Struktur Säure-Base-Eigenschaften. Die Aminogruppen fungieren hierbei als schwache Basen und können Protonen aufnehmen. Die Carboxylgruppen fungieren als schwache Säuren, die Protonen abgeben. Je nach pH-Wert liegen die funktionellen Gruppen der AS in Lösung protoniert oder deprotoniert vor. Abbildung 1-3 zeigt das Dissoziationsverhalten der AS Alanin (Ala) bei verschiedenen pH-Werten.



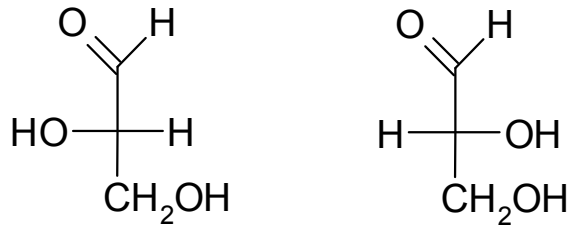
pH 1,0 (Nettoladung +1) | **pH 6,0** (Nettoladung 0) | **pH 11,0** (Nettoladung -1)

Abb. 1-3 **Dissoziationsverhalten der AS Alanin bei verschiedenen pH-Werten; (modifiziert nach LÖFFLER et al. 2007: 50)**

Am sogenannten isoelektrischen Punkt (IP) tragen die AS keine Nettoladung und ihre Löslichkeit ist am geringsten (BELITZ et al. 2008).

Für optisch aktive Substanzen existiert zum einen die D/L-Nomenklatur (dexter, lat.: rechts; laevus, lat.: links) nach Fischer, die überwiegend bei AS und Kohlenhydraten verwendet wird und zum anderen die *R,S*-Nomenklatur (rectus, lat.: rechts; sinister, lat.: links) nach Cahn, Ingold und Prelog, die zur allgemeinen Beschreibung der absoluten Konfiguration dient (MORTIMER und MÜLLER 2007; VOLLHARDT und SCHORE 2000).

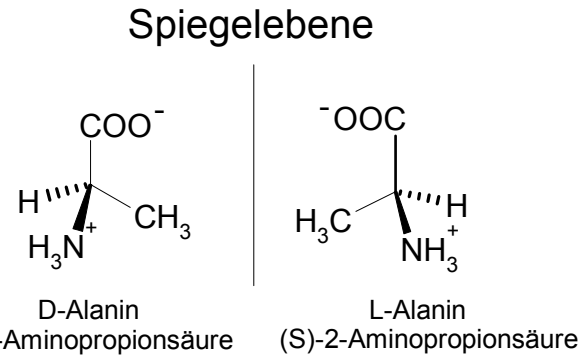
Bei der D/L-Nomenklatur wird die zweidimensionale Projektionsformel angewendet (eingeführt von Emil Fischer). Anhand des Glycerinaldehyds (vgl. Abbildung 1-4) werden die Bezeichnungen weiterer Verbindungen abgeleitet (VOLLHARDT und SCHORE 2000).



L-Glycerinaldehyd D-Glycerinaldehyd

Abb. 1-4 Zweidimensionale Projektion von L- und D-Glycerinaldehyd nach Fischer

Die *R,S*-Nomenklatur basiert auf einem System, bei dem die Priorität der Substituenten eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms anhand ihrer Ordnungszahl bestimmt wird. Der rangniedrigste Ligand wird vom Betrachter aus nach hinten gelegt. Die übrigen Liganden ergeben dann eine Abfolge entweder gegen den Uhrzeigersinn, hierbei handelt es sich um die *S*-Konfiguration, oder im Uhrzeigersinn, die sogenannte *R*-Konfiguration (MORTIMER und MÜLLER 2007). Abbildung 1-5 zeigt die *R,S*-Nomenklatur am Beispiel der AS Ala.



D-Alanin
(R)-2-Aminopropionsäure

L-Alanin
(S)-2-Aminopropionsäure

Abb. 1-5 Strukturen von D-Alanin und L-Alanin (2-Aminopropionsäure)

1.2 *Die Maillard-Reaktion*

Die Reaktion von reduzierenden Zuckern mit freien Aminogruppen von AS, Peptiden, Proteinen und Aminen wird als Maillard-Reaktion oder „nichtenzymatische“ Bräunung bezeichnet. Reduzierende Zucker wie Glucose, Fructose, Maltose und Lactose sowie AS mit primärer Aminogruppe sind die bei dieser Reaktion bevorzugten Reaktionspartner (BELITZ et al. 2008).

In Lebensmitteln laufen diese Reaktionen überwiegend bei Erhitzungsprozessen wie Kochen, Backen und Konservieren, aber auch bei längeren Lagerungszeiten ab und wirken sich auf Geruch, Geschmack und Erscheinungsbild der Lebensmittel aus. Bei dieser Reaktion entstehen neben braun gefärbten Pigmenten, den sogenannten Melanoidinen, eine Vielzahl flüchtiger Verbindungen (z. B. Aromastoffe), Geschmacksstoffe (besonders Bitterstoffe), sowie Verbindungen mit reduzierenden Eigenschaften (Reduktone). Zudem können diese Reaktionen auch zu Nährwertminderungen durch den Abbau essentieller AS, zur Bildung toxischer Verbindungen (beispielsweise Nitrosaminen oder Acrylamid), zur Bildung von Fehlaromen (Off-Flavours) oder auch zu Quervernetzungen von Proteinen führen (LEDL 1988; ANGRICK UND REWICKI 1980; HURELL 1982; BALTES 1993; YAYLAYAN 2003; BELITZ et al. 2008; GÖKMEN und PALAZOĞLU 2008).
Auch bei physiologischen Temperaturen kann die Maillard-Reaktion *in vivo* ablaufen (vgl. Kapitel 1.4) und führt beispielsweise mit zunehmenden Alter zu einer gesteigerten Akkumulation von glykierten Proteinen (VAN BOEKEL 1991).

Vereinfacht läuft die Maillard-Reaktion in drei Phasen ab. In der Anfangsphase reagieren die nucleophilen AS oder Peptide mit den Carbonylgruppen der vorhandenen reduzierenden Kohlenhydrate (z. B. mit der Aldose Glucose) unter Bildung von Iminen (Schiff´sche Basen). Über die Bildung von 1,2-Enaminolen werden die Imine (vgl. Abbildung 1-6) zu Amino-Ketosen (z. B. Amadori-Verbindungen) umgelagert (LEDL und SCHLEICHER 1990; BELITZ et al. 2008).

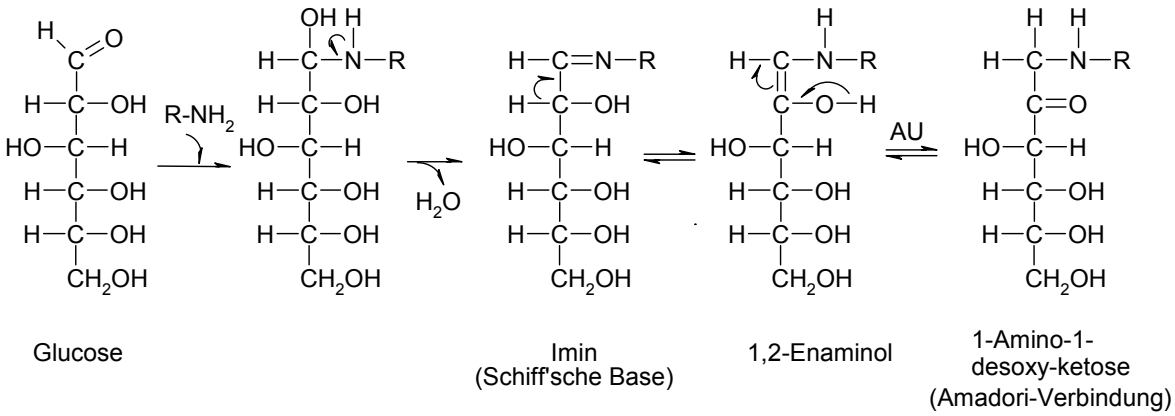


Abb. 1-6 Bildung des Glycosylamins mit Glucose und anschließende Amadori-Umlagerung; (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 276)

Die gebildeten Imine sind aufgrund von Mutarotationen sehr instabil und die gebundenen AS können wieder freigesetzt werden oder sie unterliegen raschen Umlagerungen zu Amadori-Verbindungen. Diese werden zu Furanosen überführt (vgl. Abbildung 1-7), die gegenüber Mutarotationen relativ stabil sind (BELITZ et al. 2008).

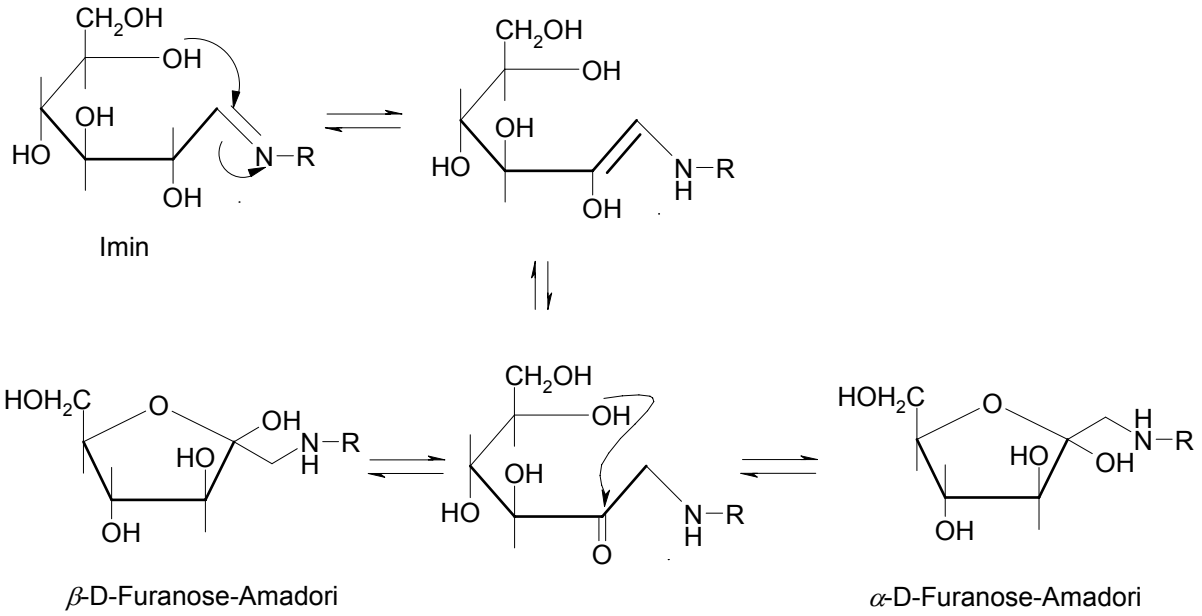


Abb. 1-7 Amadori-Umwandlung des relativ instabilen Imins zur Furanose (Halbacetal); (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 276)

Aus der Reaktion von Fructose (Ketose) (vgl. Abbildung 1-8) entsteht die sogenannte Heyns-Verbindung. Die Addition des H-Atoms an das intermediäre Aminoenol kann bei dieser Reaktion von zwei Seiten erfolgen und es entsteht jeweils ein Enantiomerenpaar. Die Heyns-Verbindungen können durch Transformation in Amadori-Verbindungen umgewandelt werden (LEDL und SCHLEICHER 1990; BELITZ et al. 2008).

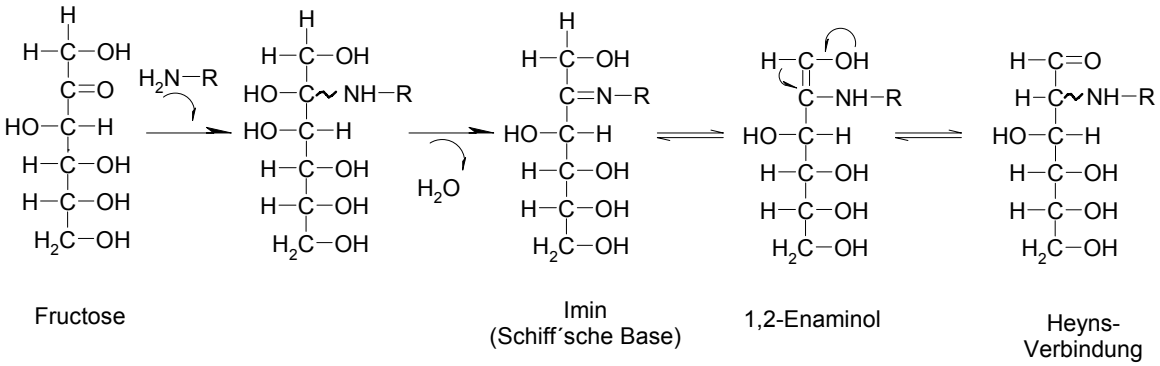


Abb. 1-8 Bildung des Glycosylamins mit Fructose und anschließende Heyns-Umlagerung; (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 276)

Die Weiterreaktion der Amadori-Produkte zu Desoxydicarbonylverbindungen, den sogenannten Desoxyosonen (reaktive *α*-Carbonylverbindungen), stellt die Zwischenphase der Maillard-Reaktion dar.

Die Amadori-Verbindungen werden durch Enolisierung in 2,3-Endiole (bevorzugt bei neutralen oder schwach basischen Bedingungen) sowie in 1,2-Enaminole (bevorzugt im schwach sauren Milieu) überführt (vgl. Abbildung 1-9) und reagieren anschließend weiter zu den Desoxyosonen (LEDL und SCHLEICHER 1990; MARTINS et al. 2001; BELITZ et al. 2008).

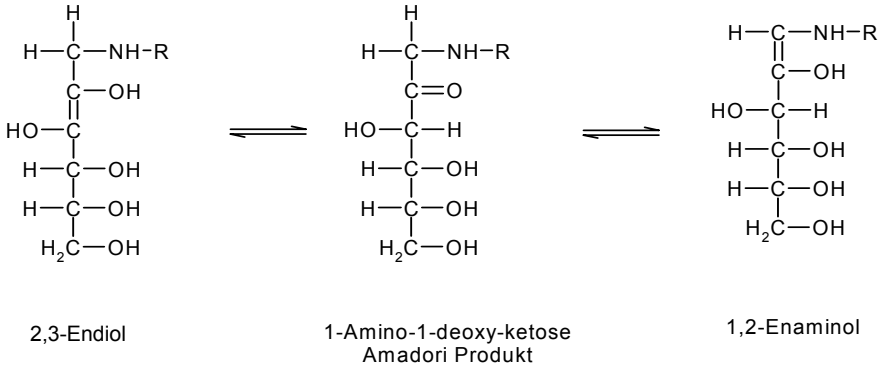


Abb. 1-9 Überführung der Amadori-Verbindung in 2,3-Endiol und 1,2-Enaminol; (modifiziert nach BELITZ et al. 2008: 277)

Beispiele sind die durch Wassereliminierung und Hydrolyse entstehenden 3-Desoxyosone (3-Desoxy-1,2-diulose), die Entstehung der sogenannten 1-Desoxyosone (1-Desoxy-2,3-diulose) durch Eliminierung der AS (*Retro-Michael-Reaktion*) oder die 4-Desoxysone (4-Desoxy-2,3-diulose) durch Wassereliminierung am 2,3-Endiol (vgl. Abbildung 1-10). Die AS bleibt bei diesen Verbindungen im Molekül gebunden. Bei der Entstehung der 1- und 3-Desoxyosone werden die Amino-Verbindungen abgespalten (LEDL und SCHLEICHER 1990; BELITZ et al. 2008).

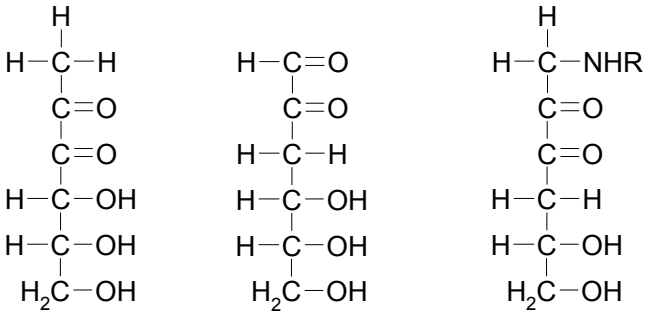


Abb. 1-10 Struktur der 1-, 3- und 4-Desoxyosone

In der Endphase der Maillard-Reaktion werden die gebildeten Desoxyosone in verschiedenen Reaktionen (z. B. Enolisierung, Wasserabspaltung, Retroaldolreaktionen sowie Cyclisierungen) zu zahlreichen Folgeprodukten bis hin zu den rotbraunen bis schwarzbraunen Melanoidinen abgebaut (BALTES 2007; BELITZ et al. 2008). Melanoidine sind hochmolekulare Verbindungen, die vor allem die Farbe gebackener, gebratener oder gerösteter Lebensmittel beeinflussen bzw. bedingen (ANGRICK und REWICKI 1980).

Aus den 1-Desoxyosonen können durch Spaltung Reduktone (fungieren als Antioxidanz), Diketone, Furanone oder auch Furane entstehen. Die bekanntesten Verbindungen sind z. B. Norfuraneol und Acetylformoin sowie das „aromaintensive“ Maltol. Durch Abspaltung von zwei weiteren Wassermolekülen vom 3-Desoxyoson entstehen beispielsweise das aus Hexosen gebildete Hydroxymethylfurfural (HMF) sowie das aus Pentosen entstehende Furfural. Des Weiteren entstehen aus den 4-Desoxyosonen bevorzugt das 2-Hydroxyacetylfuran sowie das Furosin (REYNOLDS 1965; LEDL und SCHLEICHER 1990; BALTES 2007; BELITZ et al. 2008).

Weitere Folgeprodukte der Maillard-Reaktion sind die aus Redoxreaktionen hervorgehenden Enol- und Triketoverbindungen wie z. B. das 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon oder die Bildung der Aromastoffe 2-Acetyl-1-pyrrolin und 2-Acetyltetrahydropyridin sowie Produkte des Strecker-Abbaus. Diese Reaktion führt unter oxidativer Decarboxylierung der *α*-AS zur Bildung von Aldehyden, z. B. Methional und Phenylacetaldehyd sowie zur Bildung von CO_2 und *α*-Aminoketosen,

die weiter zu Pyrazinen kondensieren (ANGRICK und REWICKI 1980; BALTES 2007, BELITZ et al. 2008). Durch Spaltung der Kohlenstoffkette des Zuckers der Amadori-Verbindungen, Heyns-Verbindungen oder der Desoxyosone kann der als Retroaldol-Reaktion bezeichnete Abbau zu Glycerinaldehyden, Glyoxal, Methylglyoxal oder zu Hydroxyacetonderivaten führen (YAYLAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994).

Abbildung 1-11 zeigt die wichtigsten Zwischen- und Endprodukte der Maillard-Reaktion.

Die Faktoren Temperatur, pH-Wert, Pufferart und -konzentration, Zuckerart, Vorhandensein von Metallionen, die Wasseraktivität sowie die Konzentration der Reaktanden beeinflussen direkt die Geschwindigkeit der Maillard-Reaktion (BELL 1997; VAN BOEKEL 2001; KWAK und LIM 2004; RAMONAITYTÉ et al. 2009). Beispielsweise steigt die Intensität der Maillard-Reaktion mit steigender Temperatur. Des Weiteren läuft die Maillard-Reaktion in sauren Lösungen langsamer ab als im basischen Milieu (HURREL 1982; WESTPHAL et al. 1988a; WESTPHAL et al. 1988b; AJANDOUZ und PUIGSERVER 1999).

Während der Bildung der Amadori-Verbindungen wird Wasser freigesetzt und beeinflusst das Gleichgewicht der Reaktion. Je mehr Wasser gebildet bzw. schon im System vorhanden ist, umso langsamer werden die Amadori-Verbindungen gebildet. Zum anderen benötigt die Reaktion Wasser als Lösungsmittel, um die Mobilität der beiden Reaktanden AS und Zucker in der Anfangsphase zu gewährleisten. Dies zeigt, dass ein bestimmter (geringer) Wassergehalt zum optimalen Ablauf der Maillard-Reaktion wichtig ist (VAN BOEKEL 2001).

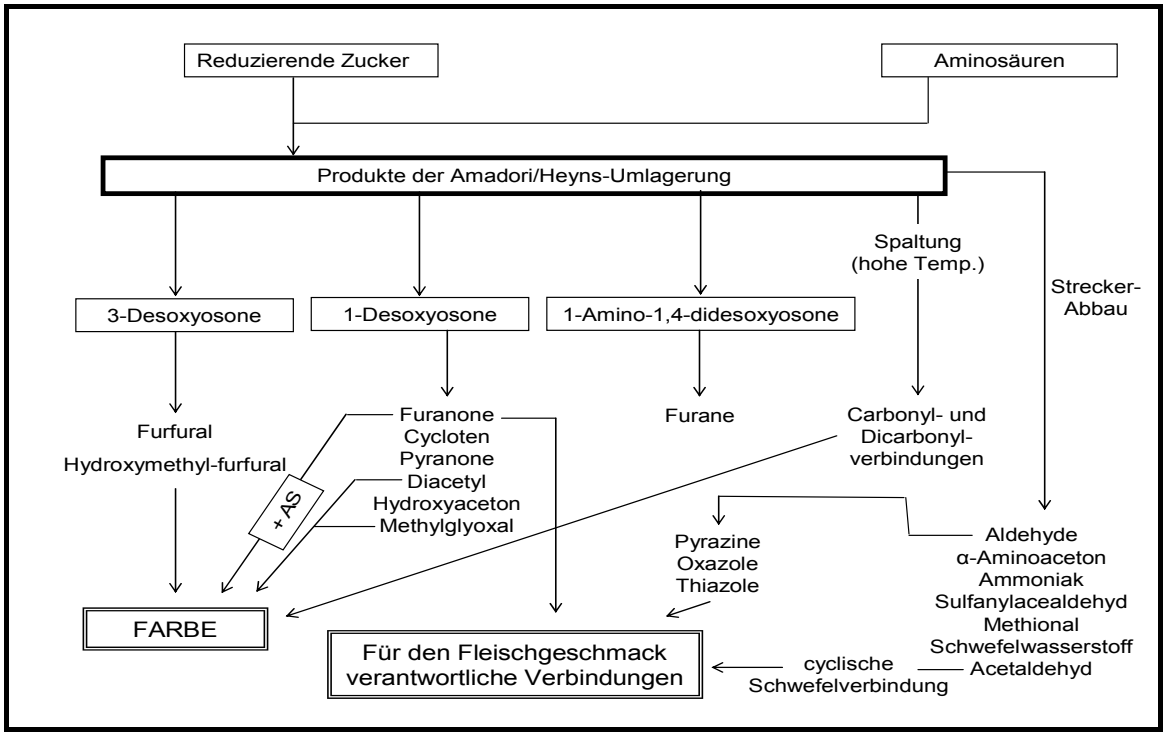


Abb. 1-11 **Wege zu den für den Geschmack und Farbe wichtigsten Zwischen- und Endprodukte der Maillard-Reaktion; (modifiziert nach THIS 2002)**

1.3 *D-Aminosäuren*

D-AS kommen sowohl im Pflanzenreich als auch im Tierreich vor. In der Lebensmittelindustrie bzw. in der Lebensmittelkontrolle können sie beispielsweise als Marker von Alterungsprozessen, zur Authentizitäts- und Qualitätsprüfung sowie als Marker von Hitzeeinwirkungen (FRIEDMAN 1999; ERBE und BRÜCKNER 2000a; VOSS und GALENSA 2000; SIMÓ et al. 2004; SIMÓ et al. 2005; MARCHELLI et al. 2007) verwendet werden. Auch ein Nachweis verschiedener Mikroorganismen bei Fermentationsprozessen ist möglich (MARCHELLI et al. 2007). Beispielsweise nimmt das Dipeptid D-Ala-D-Ala als C-terminale Sequenz eines Glycopeptids beim Zellwandaufbau grampositiver Bakterien eine wichtige Schlüsselrolle ein und KLEINKAUF (1980) zeigte wiederum, dass einige Prokaryonten Peptidantibiotika synthetisieren, die D-AS (z. B. D-Phe) enthalten.

Mikrobielle Peptide können durch den Verzehr von D-AS-haltigen, bakteriell fermentierten Lebensmitteln in den menschlichen Körper gelangen. Ein Großteil der so aufgenommenen D-AS wird über den Urin unverändert ausgeschieden und nur ein sehr geringer Teil wird im Körper verwertet (ZAGON et al. 1994). Sowohl D-AS-haltige Di- und Tri-Peptide als auch freie D-AS werden teilweise durch verschiedene Transporter aktiv resorbiert. Die Metabolisierung erfolgt über die Enzyme D-AS-Oxidase und D-Asp-Oxidase. Diese wandeln die D-AS über eine oxidative Desaminierung in *α*-Ketosäuren um, die wiederum im Citratcyclus verstoffwechselt werden. Auch eine Transaminierung zu L-AS ist möglich (MAN und BADA 1987; IMAI et al. 1996). Postulierte toxische Effekte konnten bisher nicht bestätigt werden.

1.3.1 Entstehungsmechanismen

Bei der Racemisierung, Isomerisierung bzw. Enantiomerisierung werden AS unter bestimmten chemisch-physikalischen oder biochemischen (z. B. durch Enzyme) Einflüssen in ihre Antipoden umgewandelt. Die Racemisierungsmechanismen werden unterteilt in enzymatische, chemisch-physikalische sowie Racemisierungen im Zuge der Maillard-Reaktion. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Racemisierung von freien AS.

Der Grad der Racemisierung wird durch die Parameter pH-Wert, Temperatur, Zeit, Druck, a_w-Wert, Ionenstärke und Anwesenheit von Katalysatoren (z. B. Metallionen) beeinflusst. Auch die Eigenschaft der Seitenkette (sterische Effekte) sowie die Eigenschaft der benachbarten AS (Elektronegativität) im Peptidverband wirken sich besonders auf die Ausprägung der Racemisierung einzelner AS im Verband aus (BADA 1982; FRIEDMAN 1999).

Auch im menschlichen Organismus lassen sich bedingt durch „Inkubationen“ von Proteinen mit hoher Halbwertszeit, d.h. geringer Turn-Over-Rate, D-AS nachweisen. Diese Inkubation hat eine Konfigurationsänderung peptidgebundener AS, insbesondere bei Aspartyl- und Asparaginylresten in verschiedenen Proteinstrukturen, vor allem bei Proteinen des Zahndentins und des Zahnschmelzes und der peptidgebundenen AS des Linsenkörpers (IMAI et al. 1996; FRIEDMAN

1999) zur Folge. Des Weiteren wurden Konfigurationsänderungen der Proteinstrukturen in der weißen Hirnmasse von Alzheimer-Patienten (SHAPIRA et al. 1988) nachgewiesen.

Als Ursache für die Zunahme der D-AS-Gehalte in Proteinen mit zunehmender Alterung werden fehlende zelluläre Reparaturmechanismen des menschlichen Organismus angenommen (MAN und BADA 1987). Die Hauptquelle für D-AS im menschlichen Organismus ist jedoch die Nahrungsaufnahme (vgl. Kapitel 1.3.2) (IMAI et al. 1996).

1.3.1.1 Enzymatisch induzierte Racemisierung

Mikroorganismen besitzen Enzyme, sogenannte Racemasen bzw. Epimerasen, zur Umwandlung der L- in die entsprechenden D-Konfigurationen (FRIEDMAN 1999). Es wird zwischen Cofaktor-abhängigen, beispielsweise der D-Ala-Racemase aus *Streptococcus faecalis* (SCHELLENBERGER 1989; EBBERS et al. 1997), und Cofaktor-unabhängigen Racemasen, z. B. die Pro-Racemase aus *Clostridium stricklandii* (FISHER et al. 1986a; FISHER et al. 1986b; FISHER et al. 1986c), unterschieden.

Die Racemasen der AS Ala, Arg, Thr und Ser benötigen Pyridoxalphosphat (PLP) als Cofaktor. Unter Transaldiminierung auf der aktiven Seite des Enzyms kommt es zu einem Elektronenmangel, der durch Abspaltung eines Protons am *α*-C-Atom zu einem delokalisierten Elektronenpaar führt. Die anschließende Reprotonierung des *α*-C-Atoms kann beidseitig erfolgen und bedingt die Bildung von D- und L-AS. Die AS wird anschließend hydrolytisch freigesetzt (EBBERS et al. 1997). Abbildung 1-12 zeigt den genauen Mechanismus mit Pyridoxalphosphat als Cofaktor.

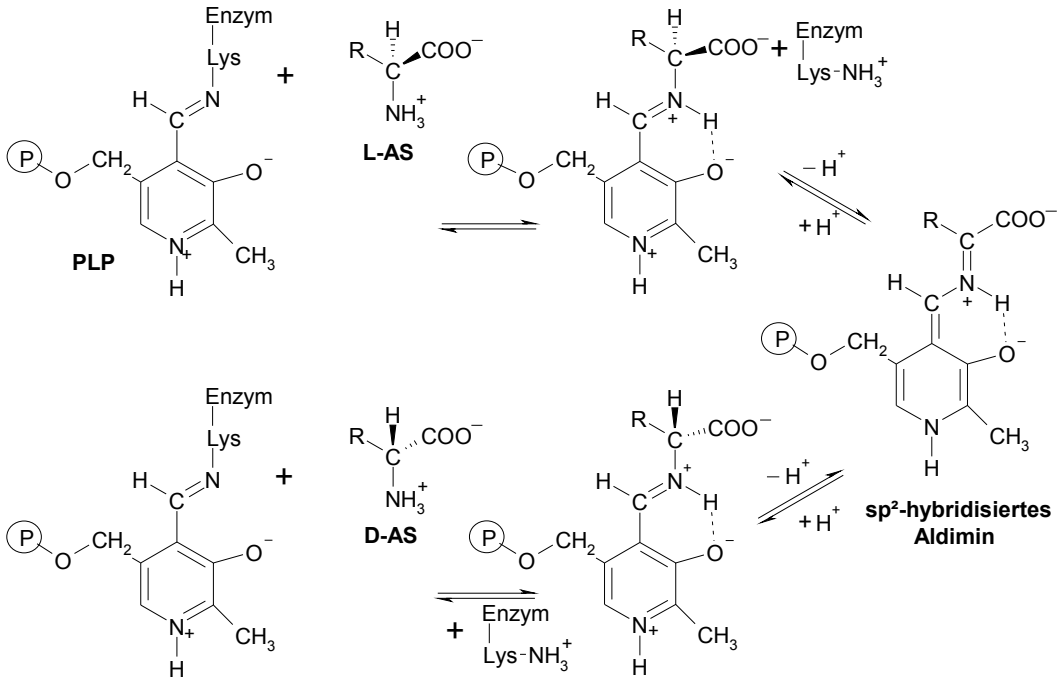


Abb. 1-12 Enzym-katalysierte AS-Racemisierung mit PLP als Cofaktor; R: AS-Seitenkette; (modifiziert nach EBBERS et al. 1997)

Ein weiteres Beispiel ist die Cofaktor-unabhängige Pro-Racemase. Hierbei handelt es sich um ein dimeres Enzym, das über jeweils eine Substratbindungsstelle pro Untereinheit verfügt. Zwei Thiolgruppen bilden das katalytische Zentrum, wobei die Protonierung der jeweiligen Thiolgruppe die aktive Form definiert. Unter Abstraktion des Substratprotons am *α*-C-Atom bindet eine Form des Enzyms spezifisch L-Pro und die andere D-Pro. Die Reprotonierung des Substrats findet entweder über eine konzertierte Aktion oder über ein Carbanion-Intermediat statt. Des Weiteren gibt es noch eine Vielzahl weiterer Racemasen, beispielsweise die Glu-Racemase aus, deren Substratspezifität unterschiedlich ist (FISHER et al. 1986a; GALLO et al. 1993; EBBERS et al. 1997).

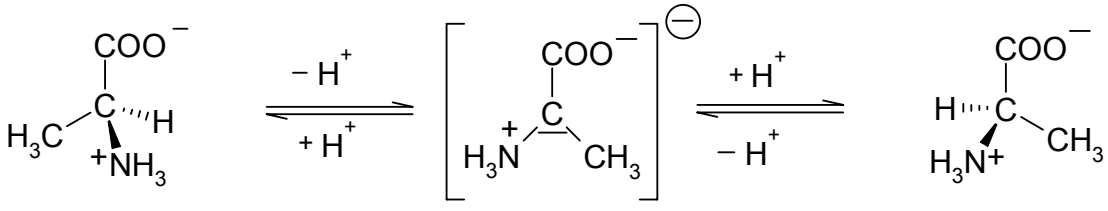
1.3.1.2 Chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung

Nichtenzymatisch ablaufende Racemisierungen können als Gleichgewichtsreaktionen Pseudo-1.-Ordnung beschrieben werden (LIARDON und HURREL 1983). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur Konzentration der Reaktanden.

Bei der chemisch-physikalisch induzierten Racemisierung ist der pH-Wert der wichtigste Einflussfaktor. So führen extreme Säure- oder Laugenbehandlungen von Proteinen zu verstärkten Racemisierungen der gebundenen AS (NEUBERGER 1948). Untersuchungen im Bereich von Proteinhydrolysaten (z. B. mit Säuren behandelte Würzsoßen) zeigten, dass die Proben signifikante Mengen an freien D-AS (PÄTZOLD et al. 2002) sowie teilweise geringe Mengen an peptidgebundenen D-AS enthielten (THEIS et al. 2004).

Auch im neutralen pH-Bereich konnten beispielsweise LÜPKE und BRÜCKNER (1998) durch eine Heißwasserbehandlung von Gelatine mit steigender Temperatur (55-95 °C) Konfigurationsänderungen von Asparaginyl- und Aspartylresten im Proteinverband beobachten.

BADA (1972; 1982) erklärten die Racemisierungen im sauren und basischen Medium über einen Carbanionenmechanismus, bei dem es zur Ausbildung eines sp^2-hybridisierten planaren Übergangszustandes kommt, an diesen wiederum ein Proton von beiden Seiten angelagert werden kann und somit eine Racemisierung bedingt.
Abbildung 1-13 zeigt dies am Beispiel der AS Alanin.



planares

L-Alanin Carbanion D-Alanin

Abb. 1-13 Reaktionsmechanismus zur Bildung von D- und L-AS über ein intermediär gebildetes Carbanion am Beispiel der AS Alanin; (modifiziert nach BADA und SCHROEDER 1975)

FRANK et al. (1981) erklärten wiederum, dass der im stark sauren Bereich vorhandene Protonenüberschuss, einen protonenkatalysierten Enolisierungsmechanismus zur Folge haben könnte. Am *α*-C-Atom, dargestellt in Abbildung 1-14, kann durch De- und Reprotonierung eine Konfigurationsänderung stattfinden.

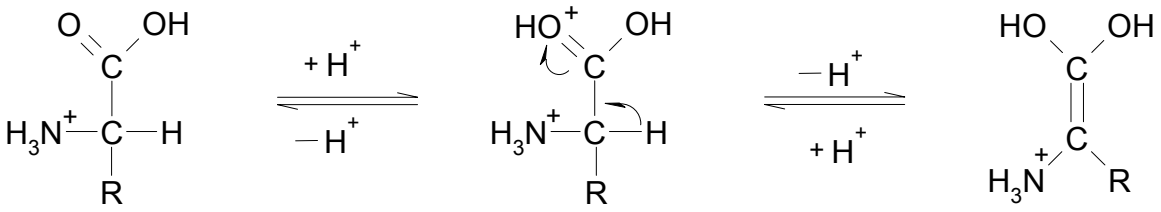
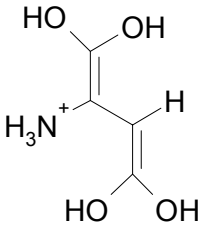


Abb. 1-14 Protonenkatalysierte Enolisierung von AS; * α-C-Atom; (modifiziert nach FRANK et al. 1981)

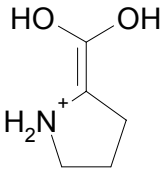
Die einzelnen AS besitzen bedingt durch ihre spezifischen Seitenketten sehr unterschiedliche Racemisierungsraten. So haben beispielsweise die AS Asp, Pro und Glu im stark sauren Bereich eine sehr hohe Racemisierungsanfälligkeit, während die AS Trp, Ile, Val, Ser und Thr eine geringere Tendenz zur Racemisierung zeigen (BADA 1972; FRANK et al. 1981). Die AS Ser racemisiert wiederum sehr schnell im neutralen und basischen Bereich (STEINBERG et al. 1984; FRIEDMAN und LIARDON 1985).

Zur Erklärung wird bei pH-Werten < 1,5 bei der AS Asp eine resonanzstabilisierte Dienolstruktur und bei der sekundären AS Pro eine durch Enolisierung bedingte stabilisierende exozyklische Doppelbindung als Ursache vermutet. Bei den AS Ser und Thr wird vermutlich durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe und dem Carboxylsauerstoff im sauren Bereich eine Enolisierung weitgehend blockiert und somit ein hoher Racemisierungsgrad verhindert (FRANK et al. 1981). Die AS Ile und Val racemisieren aufgrund sterischer Effekte langsamer. Bedingt durch ihre Seitenketten wird der sp^2-hybridisierte Überganszustand gehemmt (ERBE 1999).

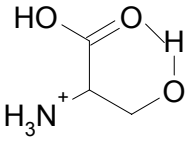
Abbildung 1-15 zeigt die konjugierte Dienolstruktur der AS Asp, die exozyklische Doppelbildung der AS Pro und die Wasserstoffbrückenbindung der AS Ser.



A: Dienolstruktur der AS Asp



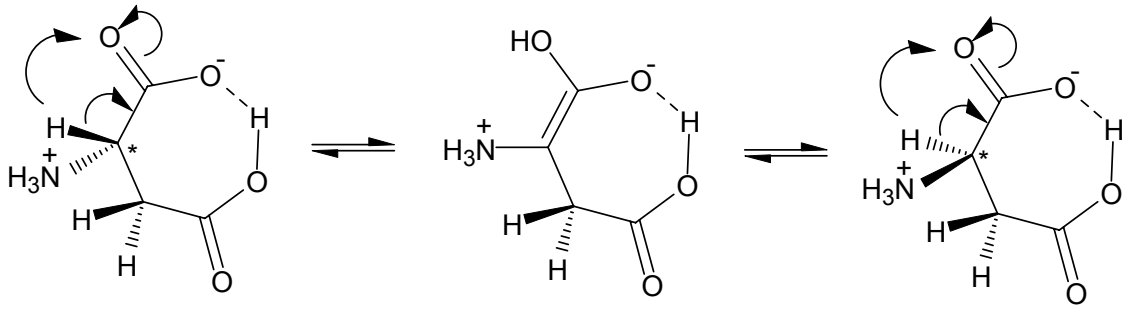
B: exozyklische Doppelbindung der AS Pro



C: Wasserstoffbrückenbindung der AS SER

Abb. 1-15 **Besonderheiten (A: konjugierte Dienolstruktur; B: exozyklische Doppelbildung; C: Wasserstoffbrückenbindung) der Seitenketten der AS Asp, Pro und Ser zur Erklärung der Racemisierungsanfälligkeiten im sauren pH-Bereich; (modifiziert nach FRANK et al. 1981)**

ERBE und BRÜCKNER (2000b) erklärten die in Modellversuchen mit Weinessig bei pH 2,5 detektierten Gehalte an D-Asp, D-Pro und D-Ser mit folgenden Mechanismen. So liegt Asp bei pH-Werten nahe des isoelektrischen Punktes (pH 2,77) mit einer deprotonierten *α*-Carboxylgruppe und einer protonierten *β*-Carboxylgruppe vor. Über eine Wasserstoffbrückenbindung kommt es zur Ausbildung eines stabilisierten 7-Rings (vgl. Abbildung 1-16). Mittels Keto-Enol-Tautomerie und dem elektronenziehenden Effekt der *β*-Carboxylgruppe ist eine Änderung der Konfiguration am *α*-C-Atom möglich. Bei der AS Ser ist dies über die mögliche Bildung eines 6-Rings, der durch eine Wasserstoffbrücke zwischen der bei pH 2,5 teilweise dissoziierten *α*-Carboxylgruppe und der *β*-Hydroxylgruppe stabilisiert wird, zu erklären.



L-Asp "Enol"-Zwischenprodukt D-Asp

Abb. 1-16 **Mechanismus zur Bildung von D-AS über einen planares Enol-Intermediat der AS Asp bei pH 2-3 ; *chirales α-C-Atom; (modifiziert nach ERBE und BRÜCKNER 2000b)**

Die niedrigen Racemisierungsraten von Pro erklärten sie damit, dass der von FRANK et al. (1981) vorgeschlagene Mechanismus über die Bildung einer exocyclischen Doppelbindung bei diesem pH-Wert nicht stattfindet (ERBE und BRÜCKNER 2000b).

1.3.1.3 Racemisierungen im Zuge der Maillard-Reaktion

In vielen Arbeiten in der Literatur (z. B. ERBE und BRÜCKNER 2000b; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2002; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2003; CASAL et al. 2005; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006b; CALIGIANI et al. 2007; KIM und LEE 2008; KIM und LEE 2009) konnte gezeigt werden, dass nach einer Erhitzung von Lebensmitteln, die erhebliche Mengen an freien AS und reduzierenden Zucker enthielten, relativ große Mengen an D-AS gebildet wurden.

Auch Modellversuche von ERBE und BRÜCKNER (2000b) mit AS, Glucose und Fructose in 5 %iger Essigsäure sowie Erhitzungsversuche mit L-AS-Standards bei 100 °C für 24-96 Stunden in Verbindung mit Glucose oder Fructose in wässrigen Lösungen bei verschiedenen pH-Werten (2,5 und 7) von BRÜCKNER et al. (2001, 2002) zeigten einen Zusammenhang zwischen der Maillard-Reaktion und der Bildung von D-AS. Des Weiteren konnten auch KIRSCHBAUM et al. (2000) und DELFS et al. (2002) eine durch reduzierende Zucker induzierte Racemisierung in ihren Versuchen nachweisen. In Versuchen von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2002, 2006a) konnte der thermische Einfluss der zuckerinduzierten Racemisierung durch Versuche mit verschiedenen Honigen und Pflanzensirupe gezeigt werden. Mit zunehmender Erwärmungszeit zeigte sich eine deutliche Zunahme der relativen D-AS Gehalte. Dies zeigten auch Versuche von CALIGIANI et al. (2007) beim Rösten von Kakaobohnen. Mit steigender Temperatur nahm auch hier der D-AS Gehalt signifikant zu (vgl. Abbildung 1-17).

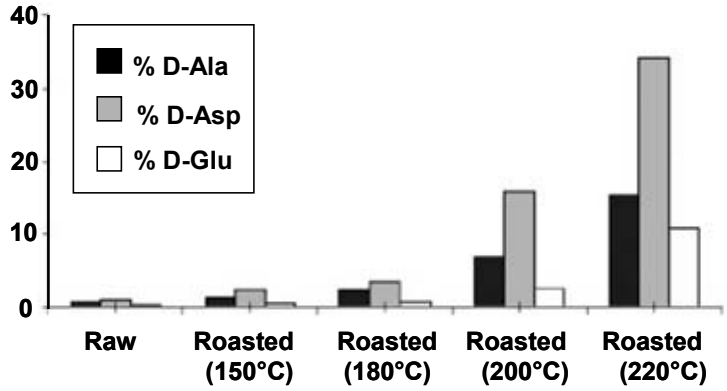


Abb. 1-17 Relativer D-AS-Gehalt (D%=(D/D+L)*100) bei verschiedenen Rösttemperaturen von Kakaobohnen; (modifiziert nach CALIGIANI et al. 2007)

Es wurde postuliert (BRÜCKNER et al. 2002; BRÜCKNER et al. 2003), dass sich die D-AS während der Reaktion von Glucose oder Fructose mit den L-AS über die instabilen Imine bilden (vgl. Abbildung 1-18 und Kapitel 1.2). Bei diesem Mechanismus reagiert der reduzierende Zucker, beispielsweise Glucose **[1]**, im ersten Schritt der Maillard-Reaktion reversibel mit der AS **[2, 2a]** unter Ausbildung einer labilen Schiff`schen Base **[3, 3a]**, die wiederum weiter zu einer Amadori-Verbindung **[5]** umgelagert werden kann. Zum einen ist eine Racemisierung durch Abstraktion eines Protons an der Schiff´schen Base unter der Bildung eines sp^2-hybridisierten Azomethin-Carbanion **[4]** möglich und zum anderen könnten aus den damit im Gleichgewicht stehenden Amadori-Verbindungen **[5]** in Nachfolgereaktionen racemisierte AS freigesetzt werden (BRÜCKNER et al. 2001). Bei diesem Weg wird angenommen, dass durch Bildung der 1,2-Enaminole bzw. 2,3-Endiole mit anschließender Protonenabstraktion am *α*-C-Atom und nachfolgende Reprotonierung des entstandenen sp^2-hybridisierten, planaren Zustandes (Carbanion), eine partielle Racemisierung der AS möglich ist. Durch Wassereliminierung und anschließende Hydrolyse des Imin-Kations wird die AS freigesetzt, wobei die 1- bzw. 3-Desoxyosone entstehen. Die freigesetzten AS können wieder an der Reaktion teilnehmen (BRÜCKNER et al. 2002).

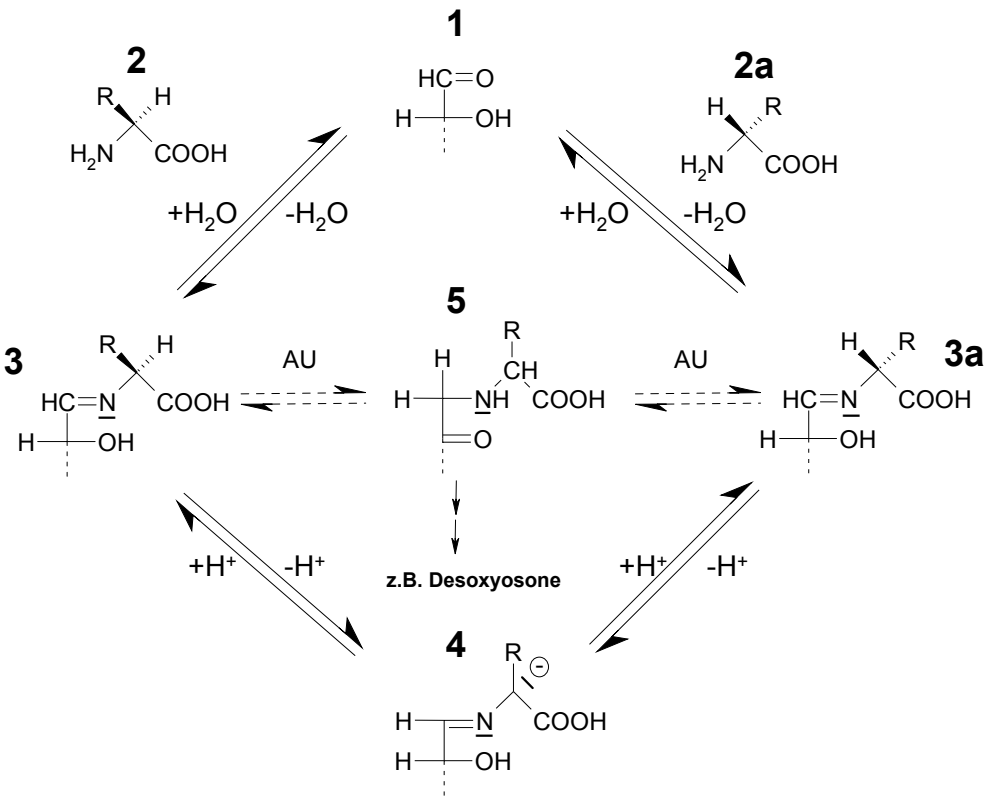


Abb. 1-18 **Racemisierungsmechanismus über die Bildung instabiler Imine (Schiff`sche Basen); Durch Reaktion einer Aldose [1] mit einer L-AS [2] oder einer D-AS [2a] kommt es zur reversiblen Bildung einer Schiff´schen Base [3] [3a]. Durch reversible Protonenabstraktion an der Schiff´schen Base entsteht ein Azomethin-Carbanion [4] welches sp^2-hybridisiert ist und somit eine Racemisierung der AS durch eine Reprotonierung ermöglicht. Zudem kann die Schiff´sche Base [3] [3a] in einer anschließenden Amadori-Umlagerung (AU) zur Amadori-Verbindung [5] umgebaut werden, welche durch Protonenabstraktion racemisieren kann; (modifiziert nach BRÜCKNER et al. 2002)**

Versuche von FRIEBERTSHÄUSER et al. (2004), PÄTZOLD und BRÜCKNER (2005a, 2005b, 2006b) und MAYER et al. (2006) mit synthetisierten Amadori-Verbindungen zeigten, dass erst nach der Erhitzung der Amadori-Verbindungen signifikante Mengen an D-AS detektiert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die Bildung von D-AS im Zuge der Maillard-Reaktion erst nach der Bildung der Amadori-Verbindungen stattfinden muss. Würde eine Racemisierung auf der Stufe der Schiff´schen Base ablaufen (vgl. BRÜCKNER et al. 2002 und Abbildung 1-18), so müssten die synthetisierten Verbindungen bereits erhebliche Mengen an D-AS aufweisen. Dies war bei den durchgeführten Versuchen nicht der Fall. Die in diesen

Versuchen gezeigten Ergebnisse richten den Blick auf den vorgeschlagenen Mechanismus zur Bildung von D-AS im Zuge der Enolisierung bzw. der Bildung der Desoxyosone, den Folgeprodukten der glykosilierten Verbindungen (Amadori- und Heyns-Verbindungen).

Aufgrund dieser Ergebnisse formulierten PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) einen Racemisierungsmechanismus über die Bildung eines Carbanions, begünstigt durch die Enolisierung der bei der Maillard-Reaktion entstehenden Amadori-Verbindungen (vgl. Abbildung 1-19).
Bei diesem Racemisierungsmechanismus sind sowohl die Aldehydgruppe am C1-Atom, als auch die Hydroxylgruppen am C2- und C3-Atom des Zuckermoleküls beteiligt. Intramolekulare Wasserstoffbrücken entstehen bei der Bildung des 6-Rings und können dadurch die ablaufende Reaktion beeinflussen. Die gebildeten Enole fördern die Deprotonierung am *α*-C-Atom der gebundenen AS.
Im sauren Bereich verschiebt sich die Reaktion auf die Bildung der 1,2-Enaminole, die wiederum die Bildung der 3-Desoxyosone zur Folge haben. Im neutralen und basischen Milieu werden überwiegend die 2,3-Endiole gebildet, aus denen die 1-Desoxyosone oder die 4-Desoxyosone durch *β*-Eliminierungsmöglichkeiten hervorgehen können (YAYLAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994; MARTINS 2001).

Werden die AS in Folgereaktionen freigesetzt, so können sie erneut mit Zuckermolekülen unter Bildung von Amadori- oder Heyns-Verbindungen, die sich vermutlich analog verhalten, reagieren.

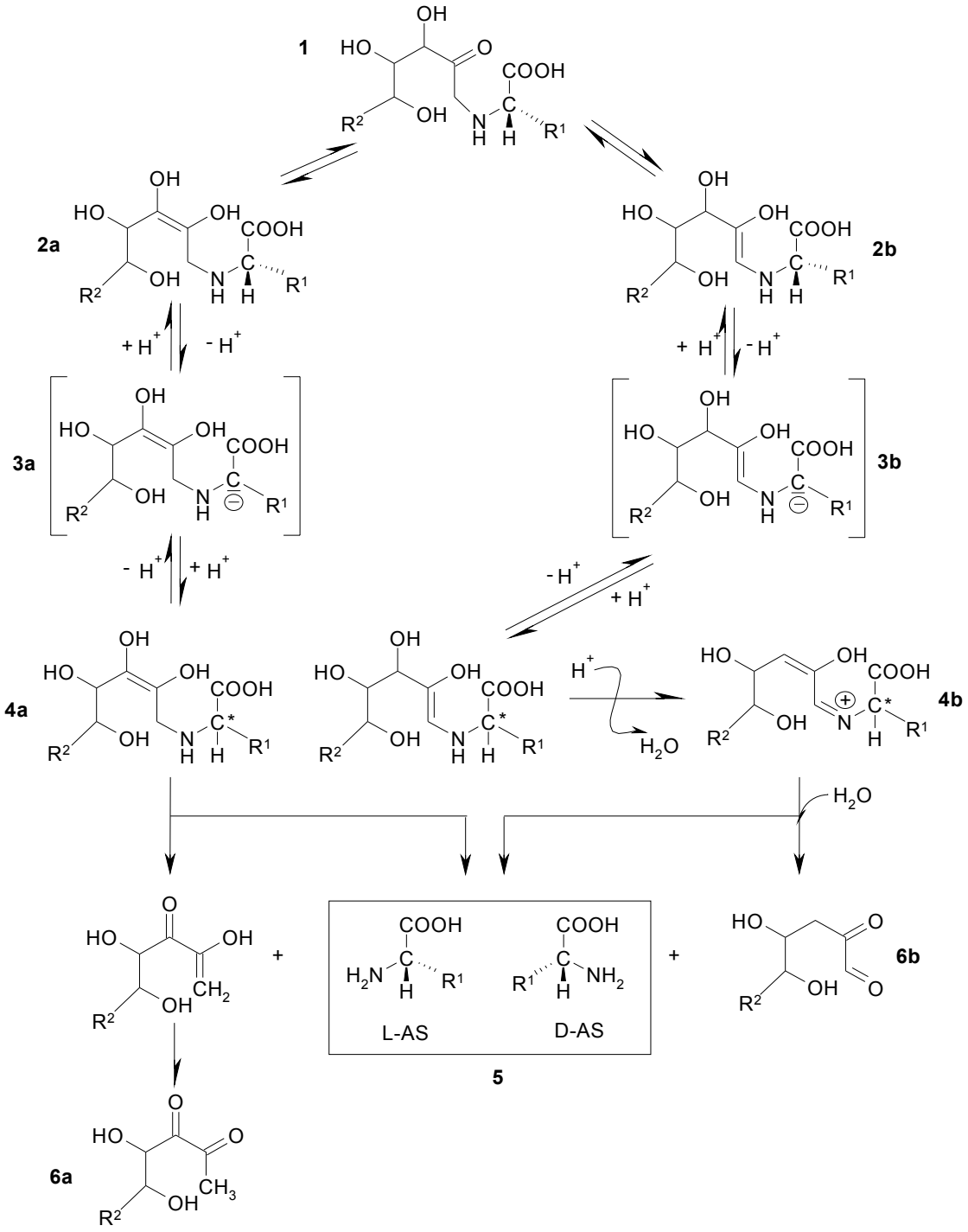


Abb. 1-19 **Mechanismus zur Bildung von D-AS aus Amadori-Verbindungen [1]. Aus [1] entstehen durch Enolisierung 2,3-Endiole [2a] bzw. 1,2-Enaminole [2b]. Durch Protonenabstraktion werden diese Verbindungen in intermediäre Carbanionen [3a] und [3b] überführt. Durch Reprotonierung bilden sich (partiell) racemisierte AS-Derivate [4a] und [4b]. Die Mischung aus D- und L-AS [5] wird anschließend unter Bildung von 1-Desoxyosonen [6a] und 3-Desoxyosonen [6b] freigesetzt; R^1: AS-Seitenketten; R^2: -CH_2OH-Zuckerrest; *: chirales α-C-Atom der AS; (modifiziert nach PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a)**

Durch die in diesem Kapitel aufgeführten Versuche bzw. Ergebnisse kann postuliert werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Detektion von D-AS und dem Vorkommen von Amadori-Verbindungen besteht und die Maillard-Reaktion dabei im Mittelpunkt steht oder zumindest eine wichtige Schlüsselrolle einnimmt. Tabelle 1-1 verstärkt dieses Postulat anhand von Analysen verschiedener Lebensmitteln, in denen sowohl D-AS als auch Amadori-Verbindungen detektiert wurden.

Tab. 1-1 Literaturübersicht über das Vorkommen von D-AS und Amadori-Verbindungen in verschiedenen Lebensmitteln

Nachweis von D-AS	Lebensmittel	Nachweis von Amadori-Verbindungen
ERBE und BRÜCKNER 2000a; VOSS und GALENSA 2000	Bier	WITTMANN UND EICHNER 1989
PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006b; CALLIGIANI et al. 2007	Kakao	HEINZLER und EICHNER 1991a, 1991b; OBERPARLEITER und ZIEGLEDER 1997
BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994, 2003; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005a; Pätzold und Brückner 2009	Früchte- und Gemüseprodukte z. B. getrocknete Tomaten, Tomatenmark, Zwiebeln, Rosinen, getrocknete Aprikosen etc.	MILLS et al. 1969; MOLNÁR-PERL et al. 1986; REUTTER und EICHNER 1989; SCHRÄDER und EICHNER 1996; SANZ et al. 2000; SANZ et al. 2001; CARDELLE-COBAS et al. 2005
VOSS und GALENSA 2000; SIMÓ et al. 2002; SIMÓ et al. 2004; SIMÓ et al. 2005	Orangensaft	DEL CASTILLO et al. 1999
PALLA et al. 1989; BRÜCKNER und HAUSCH 1989a, 1989b; BRÜCKNER und HAUSCH 1990a, 1990b; BRÜCKNER et al. 1992; MARCHELLI et al. 1997; MARCHELLI et al. 2007	Milch und Milchprodukte	VAN BOEKEL 1998; BAPTISTA und CARVALHO 2004
BRÜCKNER und HAUSCH 1989a, 1989b; BAEK 1999	Würzsoßen, fermentierte Soßen (z. B. Sojasoße)	HASHIBA 1978b
KULLMANN et al. 1999; ALI et al. 2006	Tabak und Tabakerzeugnisse	MILLS et al. 1969
ZAGON et al. 1994; VOSS und GALENSA 2000; ALI et al. 2010	Miso und Wein	HASHIBA 1978a

1.3.2 Vorkommen von D-AS in Lebensmitteln

D-AS liegen in freier und in proteingebundener Form vor und sind Bestandteile von Mikroorganismen, Invertebraten, Pflanzen und Wirbeltieren (FISHER 2007). Diese Arbeit konzentriert sich auf das Vorkommen von D-AS in Lebensmitteln. Durch verschiedene Verarbeitungsmethoden, beispielsweise Fermentieren, alkalische Behandlungen oder auch säurebedingte Hydrolysen, können AS racemisieren. Auch thermische Einflüsse können zur Bildung von D-AS führen (vgl. Kapitel 1.3.1). In den meisten unbehandelten Lebensmitteln sind nahezu keine bzw. nur relativ geringe Anteile der D-Enantiomere nachzuweisen (MAN und BADA 1987; BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994; FRIEDMANN 1999; BRÜCKNER und WESTHAUSER 2003).

PRESTON (1987) erklärte den Nachweis von D-AS in 18 verschiedenen wirbellosen Meerestieren über die Aufnahme von D-AS-haltigem Meerwasser. PALLA et al. (1989) sowie MARCHELLI et al. (2007) detektierten die D-AS von Ala, Asp und Glu in unbehandelter Milch. Das Vorkommen wurde durch die Kontamination der Milch von Mikroorganismen aus dem Pansen erklärt. Durch Autolyse der Bakterien, in deren Zellwand D-AS (D-Ala, D-Glu und D-Asp) als integraler Bestandteil des Peptidoglucans vorkommen, gelangen diese in die Milch (GANDOLFI et al. 1992; HOPKINS et al. 1997; CARLAVILLA et al. 2006). Des Weiteren wird die Bildung von D-AS durch bakterielle Racemasen und Epimerasen in Lebensmitteln induziert (BRÜCKNER et al. 1992; BRÜCKNER et al. 1993; GANDOLFI et al. 1994). Besonders in fermentierten Milchprodukten (beispielsweise in Joghurt oder gereiftem Käse) wurden erhebliche Mengen an D-AS nachgewiesen (BRÜCKNER und HAUSCH 1989a, b; BRÜCKNER und HAUSCH 1990a, b; BRÜCKNER et al. 1992; BRÜCKNER et al. 1993; MARCHELLI et al. 1997; MARCHELLI et al. 2007; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009). Zudem können D-AS Bestandteile von bakteriellen Produkten, beispielsweise von Peptidantibiotika, sein (FRIEDMANN 1999). Geringe Gehalte an D-AS konnten ebenfalls in unbehandelten Lebensmitteln detektiert werden. Beispielsweise wurden D-AS in rohem Rindfleisch (6,2 % D-Asp, 3,3 % D-Ala, 3,1 % D-Leu, 2,8 % D-Phe, 2,4 % D-Met und 1,6 % D-Val), in rohem Hähnchenfleisch (2,9 % D-Asp und 0,9 % D-Tyr) und in nicht erhitztem Schinken

(2,4 % D-Asp, 3,3 % D-Leu, 1,8 % D-Phe und 0,7 % D-Val) nachgewiesen (LIARDON und HURREL 1983; MAN und BADA 1987).
Auch in pflanzlichen Lebensmitteln konnten zahlreiche D-AS detektiert werden. Zum Beispiel wurden D-AS in verschiedenen Früchten und Gemüseproben (BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994; BRÜCKNER und WESTHAUSER 2003), in Tabakpflanzen (KULLMAN et al. 1999) und in fermentierten Tabakerzeugnissen (ALI et al. 2006), in grünen Kaffeebohnen (Arabica und Robusta) (CASAL et al. 2003), in gerösteten Kaffeebohnen (CASAL et al. 2005), in Kakaobohnen, Kakaopulver, Schokolade und in Kakaoschalen detektiert (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006b; CALLIGIANI et al. 2007; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009). Des Weiteren konnten in fermentiertem Sauerkrautsaft (BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994) und auch in verschiedenen Essigproben (ERBE und BRÜCKNER 1998; ERBE und BRÜCKNER 2000b; CARLAVILLA et al. 2006), bedingt durch die verwendeten Milchsäurebakterien bzw. Essigsäurebakterien, erhöhte relative Gehalte an D-AS im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen (z. B. frisch gepresster Kohlsaft) detektiert werden.
Weitere Quellen für D-AS in Lebensmitteln sind Brot, Laugengebäck und Tortillas (MAN und BADA 1987; FRIEDMANN 1999), verschiedene Biersorten (ERBE und BRÜCKNER 2000a; VOSS und GALENSA 2000), verschiedene Weine (ALI et al. 2010), aufkonzentrierte Fruchtsäfte und Sirupe (SIMÓ et al. 2002; SIMÓ et al. 2004; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005a; SIMÓ et al. 2005) und Trockenfrüchte, beispielsweise Rosinen (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009).
Viele dieser aufgeführten Lebensmittel wurden während ihrer Herstellung bzw. Verarbeitung erhitzt und bedingt durch ihre Inhaltsstoffe konnte die Maillard-Reaktion ablaufen.

Bienenhonig ist ein Beispiel für ein Lebensmittel, in dem die Maillard-Reaktion auch bei moderaten Temperaturen (Temperatur im Bienenstock liegt bei ca. 35 °C) abläuft. Honig ist reich an den reduzierenden Zuckern Glucose und Fructose und enthält zahlreiche AS. Die Wasseraktivität ist relativ gering (a_w*:* 0,75) und der pH-Wert ist schwach sauer bis neutral (DEIFEL 1989). PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) konnten D-AS in verschiedenen Honig- und Sirupproben detektierten. Die AS D-Ala (2,2- 6,2 %) wurde in jeder Probe detektiert (%D=D/(D+L)*100), während

einige AS wie D-Glx (5,9 %), D-Lys (5,4 %), D-Phe (3,0 %), D-Orn (2,1 %), D-Ser (1,5 %), D-Pro (0,1 %) und D-Val (0,4 %) nur teilweise in den einzelnen Proben nachzuweisen waren.

Die Tabellen A-1 und A-2 im Anhang zeigen eine Literaturübersicht über den Nachweis von D-AS in verschiedenen Lebensmitteln.

1.3.3 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Aminosäuren

Zur Analyse von AS werden neben enzymatischen Methoden auch die Gaschromatographie (GC), die Kapillarelektrophorose (CE), die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und u. a. die chirale micellare elektrokinetische Chromatographie mit Laser-induzierter Fluoreszenz-Detektion (MEKC-LIF) verwendet (IMAI et al. 1996; RUBIO-BARROSO et al. 2006).

Durch Einsatz des Enzyms D-AS-Oxidase können AS in *α*-Ketosäuren umgesetzt werden. Deren Bestimmung erfolgt durch Messung des Sauerstoffverbrauchs bzw. des freigesetzten Ammoniaks oder nach Umsetzung beispielsweise mit 3-Methyl-2-benzothiazolonhydrazon-hydrochlorid und anschließender photometrischer Bestimmung der Umsatzprodukte (IMAI et al. 1996).

Die chirale Trennung von Enantiomeren erfordert die Bildung eines „diastereomeren Komplexes“ zwischen der zu analysierenden Substanz und einer chiralen Substanz bzw. einer chiralen Phase, wobei die Trennung der Enantiomere aufgrund der unterschiedlichen Affinitäten zum chiralen Selektor erfolgt. Die chromatographischen Verfahren werden dabei in direkte und indirekte Methoden eingeteilt. Bei der direkten Trennung werden die Enantiomere an chiralen, stationären Phasen getrennt, und bei den indirekten Methoden erfolgt zunächst eine Derivatisierung mit chiralen Reagenzien und anschließender Analyse mittels achiralen, stationären Phasen (RICHTER 2003).

Zur gaschromatographischen Analyse müssen die AS zunächst in flüchtige Derivate (vgl. Kapitel 2.9.1.2) umgewandelt werden (CASAL et al. 2000). Zum Einsatz

kommen chirale stationäre Phasen, beispielsweise die temperaturstabile Mischphase Chirasil®-L-Val (L-Valin-tert.-Butylamid/Polysiloxan), die eine direkte Trennung der meisten D- und L-Enantiomerenpaare ermöglicht (FRANK et al. 1977). Des Weiteren werden auch durch Alkylierung und Acetylierung modifizierte Cyclodextrine (zyklische Zuckeroligomere) als chirale Phasen eingesetzt. Durch Bindung an ein Polysiloxangerüst kann die Temperaturstabilität dieser Phasen zudem deutlich erhöht werden (VETTER und SCHURIG 1997).
Detektiert werden die AS überwiegend mittels Massenspektrometer (MS) oder mittels Flammenionisationsdetektoren (FID) (CASAL et al. 2000). Die GC gewährleistet eine sehr gute Trennung vieler Enantiomerenpaare innerhalb kurzer Analysenzeiten. Nachteilig sind oftmals lange Probenvorbereitungen (CASAL et al. 2000) und die geringe thermische Belastbarkeit verschiedener GC-Säulen.

Auch bei der HPLC werden zum einen direkte chirale Phasen (z. B. Cyclodextrine, makrozyklische Antibiotika) zur Trennung eingesetzt (RUBIO-BARROSO et al. 2006; ILISZ et al. 2009) und zum anderen werden die AS mit chiralen Reagenzien (z. B. dem chiralen Thiol *NN*-Isobutyryl-L-cystein oder 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-alaninamid (Marfey´s Reagenz; FDAA)) derivatisiert und an konventionellen achiralen Umkehrphasen (RP: Reversed Phasen) getrennt. Durch die Umsetzung mit dem Derivatisierungsreagenz entstehen aus den Enantiomeren die entsprechenden Diastereomere. Um mittels UV-Licht oder Fluoreszenz detektieren zu können, werden die zu analysierenden Substanzen in Vor- oder Nachsäulenderivatisierungen umgesetzt (RICHTER 2003; BHUSHAN und BRÜCKNER 2004; DESAI und ARMSTRONG 2004; PAPPA-LOUISI et al. 2007). Eine der häufigsten Methoden stellt beispielsweise die Vor- oder Nachsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyde (OPA) dar (ERBE und BRÜCKNER 2000a; KELLERMANN 2006). Des Weiteren werden u. a. zur Vorsäulenderivatisierung die Reagenzien Phenylisothiocyanat (PITC), 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC), und 6-Aminoquinoyl-*N*-hydroxy-succinimidyl-carbamat (ACQ) und zur Nachsäulenderivatisierung die Reagenzien Ninhydrin und Fluorescamin eingesetzt (KELLERMANN 2006). Als Detektoren werden UV/VIS, Diodenarray oder Massenspektrometer verwendet. Die HPLC-Methoden zeichnen sich durch geringe Detektionszeiten, gute Detektionsempfindlichkeiten, kleine Probenmengen und

Automatisierbarkeit aus. Nachteilig ist oftmals die geringe Stabilität der umgesetzten Derivate und die Empfindlichkeit gegenüber Verunreinigungen (KELLERMANN 2006; SIRI et al. 2006).

Die Kapillarelektrophorese (Capillary electrophoresis) ermöglicht eine hohe Trennleistung und ein starkes Auflösungsvermögen. Die Enantiomere werden auch bei dieser Methode direkt oder indirekt, dementsprechend mit und ohne Derivatisierung analysiert (WATERVAL et al. 2000; WAN und BLOMBERG 2000; SIMÓ et al. 2005). Als Derivatisierungsreagenz kann z. B. FMOC verwendet werden (BONIGLIA et al. 2002). Die Detektion erfolgt mittels Massenspektrometrie.

Die chirale micellare elektrokinetische Chromatographie ist eine Weiterentwicklung der Kapillarelektrophorese, die durch Verwendung von derivatisierenden Reagenzien in Kombination mit der Laser-induzierten Fluoreszenz-Detektion die Detektionsempfindlichkeit gegenüber der einfachen Kapillarelektrophorese erhöht (WAN und BLOMBERG 2000). Einen weiteren Vorteil stellt der geringe Zeitaufwand dieser Methode dar. Beispielsweise entwickelten CARLAVILLA et al. (2006) eine effiziente MEKC-LIF Methode zur einfachen und schnellen Detektion von elf chiralen AS in Essig innerhalb von 20 min.

1.4 *Amadori-Verbindungen*

1.4.1 Entstehung und Bedeutung

In der initialen Phase der Maillard-Reaktion (vgl. Kapitel 1.2) entstehen sowohl Fructose-Aminosäuren (sogenannte Amadori-Verbindungen = *N*-substituierte 1-Amino-1-Desoxy-Ketosen), als auch Glucose-Aminosäuren (sogenannte Heyns-Verbindungen = *N*-substituierte 2-Amino-2-Desoxy-Aldosen). Diese glykosilierten, relativ polaren Zwischenprodukte entstehen durch Reaktion reduzierender Zucker, wie z. B. Glucose oder Fructose, mit Aminosäuren (vgl. Kapitel 1.2 und Abbildung 3-4) (HEYNS et al. 1967; EICHNER und CINER-DORUK 1979; KRAUSE et al. 2008). Die Bildung und der Abbau dieser Verbindungen erfolgen in Lebensmitteln

überwiegend während ihrer Verarbeitung und Lagerung (DAVIDEK et al. 2002). Dabei beeinflussen sie die Lebensmittel erheblich in Aroma, Geschmack und Farbe. Begünstigt wird die Bildung vor allem durch höhere Temperaturen (> 100 °C), eine geringe Wasseraktivität (a_w = 0,3 - 0,7) oder auch durch längere Lagerungszeiten von Lebensmitteln. Auch der pH-Wert, der Wassergehalt und die Konzentration der beiden Reaktionspartner (AS und Zucker) spielen bei der Bildung eine wichtige Rolle. Des Weiteren wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch die unterschiedlichen AS beeinflusst. So reagieren z. B. basische AS wie Lysin, Tryptophan und Histidin sehr schnell. Besonders die freie *ε*-Gruppe des Lysins begünstigt dabei die Reaktion (EICHNER und CINER-DORUK 1979; SCHRÄDER und EICHNER 1996).

Es wird angenommen, dass Amadori-Verbindungen im Gegensatz zu den Heyns-Verbindungen stabiler sind (vgl. Abbildung 1-7). Zudem wurde gezeigt, dass sich Heyns-Verbindungen langsamer bilden und im Vergleich zu den Amadori-Verbindungen „reversibler“ sind (BUNN und HIGGINS 1981; BRANDS und VAN BOEKEL 2001; FROLOV et al. 2006a; JAKAS et al. 2008; KRAUSE et al. 2008). Die Aldehydgruppe der Heyns-Verbindung reagiert aufgrund der größeren Elektrophilie schneller zu Folgeprodukten als beispielsweise die Ketogruppe der Amadori-Verbindung (SUÁREZ et al. 1989). Dies ist auch der Grund, warum im ersten Schritt der Maillard-Reaktion die höhere Elektrophilie der Aldehydgruppe der Aldose Glucose schneller mit den AS reagiert als die Ketogruppe der Fructose. Somit kann sich die Amadori-Verbindung durch Umlagerung der Imine (vgl. Abbildung 1-6) schneller bilden (LAROQUE et al. 2008).
Bezugnehmend auf diese Tatsachen konzentrieren sich die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche auf Amadori-Verbindungen. Trotzdem kann der beschriebene Racemisierungsmechanismus im Zuge der Maillard-Reaktion (vgl. Kapitel 1.3.1.3) auch auf Heyns-Verbindungen angewendet werden (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a).

Amadori-Verbindungen stellen die ersten stabilen, isolierbaren und analytisch detektierbaren Verbindungen der Maillard-Reaktion dar und können als sensitive Indikatoren zum Voranschreiten dieser Reaktion in Betracht gezogen werden (REUTTER und EICHNER 1989). So können sie als Qualitätsparameter zur

Beurteilung von verschiedenen Lebensmitteln dienen, beispielsweise zur Früherkennung von Qualitätsänderungen bei der Herstellung und Lagerung von Gemüsetrockenprodukten (CINER-DORUK und EICHNER 1979; SCHRÄDER und EICHNER 1996) oder bei der Beurteilung von für die Bierherstellung verwendetem Malz (WITTMANN und EICHNER (1989). Des Weiteren können sie gezielt zur Aromaentwicklung eingesetzt werden, beispielsweise bei der Kakaoproduktion (OBERPARLEITER und ZIEGLEDER 1997). Sie können aber auch als Schlüsselverbindung zur Bildung von Acrylamid gelten, wenn die AS Asn als Prekursor mit reduzierenden Zuckern reagiert (MOTRAM et al. 2002; STADLER et al. 2002).

Im weiteren Reaktionsverlauf (vgl. Kapitel 1.2) werden sie zu einer Vielzahl von Folgeprodukten (z. B. den Desoxyosonen) und in der terminalen Phase der Maillard-Reaktion zu den Melanoidinen (Bräunungsprodukte) abgebaut (REUTTER und EICHNER 1989).

Zudem wurden auch *in vivo* Glykosilierungen von Carbonylverbindungen mit AS, Aminen, Phospholipiden, Peptiden und Proteinen im Zuge der ablaufenden Maillard-Reaktion beobachtet (PORTERO-OTIN et al. 2003; SCHALKWIJK et al. 2004; LAPOLLA et al. 2005; RAHBAR 2005). Amadori-Verbindungen entstehen überwiegend im menschlichen Körper durch Reaktion mit NH_2-Gruppen an den Seitenketten der AS. Folglich sind die basischen AS Lysin und Arginin vermehrt betroffen.
Die glykosilierten Verbindungen durchlaufen eine Reihe überwiegend irreversibler chemischer Reaktionen, resultierend in der Bildung sogenannter „Advanced Glycation End Products“ (AGEs). Diese Verbindungen stehen in der Diskussion, sowohl toxisch und mutagen zu sein (LEE und CERAMI 1990; WAUTIER und GUILLAUSSEAU 2001; HENLE 2003), als auch als charakteristische Marker bei Diabetes mellitus zu fungieren (AHMED und THORNALLEY 2007; MONNIER et al. 2008; MIYAZAWA et al. 2008) sowie im Zusammenhang mit Arteriosklerose (BASTA et al. 2004; AHMED 2005) und Alterungsprozessen (VAN BOEKEL 1991; SUJI und SIVAKAMI 2004; MASLO 2006), verschiedenen Augenerkrankungen (STITT 2005; YAMAGISHI et al. 2005) und der Alzheimer-Krankheit (MÜNCH et al. 1997; SATO et

al. 2006) zu stehen. Beispielsweise ist bei Diabetikern infolge der hohen Glucose-Konzentration im Blut der Hämoglobinwert Hb A_{1C} um den Faktor zwei erhöht. Dieser gehört zu einer Gruppe von Glyko-Hämoglobinen, die durch Glykosilierung des Normal-Hämoglobins mit Hexosen entstehen (REINAUER und NIEDERAU 1984).
Aber auch die Desaminierung von Asparagin und Glutamin (PORTERO et al. 2003) sowie die Glykosilierung der *ε*-Amino-Gruppe von Lysin (JOHANSEN et al. 2006; JAKAS et al. 2008) im Zuge der Maillard-Reaktion sind von besonderem Interesse.

Insbesondere Proteine mit einem geringen Turnover unterliegen einer Glykosilierung. Betroffen sind beispielsweise Linsenproteine des Auges, Kollagen sowie die DNA (YAYALAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994), was folglich zu Struktur- (z. B. Protein-Quervernetzungen) und Funktionsänderungen führen kann (SCHLEICHER 1991).

1.4.2 Vorkommen von Amadori-Verbindungen in Lebensmitteln

Amadori-Verbindungen sind vor allem in Lebensmitteln zu finden, die sowohl einen hohen Anteil an reduzierenden Zuckern als auch einen hohen Anteil an freien AS aufweisen. Da ihre Entstehung besonders durch eine geringe Wasseraktivität und auch hohe Temperaturen begünstigt wird, konnten diese Substanzen vor allem in getrockneten (beim Darren, Konservieren usw.) oder erhitzten Lebensmitteln (beim Aufkonzentrieren, Maischen, Rösten, Backen usw.), als Folge der ablaufenden Maillard-Reaktion, nachgewiesen werden. Aber auch eine längere Lagerung von Lebensmitteln kann eine Bildung von Amadori-Verbindungen nach sich ziehen, da bekanntermaßen die Maillard-Reaktion auch bei geringen Temperaturen langsam ablaufen kann (vgl. Kapitel 1.2; ANGRICK und REWICKI 1980; LEDL und SCHLEICHER 1990).

So detektierten beispielsweise WITTMANN und EICHNER (1989) insgesamt elf Amadori-Verbindungen in verschiedenen Malzen und Bieren. Die dunklen Malzsorten zeigten dabei höhere Gehalte als die helleren Malzsorten. Beispielsweise wurde die Amadori-Verbindung Fru-Ala im dunklen Malz mit einem Gehalt von 18,1 mg/100 g bestimmt, während der Gehalt im hellen Malz bei nur 4,3 mg/100 g lag. Während des

gesamten Brauprozesses veränderten sich die Konzentrationen (Abnahme um ca. 50 %) der im Malz detektierten Amadori-Verbindungen (vgl. Tabelle 1-2) bis hin zum fertigen, gelagerten Bier.

Auch die Zusammensetzung bzw. das Muster der Amadori-Verbindungen änderte sich im Verlauf des Brauprozesses. So wurde die Verbindung Fru-Val während des Maisch- und Kochvorgangs stärker abgebaut als z. B. die Verbindungen Fru-Ala oder Fru-Leu.

Tab. 1-2 Veränderung der Gehalte an Amadori-Verbindungen während des Brauprozesses von Bier (Werte aus WITTMANN und EICHNER 1989)

	Malz (mg/100 g)	Maischen Läutern	**Würze** (mg/100 ml)	Würzekochen (100 °C)	**Ausschlag-würze** (mg/100 ml)	Gärung	**Jungbier** (mg/100 ml)	Lagerung	**Bier aus Lagertank** (mg/100 ml)
Fru-Gly	**1,5**		**0,23** (108 %)		**0,22** (92 %)		**0,25** (93 %)		**0,26** (96 %)
Fru-Ala	**5,5**		**0,80** (102 %)		**0,76** (86 %)		**0,78** (79 %)		**0,77** (78 %)
Fru-Val	**13,2**		**1,21** (64 %)		**0,93** (44 %)		**1,03** (43 %)		**1,03** (43 %)
Fru-Leu	**13,9**		**1,52** (77 %)		**1,27** (57 %)		**1,31** (52 %)		**1,40** (56 %)
Fru-Ile	**8,7**		**0,79** (64 %)		**0,69** (50 %)		**0,73** (47 %)		**0,59** (38 %)
Fru-Pro	**5,7**		**0,75** (93 %)		**0,48** (53 %)		**0,52** (51 %)		**0,53** (52 %)
Fru-Glu	**13,7**		**Sp.**		--		--		--
Fru-Ser	**6,6**		**0,58** (62 %)		**0,50** (47 %)		**0,51** (43 %)		**0,53** (45 %)
Fru-Thr	**5,4**		**0,50** (65 %)		**0,33** (38 %)		**0,37** (38 %)		**0,35** (36 %)
Fru-Gaba	**9,6**		**1,13** (83 %)		**0,80** (52 %)		**0,79** (46 %)		**0,75** (43 %)
Summe	**83,8**		**7,51** (63 %)		**5,98** (45 %)		**6,29** (42 %)		**6,29** (41 %)

Sp. Spuren; Prozentangaben beziehen sich auf die im Malz gefundenen Konzentrationen der einzelnen Verbindungen (=100 %). Der Berechnung des Prozentsatzes in den Würzen und Bieren wurden die vom Hersteller angegebenen Werte über die eingesetzten Malzmengen zugrunde gelegt

Auch in Gerste und Malz (MOLNÁR-PERL et al. 1986) sowie in Getreideprodukten (RAMÍREZ-JIMÉNEZ et al. (2001); RADA-MENDOZA et al. 2004) konnten Amadori-Verbindungen nachgewiesen werden. In Getreideprodukten wird beispielsweise der Furosin-Gehalt (2-Furoylmethyl-Lysin; vgl. Kapitel 1.4.4) zur Beurteilung der in Getreideprodukten limitierenden AS Lysin verwendet (RADA-MENDOZA et al. 2004).

HEINZLER und EICHNER (1991a, b) sowie OBERPARLEITER und ZIEGLEDER (1997) untersuchten die Bedeutung von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. Sie konnten feststellen, dass bereits die fermentierten Kakaobohnen gewisse Mengen verschiedener Amadori-Verbindungen enthielten (Gehalte zwischen 3,0 mg/100g fettfreie Kakaotrockenmasse (ffKTM) und 71,0 mg/100g ffKTM), die sich im weiteren Verlauf der Verarbeitung zuerst erhöhten und dann nach Überschreiten bestimmter Erhitzungszeiten wieder senkten (vgl. Abbildung 1-20). Dies ist mit einem Abbau bzw. einer Weiterreaktion der gebildeten Amadori-Verbindungen zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass die Herkunft der Kakaobohnen sowie die während der Verarbeitung angewendeten Prozessbedingungen die Konzentrationen der Amadori-Verbindungen erheblich beeinflussten. Beispielsweise erfolgte ein Abbau der Amadori-Verbindungen umso schneller, je höher die Trocknungs- oder Rösttemperaturen waren.

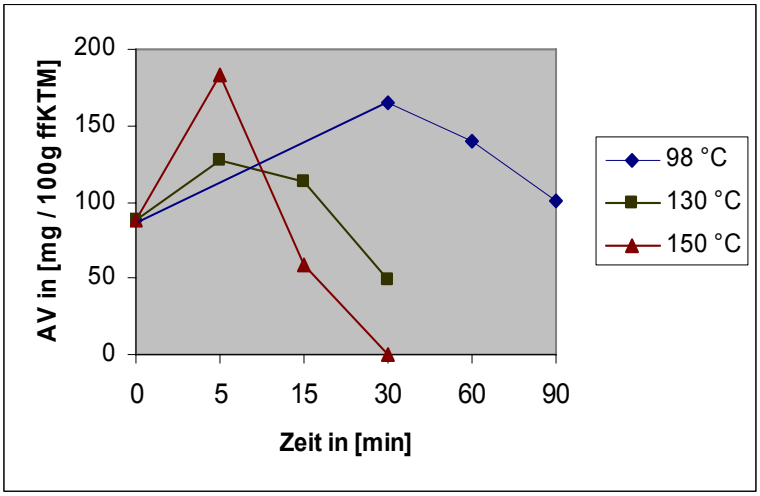


Abb. 1-20 **Veränderung der Gehalte an Amadori-Verbindungen während der Verarbeitung von Kakaobohnen bei unterschiedlichen Temperaturen (HEINZLER und EICHNER 1991a); ffKTM: fettfreie Kakaotrockenmasse**

Weitere Amadori-Verbindungen wurden in Trockenprodukten verschiedener Gemüsesorten und getrockneten Früchten nachgewiesen, beispielsweise von DAVIDEK et al. (2005) in getrockneten Tomaten und Aprikosen. REUTTER und EICHNER (1989) bestimmten insgesamt 16 Amadori-Verbindungen in verschiedenen Tomatenprodukten, Paprikaprodukten, Spargel, Lauch, Blumenkohl, Karotten und Sellerie. Besonders hohe Gehalte wurden in Tomatenprodukten mit Werten von

27,2 mg/100 g Trockenmasse (TM) für Fru-Val bis zu 3788 mg/100g TM für Fru-Glu detektiert.

Dies ist darauf zurückzuführen, dass es während der Verarbeitung der Tomaten zu einigen Temperaturbelastungen kommt. So werden diese bei Ihrer Verarbeitung beispielsweise mit Temperaturen von bis zu 100 °C behandelt. Untersuchungen an Tomatenmark und aus diesem mittels Walzentrocknung hergestellten Tomatenflocken zeigten, dass sich der Gehalt an AS und Glucose in den Tomatenflocken im Vergleich zum Tomatenmark stark verringert hatte. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil an Amadori-Verbindungen zu (SCHRÄDER und EICHNER 1996). So detektierten auch SANZ et al. (2000) höhere Gehalte an Amadori-Verbindungen in verarbeiteten Tomatenprodukten.

CARDELLE-COBAS et al. (2005) detektierten die 2-Furoylmethylderivate (vgl. Kapitel 1.4.4) der AS GABA, Lysin und Arginin in getrockneten Zwiebeln und Knoblauch, die ebenfalls hohe Mengen an freien AS und reduzierenden Zuckern vorweisen. SANZ et al. (2001) konnten verschiedene Fructose-Aminosäuren (Alanin, Prolin, GABA, Lysin und Arginin) in Rosinen, getrockneten Aprikosen, Datteln, Dörrpflaumen und Feigen, mit Gehalten zwischen 2,33 mg/100g und 75,80 mg/100g TM der bestimmten 2-Furoylmethyl-Aminosäuren, nachweisen. Bei diesen Analysen wurde gezeigt, dass die nachgewiesenen Fructose-Aminosäuren überwiegend während der Lagerung der Trockenfrüchte gebildet wurden.

DEL CASTILLO et al. (1999) zeigten mittels dehydriertem Orangensaft, dass sich die Bildung von Furoylmethylderivaten der AS Alanin, Asparagin, Prolin, GABA, Glutaminsäure und Arginin erhöhte, je höher die Lagerungstemperaturen (30 °C oder 50 °C) und die Lagerungsdauer (4, 7 oder 14 Tage) waren. Dies wurde bereits von ANET und REYNOLDS (1956) beobachtet. Die Autoren detektierten Amadori-Verbindungen nach der Lagerung von gefriergetrockneten Aprikosen über 16 Monate bei einer Temperatur von 25 °C. Dies zeigt, dass eine Bildung von Amadori-Verbindungen auch bei moderaten Temperaturen (wie z. B. Raumtemperatur) möglich ist.

CINER-DORUK und EICHNER (1979) untersuchten die Bildung und Stabilität von Amadori-Verbindungen in Tomatenpulver. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der Konzentration der Amadori-Verbindungen und sensorischen Veränderungen fest. Zudem können aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der

Amadori-Verbindungen, bestimmte Verbindungen als objektiver Nachweis von Schädigungen durch ungeeignete Trocknungsverfahren dienen.
Des Weiteren wurden Amadori-Verbindungen in getrockneten Milchprodukten (VAN BOEKEL 1998; BAPTISTA und CARVALHO 2004) und in Säuglingsnahrung sowie in Konfitüren nachgewiesen (GUERRA-HERNANDEZ und CORZO 1996; GUERRA-HERNANDEZ et al. 1999; RADA-MENDOZA et al. 2002).

HASHIBA (1978a, b) detektierte verschiedene Amadori-Verbindungen in Miso (Fru-Gly, Fru-Ala, Fru-Val, Fru-Ile, Fru-Leu), in Weißwein (Fru-Ala, Fru-Pro, Fru-Val, Fru-Ile, Fru-Leu), in Saké (Fru-Gly, Fru-Ala, Fru-Val, Fru-Ile, Fru-Leu) und in Soja-Soße (Fru-Gly, Fru-Ala, Fru-Val, Fru-Ile, Fru-Leu).

1.4.3 Übersicht zur Synthese, Aufreinigung und Isolierung von Amadori-Verbindungen

1.4.3.1 Synthese

Amadori-Verbindungen werden üblicherweise durch Erhitzen der beiden Reaktionspartner (D-Glucose und Aminosäure) für mehrere Stunden unter Rückfluss synthetisiert. Als Lösungsmittel wird wasserfreies Methanol verwendet. Die Synthesezeit wird durch Testen einzelner Fraktionen auf Amadori-Verbindungen und/oder über die entstehende Farbe des Reaktionsgemisches bestimmt. In den meisten Arbeiten in der Literatur wird bis zu einem gelben bis gelb-bräunlichen Endpunkt synthetisiert (ABRAMS et al. 1955; SGARBIERI et al. 1973; REUTTER und EICHNER 1989; STAEMPFLI et al. 1994; YAYLAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994).

Bei der Synthese unterliegen die reduzierenden Zucker einer Mutarotation, die zu einer Ringöffnung des Zuckers führt (vgl. Abbildung 1-21). Diese offenkettige Form ist die einzige reaktive Form, die mit Amino-Verbindungen reagieren kann. Zudem treten während der Amadori-Synthese sowohl Oxidationen als auch säure- sowie basenkatalysierte Transformationen auf (YAYLAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994).

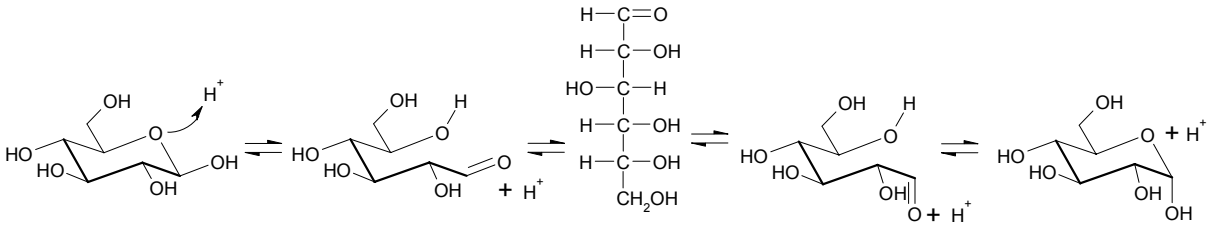


Abb. 1-21 Mutarotation von Glucose in wässriger Lösung; (modifiziert nach BELITZ 2008: 257)

Die Bildungsrate der Amadori-Verbindung ist somit abhängig von der Bildungsrate der offenkettigen Form des Zuckers (BUNN und HIGGINS 1981). Die cyclische Form und die offenkettige Form befinden sich im Gleichgewicht, so dass durch Ablauf der Bildungs-Reaktion der Amadori-Verbindung die offenkettige Form verbraucht wird und diese durch Mutarotation nachgebildet wird (VAN BOEKEL 2001).

Die in den Amadori-Verbindungen vorliegende Hexose D-Fructose gehört zu den Ketosen. In kristalliner Form liegt sie als Sechsring der sogenannten Fructopyranose-Form und gebunden als Fünfring der sogenannten Fructofuranose-Form vor. In Wasser gelöst (bei 20 °C) liegt die D-Fructose zu 76 % in der *β*-Pyranose-Form, zu 4 % in der *α*-Furanose-Form und zu 20 % in der *β*-Furanose-Form vor (vgl. Abbildung 1-22).

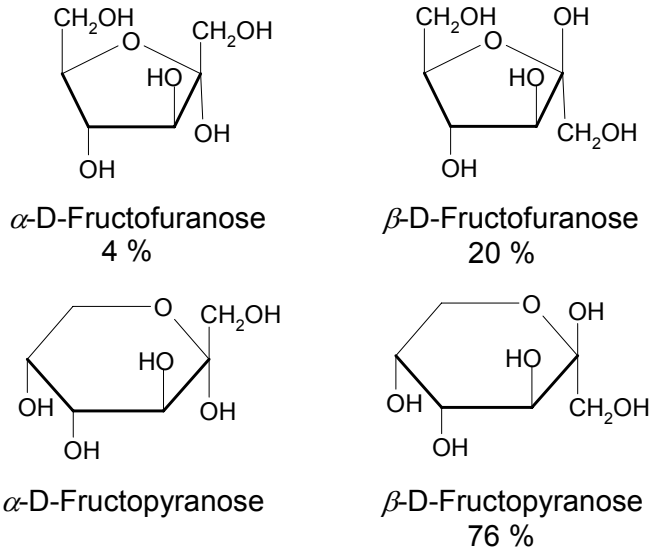


Abb. 1-22 Mögliche Konformationen der D-Fructose in wässrigen Lösungen (20 °C); (Daten aus BELITZ 2008: 259)

Die *α*- und *β*-Anomere der jeweiligen Ringformen können in wässriger Lösung ineinander umgewandelt werden und stehen untereinander in einem Gleichgewicht (BELITZ et al. 2008).

Diese Eigenschaft der D-Fructose muss bei der Synthese berücksichtigt werden und folglich sind im NMR-Spektrum der synthetisierten Verbindungen diese vier Formen des Fructose-Moleküls bzw. der entsprechenden Amadori-Verbindungen nachzuweisen (BOCK und THOGERSEN 1982).

Zudem muss beachtet werden, dass die einzelnen AS bedingt durch ihre Seitenketten mit den reduzierenden Zuckern sehr unterschiedlich reagieren. So ergeben sich beispielsweise aus der Reaktion von Lysin mit Glucose die drei Verbindungen *α,ε*-Di-Fru-Lys, *α*-Fru-Lys und *ε*-Fru-Lys und aus den AS Glutaminsäure und Glutamin entsteht durch Cyclysierung die Fructose-Pyrrolidoncarbonsäure (Fru-Py) (REUTTER und EICHNER 1989). Auch die Stabilität der gebildeten Amadori-Verbindungen wird von der AS stark beeinflusst (CINER-DORUK und EICHNER 1979).

In der Literatur werden noch weitere Methoden zur Synthese beschrieben. So erhitzten beispielsweise ANET und REYNOLDS (1956) Aldosen und AS in Wasser mit und ohne Natriumdisulfit. Auch RÖPER et al. (1983) und STAEMPFLI et al. (1994) bedienten sich dieser Methode und erhitzten unter Rückfluss die beiden Reaktionspartner zum einen in Wasser und zum anderen in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1, *v/v*) mit Natriumdisulfit.

LOPÉZ und GRUENWEDEL (1991) synthetisierten die aromatischen Amadori-Verbindungen Fru-Phe, Fru-Tyr und Fru-Trp durch Reaktion von 2,3:4,5-di-*O*-Isopropyliden-1-*O*-(Trifluoromethansulfonyl)-D-Fructopyranose mit den Alkylestern der AS L-Phe, L-Tyr und L-Trp. STEFANOWICZ et al. (2007) zeigten eine Festphasensynthese von Amadori-Verbindungen mittels direkter Alkylierung der *ε*-Aminogruppe des Lysin-Restes mit 2,3:4,5-di-*O*-Isopropyliden-*β*-D-Arabino-Hexos-2-ulo-2,6-Pyranose.

FROLOV et al. (2006a, 2008) zeigten die seitenkettenabhängige Synthese von „Amadori-modifizierten“ Peptiden durch Glykosilierung der *ε*-Gruppe der AS Lysin mit D-Glucose und anschließender Freisetzung der Amadori-Verbindungen durch Spaltung der Peptidbindungen mit TFA.

1.4.3.2 Aufreinigung

Die Synthese der Amadori-Verbindungen unterliegt dem Massenwirkungsgesetz; eine vollständige Umwandlung der Edukte in die gewünschte Substanz ist folglich nicht zu erwarten bzw. möglich. Im Reaktionsansatz lassen sich neben den synthetisierten Verbindungen noch gewisse Mengen an Edukten, aber auch schon an Folgeprodukten, die sich bereits aus dem Abbau der Amadori-Verbindungen ergeben, nachweisen. Um die synthetisierten Verbindungen als Standardmaterial nutzen zu können, müssen diese „Verunreinigungen“ entfernt werden.

Die Folgeprodukte (vgl. Kapitel 1.2) können durch einfache Filtration über Aktivkohle entfernt werden (REUTTER und EICHNER 1989). Die am häufigsten angewendete Methode zur Entfernung der freien AS und der noch im Reaktionsgemisch verbliebenen Glucose ist die Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie. Die Amadori-Verbindungen und die freien AS binden an den Ionenaustauscher und die noch vorhandene Glucose kann mittels polarer Lösungsmittel aus der Säule gewaschen werden. Im Anschluss wird die Amadori-Verbindung durch Verwendung eines relativ schwachen Eluenten (z. B. 0,2 M NH_3 oder 0,2 M TCE) von der Säule gewaschen, wobei die Konzentration des Eluenten so gewählt werden muss, dass die freie AS noch auf der Säule verbleibt. Anschließend müssen noch weitere Schritte erfolgen, beispielsweise das Entfernen des Lösungsmittels oder das Ausfällen und Umkristallisieren der Amadori-Verbindungen (ABRAMS et al. 1955; SGARBIERI et al. 1973; REUTTER und EICHNER 1989; STAEMPFLI et al. 1994; KRAUSE et al. 2003).

In anderen Arbeiten wurden beispielsweise Cellulose, Kieselgel oder Sephadex® als stationäre Phase eingesetzt (YAYALAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994).

Auch eine Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie auf Cellulose-Platten wurde von MAYER et al. (2006) entwickelt.
Anstelle dieser sehr zeitaufwändigen Methoden wurden auch semipräparative HPLC-Methoden verwendet. Hierbei wurden entweder modifizierte „RP-C_{18} Kieselgel" Säulen und Wasser als Eluent (MOLL und GROSS 1981) oder mit *NH_2*-Gruppen modifizierte Kiesegel Säulen und Methanol/Wasser als Eluent (MOLL et al. 1982) verwendet. Auch FRIEBERTSHÄUSER et al. (2004) reinigten die synthetisierte Verbindung Fru-Phe mittels HPLC unter Verwendung einer Nucleosil 3C18-Säule und den Eluenten bidest. Wasser und Methanol auf. Verglichen mit den zuvor beschriebenen Methoden können mittels semipräparativer HPLC direkt „saubere" Substanzen gewonnen werden und der Einsatz starker Säuren oder Basen als Puffer ist nicht notwendig. Nach der Entfernung der Lösungsmittel können die Verbindungen einfach kristallisiert oder lyophilisiert werden.
FROLOV et al. (2006a, 2008) beschrieben mit einer „seitenkettenspezifischen Methode" zur Synthese von Amadori-modifizierten Peptiden mittels Festphasen eine weitere effektive Möglichkeit. Diese Methode überzeugte durch eine hohe Reproduzierbarkeit, kurze Reaktionszeiten und sehr gute Ausbeuten.

1.4.3.3 Isolierung aus Probenmatrizes

Die Amadori-Verbindungen werden entweder direkt mit einem polaren Lösungsmittel (oft wird reines Wasser verwendet) isoliert, oder bei komplexeren Probenaufbereitungen kommen auch Ionenaustauscher oder präparative HPLC-Methoden zum Einsatz.
REUTTER und EICHNER (1989) isolierten beispielsweise Amadori-Verbindungen in Gemüseproben unter Rühren in Wasser. Nach scharfem Zentrifugieren wurden 1-10 mL vom Zentrifugat mit Methanol/Wasser (65:35, *v*/*v;* auf 50 mL aufgefüllt) versetzt und mittels Filterspritze membranfiltriert. Die klare Lösung konnte anschließend zur Analyse verwendet werden. Auch DAVIDEK et al. (2005) extrahierten Amadori-Verbindungen aus getrockneten Tomaten und Aprikosen mit Wasser und anschließender Filtration.
HASHIBA (1978b) isolierten Fru-AS aus Sojasoße mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Amberlite CG 120 Harz in

der H^+-Form. Die Auftrennung der Fru-AS von noch freien AS nach der Säulenchromatographie führten sie mittels Gelfiltration mit Sephadex G-10 durch.
HEINZLER und EICHNER (1991a) isolierten Amadori-Verbindungen in Kakao nach folgendem Schema: **1.** Entfetten des Kakaokernbruchs mit Petrolether; **2.** Trocknung bei 40 °C für 12 h; **3.** Extraktion mit Wasser; **4.** Anreicherung auf Kationenaustauschersäule; **5.** Waschen mit Wasser; **6.** Elution mit 0,5 M TCE; **7.** Ausschütteln mit Ether; **8.** Einengen; **9.** Analyse. Auch OBERPARLEITER und ZIEGLEDER (1997) extrahierten Amadori-Verbindungen nach diesem Schema aus Kakao. Die Extraktion mit Wasser wurde im Ultraschallbad durchgeführt und anstelle von TCE eluierten sie die Verbindungen mit 5 %igem Ammoniak.

1.4.4 Analytische Verfahren zur Bestimmung

Die Analyse von Amadori-Verbindungen (insbesondere in komplexen Matrices) ist aufgrund des sehr polaren und nicht-flüchtigen Charakters dieser Verbindungen eine schwierige Aufgabe. Sehr oft sind vorab zeitaufwändige Aufreinigungen nötig und eine Vielzahl der bereits in der Literatur beschriebenen Methoden zeigen weder gute Detektionsempfindlichkeiten, noch gute Auftrennungen, die eine gleichzeitige Analyse mehrerer Amadori-Verbindungen ermöglichen würden.
Eine der ersten Nachweismethoden war die Detektion mit $K_4[Fe(CN)_6]$. Amadori-Verbindungen reduzieren Kaliumferrocyanid in einer 0,1 M NaOH Lösung, dies kann durch photometrische Messungen der blau gefärbten Lösungen detektiert werden (BORSOOK et al. 1955).

Des Weiteren wurden Aminosäure-Analyzer zur frühen Detektion von Änderungen während der Maillard-Reaktion eingesetzt. Eine individuelle Analyse der einzelnen Verbindungen war mit dieser Methode aber nicht möglich und führte letztendlich auch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen (HEYNS et al. 1967; CINER-DORUK und EICHNER 1979; EICHNER und CINER-DORUK 1979; EICHNER et al. 1990).
Eine ausgezeichnete Methode stellt wiederum die Kapillargaschromatographie dar, die es erlaubt, mehrere Amadori-Verbindungen in einem Chromatogramm zu identifizieren. Die Bestimmung der Verbindungen erfolgt nach Oximierung und anschließender Trimethylisierung (WITTMANN und EICHNER 1989; Eichner et al.

1990; SCHRÄDER und EICHNER 1996). Diese Methode wurde bereits erfolgreich eingesetzt, wie z. B. zur Analyse von Amadori-Verbindungen in verschiedenen Malz- und Biersorten (WITTMANN und EICHNER 1989) sowie in Kakaobohnen (HEINZLER und EICHNER 1991a). Diese Methode hat aber auch Nachteile: Zum einen werden für jede Amadori-Verbindung zwei Peaks detektiert, jeweils die syn- und anti-Form der Oxime (WITTMANN und EICHNER 1989), zum anderen lassen sich keine Amadori-Verbindungen von basischen AS sowie von Asparaginsäure und Glutamin erfassen (HEINZLER und EICHNER 1991a).
Abbildung 1-23 zeigt das Standardchromatogramm dieser Methode.

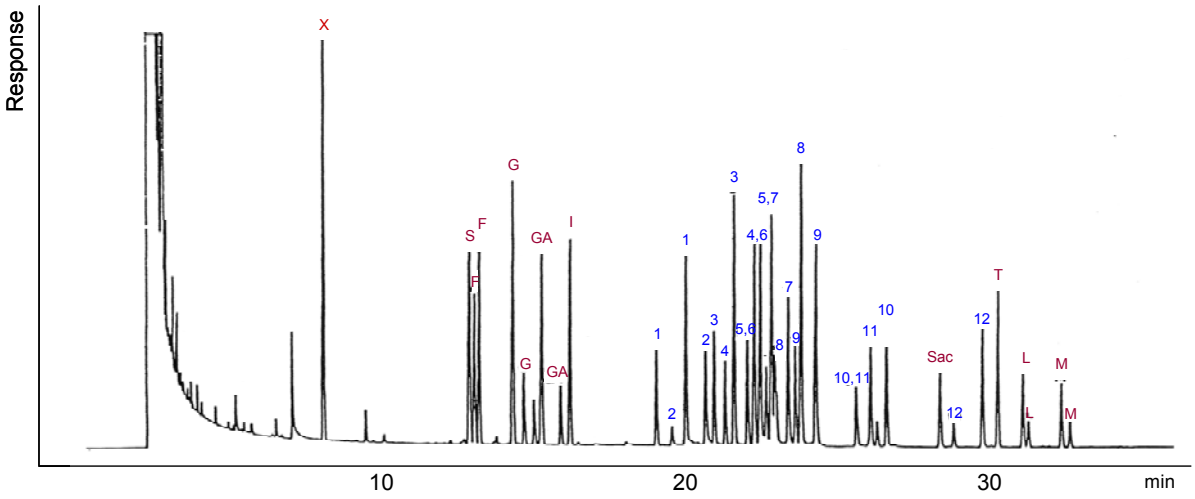


Abb. 1-23 **Kapillargaschromatogramm der Analyse von 12 Amadori-Verbindungen nach Oximierung und Silylierung; X Xylit; S Sorbit; F Fructose; G Glucose; GA Galaktoronsäure; I Inosit; Sac Saccharose; T Trehalose; L Lactose; M Maltose; 1 Fru-Ala; 2 Fru-Gly; 3 Fru-Val; 4 Fru-Leu; 5 Fru-Ile; 6 Fru-Gaba; 7 Fru-Pro; 8 Fru-Ser; 9 Fru-Thr; 10 Fru-Asp; 11 Fru-Hyp; 12 Fru-Phe; (modifiziert nach HEINZLER und EICHNER 1991a)**

HPLC-Analysen stellen die am häufigsten verwendeten Methoden zur Trennung und Identifizierung von Amadori-Verbindungen dar. Glucose-Valin und Maltose-Prolin wurden beispielsweise mittels refraktrometrischen Detektoren unter Verwendung einer semi-präparativen RSIL C_{18} HL, einer Nucleosil 10 C_{18} und einer semi-präparativen *NH_2*-gebundenen Kieselgel Säule bestimmt (MOLL und GROSS 1981; MOLL et al. 1982).

Die effektivste Methode wurde von REUTTER und EICHNER (1989) entwickelt. Nach Isolierung der Amadori-Verbindungen mit Wasser wurden diese mittels HPLC isokratisch mit einem Acetonitril-Phosphat-Puffer auf einer *N,N*-Diethylaminoethyl-modifizierten Kieselgel Säule (DEAE-Si 100), getrennt und durch Nachsäulenderivatisierung mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als rot gefärbtes Formazanderivat bei 480 nm detektiert. Abbildung 1-24 zeigt das Standardchromatogramm der synthetisierten Verbindungen. Neben den Amadori-Verbindungen werden auch die beiden Monosaccharide Glucose und Fructose detektiert (EICHNER et al. 1990).

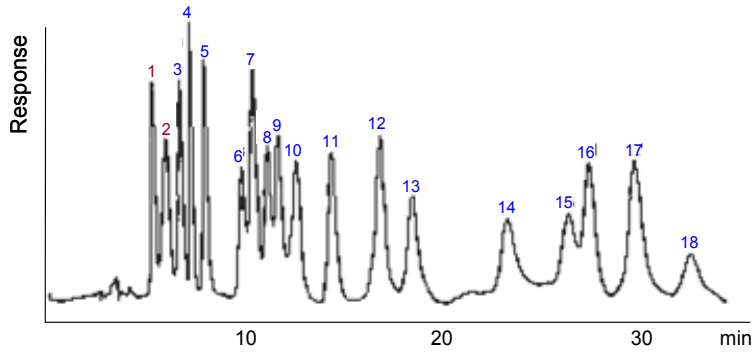


Abb. 1-24 **HPLC-Chromatogramm der Analyse von 16 Amadori-Verbindungen mittels Nachsäulenderivatisierung mit TTC; 1 Fructose; 2 Glucose; 3 Fru-Leu; 4 Fru-Phe; 5 Fru-Val; 6 Fru-Hyp; 7 Fru-Ala + Fru-Gln; 8 Fru-Asn; 9 Fru-Thr; 10 Fru-Gaba; 11 Fru-Ser; 12 Fru-Py; 13 Fru-Arg; 14 *α*-Fru-Lys; 15 *ε*-Fru-Lys; 16 Fru-Glu; 17 Fru-Asp; 18 *α,ε*-Difru-Lys; (modifiziert nach REUTTER und EICHNER 1989)**

WALTON und McPHERSON (1987) analysierten Amadori-Verbindungen aus glykosilierten Peptiden bzw. Proteinen nach ihrer Konvertierung in Phenylthiocarbamyl-Derivate mittels HPLC unter Verwendung einer C_{18} Säule und einem variablem Wellenlängen-Detektor.

HUYGHUES-DESPOINTES und YAYLAYAN (1994) koppelten die HPLC mit einem Diodenarray, einem elektrochemischen und einem Fluoreszensdetektor. GE und LEE (1996) nutzten ebenfalls eine HPLC-Methode zur Detektion (UV bei 260 nm) aromatischer Amadori-Verbindungen (Fru-Phe, Fru-Tyr, Fru-Trp) auf einer Anionen-Austauscher-Säule und DEL CASTILLO et al. (1999), SANZ et al. (2001) sowie

CARDELLE-COBAS et al. (2005) analysierten die nach Säurehydrolyse der Amadori-Verbindungen entstandenen 2-Furoylmethyl-AS mittels HPLC.

Alternative Methoden wurden beispielsweise von DAVIDEK et al. (2002, 2003) mittels High-Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC) gekoppelt mit einem elektrochemischen oder einem Diodenarray-Detektor entwickelt, sowie mittels High-Performance Cation-Exchange Chromatography (HPCEC) kombiniert mit einem Tandem-MS oder einem elektrochemischen Detektor (DAVIDEK et al. 2005).

STAEMPFLI et al. (1994) nutzten die Fast Atom Bombardement Tandem-Massenspektrometrie (FAB-Tandem-MS), HAU et al. (2004) kombinierten die Kapillarelektrophorese mit der Tandem-Massenspektrometrie (CE-MS/MS) und HAO et al. (2007) und WANG et al. (2008) nutzten wiederum die Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) zur Detektion der Amadori-Verbindungen.

Des Weiteren entwickelten JOO et al. 2008 eine neue analytische Methode mittels HPAEC gekoppelt mit einem gepulsten amperometrischen Detektor (Pulsed Amperometric Detektor (PAD)). Mit dieser Methode konnten sie die Amadori-Verbindungen Arg-Fru und Arg-Fru-Glu gleichzeitig bestimmen.

2 Experimenteller Teil

2.1 *Instrumentelle Anordnung und Systemeinstellungen*

2.1.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Bei der GC-MS-Methode wurden zur Detektion der D- und L-AS-Derivate zunächst Messungen im sogenannten Scan-Modus, dem Total-Ion-Chromatogramm-Modus (TIC) durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden DL-AS-Standards verwendet (siehe Kapitel 2.5.3.2). Die in diesem Lauf detektierten Massenfragmente (*m*/*z*) waren für die einzelnen AS-Derivate charakteristisch und wurden im sogenannten SIM-Modus (Selected Ion Modus) als Ionsets verwendet. Hierbei wurden selektiv innerhalb bestimmter Zeitintervalle nur die im Scan-Modus zuvor bestimmten Massenfragmente detektiert. Diese Methode ermöglichte eine höhere Detektionsempfindlichkeit und störende Peaks konnten im Vergleich zum Scan-Modus ausgeblendet werden. Die in dieser Arbeit bestimmten bzw. festgelegten Zeitfenster (Ionsets) werden in den entsprechenden Kapiteln der untersuchten Substanzen aufgeführt. Die Zeitfenster der SIM-Modi mussten im Laufe der Zeit angepasst werden, da sich die Trennleistung der GC-Säulen bei einem hohen Probendurchsatz verschlechterte und somit die Retentionszeiten kürzer wurden.

<u>Gaschromatograph 1:</u> GC-17A mit Split/Splitless-Injector (*Shimadzu, Kyoto; Japan)*

Steuerungs- und Auswertungssoftware: Class 5000 *(Shimadzu, Kyoto; Japan)*
Trägergas: Helium (5.0), Purity > 99.9990 % *(Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)*
Detektor: Quadrupol-Massenspektrometer QP 5000 (*Shimadzu, Kyoto; Japan)*
Säule: Chirasil®-L-Val Fused Silica Kapillare (Art.-Nr.: CP7495); L-Valin-tert.-Butylamid/Polysiloxan-Mischphase; 25 m x 0.25 mm ID, Filmdicke: 0,12 µm; *(Varian-Chrompack GmbH, D-64230 Darmstadt)*

Systemeinstellungen

Modus:	Selected Ion Monitoring (SIM)
Detector Volts:	1,50 kV
Injector Temperatur:	250 °C
Interface Temperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	250 °C
Column Pressure:	3,2 kPa
Column Flow:	0,5 ml/min
Total Flow:	15,7 ml/min
Split Ratio:	1:30
Temperaturführung:	siehe Tabelle 2-1
Druckführung:	siehe Tabelle 2-2

Tab. 2-1 Temperaturprogramm des GC-MS GC-17A

	Heizrate (°C/min)	Temperatur (°C)	Haltezeit (min)
Starttemperatur	---	70	1
1	3,0	100	5
2	3,5	135	0
3	5,0	150	0
4	20,0	190	10

Tab. 2-2 Druckprogramm des GC-MS GC 17A

	Rate (kPa)	Druck (kPa)	Haltezeit (min)
Startdruck	---	3,2	1
1	0,2	7,0	2
2	0,2	10,8	0
3	1,4	13,0	0
4	2,2	15,0	5

<u>Gaschromatograph 2:</u> HP 6890 Series GC System G gekoppelt mit HP 6890 Series Quad *(Hewlett Packard, Avondale, PA; USA)*

Steuerungs- und Auswertungssoftware: G1701AA Version A.00.00 *(Hewlett Packard, Avondale, PA; USA)*

Trägergas: Helium (5.0), Purity > 99.9990 % *(Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)*

Detektor: HP 6890 Series Quad Massenspektrometer

Säule: FS-LIPODEX® E Kapillarsäule (Art.-Nr.: 723368.25); Octakis-(2,6-di-*O*-pentyl-3-*O*-butyryl)-γ-cyclodextrin; 25 m x 0,25 mm ID, Filmdicke: keine Angabe durch den Hersteller; *(Machery-Nagel, D-52335 Düren)*

Systemeinstellungen

Modus:	Selected Ion Monitoring (SIM)
Detector Volts:	1,50 kV
Injector Temperatur:	250 °C
Interface Temperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	250 °C
Column Pressure:	5 kPa
Column Flow:	0,3 ml/min
Total Flow:	9,3 ml/min
Split Ratio:	1:20
Temperaturführung:	siehe Tabelle 2-3
Druckführung:	siehe Tabelle 2-4

Tab. 2-3 Temperaturprogramm des GC-MS HP 6890

	Heizrate (°C/min)	Temperatur (°C)	Haltezeit (min)
Starttemperatur	---	85	0
1	2	120	0
2	5	145	5
3	12	200	20

Tab. 2-4 Druckprogramm des GC-MS HP 6890

	Rate (kPa)	Druck (kPa)	Haltezeit (min)
Startdruck	---	5,00	1
1	0,21	7,00	2
2	0,30	11,00	0
3	1,60	15,00	8

2.1.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Anlage 1: HP 1100 Series *(Agilent, D-76337 Waldbronn)*

Säulenofen: Modell G1316A
UV-Detektor: Modell G1314A
Probengeber: Modell G1313A
Binäres Pumpensystem: Modell G1312A
Vakuum Degasser: Modell G1322A
Software: HP ChemStation for LC-Systems (Rev.A.04.02) *(Hewlett Packard GmbH, D-76337 Waldbronn)*

Anlage 2: HP 1100 Series *(Agilent, D-76337 Waldbronn)*

Säulenofen: Modell G1316A
Diodenarry-Detektor: Modell G1324A
Probengeber: Modell G1313A
Quaternäres Pumpensystem: Modell G1311A
Vakuum Degasser: Modell G1322A
Software: HP ChemStation for LC-Systems (Rev.A.04.02) *(Hewlett Packard GmbH, D-76337 Waldbronn)*

Die verwendeten Gradientenprogramme sind in den entsprechenden Kapiteln der einzelnen Methoden bzw. durchgeführten Analysen angegeben.

Verwendete HPLC-Säulen:

Varian Deutschland GmbH, D-64289 Darmstadt:

Microsorb-MV 100-5 Amino (Art.-Nr. R0086700D5)

(250 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße)

Polaris® C18-Ether (Art.-Nr.: A2020250X046)

(250 x 4,6 mm ID, 3 µm Korngröße)

Pursuit® PFP (Art.-Nr.: A3050250X046)

(250 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße)

Dionex GmbH, D-65510 Idstein:

Dionex Acclaim® Polar Advantage (Art.-Nr.: 061320)

(150 x 4,6 mm ID, 5 µm Korngröße)

CS - Chromatographie Service GmbH, D-52379 Langerwehe:

Kromasil KR 100-3 C8 (Art.-Nr.: 586 931 15)

(150 x 4,6 mm ID, 3,5 µm Korngröße)

2.1.3 Massenspektrometer des Typs Elektronensprayionisierungs-Ion-Trap (ESI-MS)

Gerät: LCQ-MS^{TM} ***(Thermo Quest, Finnigan MAT, San Jose, CA; USA)***

Sheath gas: technisches N_2 *(Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)*

Auxiliary gas: technisches N_2 *(Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)*

Collision gas: Helium (5.0), Purity > 99,9990 % *(Messer-Griesheim, D-47793 Krefeld)*

Ion source collision-induced dissociation (CID-MS): Durchgeführt bei 0 %, 20 % oder bei 45 % relativer „Collision-Energy“

Einstellungen zur Analyse der Amadori-Verbindungen:

Heated Capilarry Temperatur: 230 °C
Sheath gas flow rate: 60 (arb)
Auxiliary gas flow rate: 45 (arb)
Capillary Voltage: 3 (V)
Tube Lens offset: -40,0 (V)
Ionization Spray Voltage: 4,5 (kV)

Einstellungen zur Analyse der Aib-Peptide und nativen Peptaibole:

Heated Capilarry Temperatur: 250 °C
Sheath gas flow rate: 40 (arb)
Auxiliary gas flow rate: 10 (arb)
Capillary Voltage: 43 (V)
Tube Lens offset: 10 (V)
Ionization Spray Voltage: 4,5 (kV)

Die Analysen wurden im positiven Ionisierungs-Modus durchgeführt. Die *m/z* Werte wurden im sogenannten „centroid mode“ mit einer Genauigkeit von ±0,5 Da aufgezeichnet.
Für die automatische Kalibrierung wurde ein Gemisch aus Koffein (*m/z* 195,1), Met-Arg-Phe-Ala (*m/z* 524,3) und dem perfluorierten MS-Standard Ultramark 1621 (*m/z* 1022,0; *m/z* 1122,0; *m/z* 1222,0; *m/z* 1322,0; *m/z* 1422,0; *m/z* 1522,0; *m/z* 1622,0; *m/z* 1722,0; *m/z* 1822,0; *m/z* 1921,9) verwendet.

2.1.4 NMR-Spektroskopie

Für die Verbindung Fru-L-Abu (vgl. Kapitel 2.3.4) wurde eine umfangreiche Strukturaufklärung durchgeführt. Die 1D (^{1}H, ^{13}C) und 2D (COSY, TOCSY, HMQC und HMBC) NMR Spektren wurden im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig (in der Arbeitsgruppe Biophysikalische Analytik) angefertigt. Die Messungen wurden mittels eines „AVANCE DMX NMR Spektrometer“ der Firma Bruker bei 300 °K durchgeführt. Die Angaben der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm und die der Kopplungskonstante(n) in Hertz.

Die weiteren ^{1}H und ^{13}C NMR Analysen der synthetisierten Amadori-Verbindungen (vgl. Kapitel 2.3.4) wurden im Institut für Organische Chemie (AG Prof. Dr. Göttlich, Heinrich-Buff-Ring 58, D-35392 Giessen) der Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt. Sämtliche Kernmagnetresonanz-Spektren wurden mit den Geräten AV200 und AV400 der Firma Bruker durch Frau A. Pospiech und Frau G. Stammler bzw. auf einem AV600 durch Frau Dr. H. Hausmann aufgenommen.
Die Angaben der chemischen Verschiebung (δ - Skala) erfolgt in ppm. Als interne Referenz dienten bei der ^{1}H-NMR-Spektroskopie die Signale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittel: [D2]-Wasser δ = 4,63 ppm. Bei den ^{13}C-NMR-Spektren beziehen sich die Verschiebungen auf die Resonanzlage der Kohlenstoffatome des deuterierten Lösungsmittels: [D2]-Wasser. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von 298 °K aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe des Programms MestReC, wobei die Signale für die Protonenspektren in der Reihenfolge: Wert der chemischen Verschiebung (Multipizität, gegebenenfalls die Kopplungskonstante(n) in Hertz, Integral, Zuordnung) angegeben werden. Die Beschreibung der Signalformen erfolgt mit den üblichen Abkürzungen (s: singulet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, bd: broad doublet, dd: doublet of doublets und m: multiplet) und deren Kombinationen.

2.2 *Geräte und Hilfsmittel*

Analysenwaage: Modell AG 245 *(Mettler Toledo GmbH, D-35396 Gießen)*

Bidestilliergerät: Destamat® BI 18 E *(Heraeus Quarzglas GmbH, D-63450 Hanau)*

DC-Kammer: Doppeltrogkammer für 20 x 20 cm Platten mit Glasdeckel *(Camag, Muttenz, CH)*

DC-Fertigplatten: ALUGRAM® SIL G mit Kieselgel 60 beschichtet, Schicht 0,2 mm, 20 x 20 cm *(Macherey-Nagel GmbH & Co., D-52335 Düren)*

Eppendorf-Zentrifuge: Qualitron *(Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe)*

Festphasenextraktion: Chromabond® Vakuumkammer für 12 Säulen *(Macherey-Nagel GmbH & Co., D-52335 Düren)*

Fraktionssammler: LABOCOL Roto-Ultra/120 mit LABOMAT 21-D Time Unit *(LABOMATIC Instruments GmbH, D-79576 Weil am Rhein)*

Gefriertrockner: RD4 Vacuubrand Beta (*Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, D-37520 Osterode am Harz)*

Glaswolle: Filterwatte, extra fein *(MAGV GmbH, D-35466 Rabenau-Londorf)*

Heizblock: für Erhitzungsversuche: Metallblock-Thermostat Typ SON/DA *(Gebr. Liebisch GmbH & Co., D-33649 Bielefeld)*

Heizblock: für Derivatisierung: Blockthermostat BT 2000 *(Kleinfeld Labortechnik, D-30989 Gehrden)*

HPLC Probengläser: 1 mL inkl. Schraubverschluss mit Teflon-Einlage *(Macherey-Nagel GmbH & Co., D-52335 Düren)*

Mikroeinsätze: Für HPLC Probengläser, 0,25 µL *(Macherey-Nagel GmbH & Co., D-52335 Düren)*

Magnetrührer: RCT Basic (*IKA Labortechnik, D-79217 Staufen)*

Magnetrührer: mit Heizung, für Erhitzungsversuche und zur Herstellung von Fructosylaminosäuren: RCT Basic IKAMAG® mit Thermostat ETS-D4 fuzzy *(IKA Labortechnik, D-79217 Staufen)*

Mikroliterspritze: Syringe Injektionsspritze für Gaschromatographen, 10 µL straight, part number 9301-0714 *(Agilent Technologies, D-71034 Böblingen)*

Pasteurpipette: kurz (8 cm) und lang (23 cm), Durchmesser 5 mm *(Hirschmann Laborgeräte, D-74246 Eberstadt)*

pH-Indikatorpapier: Universalindikator pH 1-14 *(Merck KGaA, D-64293 Darmstadt)*

pH-Meter: pH 526 MultiCal® mit inoLab® 422 Elektrode mit Ag/AgCl-Bezugssystem *(Wissenschaftlich Technische Werkstätten, D-82362 Weilheim)*

Reacti-Therm™: Heating/Stirring Module *(Pierce Chemical Company, Rockford, IL; USA)*

Reacti-Vap™: Evaporating Unit Modell 18780 *(Pierce Chemical Company, Rockford, IL; USA)*

Reacti Vial®: 1 mL inkl. Schraubverschluss mit Teflon-Einlage *(Wheaton, Milville, NJ; USA)*

Rotationsverdampfer: Laborota 4000 mit Rotavac-Pumpe und Wasserbad *(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, D-91126 Schwabach)*

Schlauchpumpe: für Säulenchromatographie: LABOMATIC MD80/100 *(LABOMATIC Instruments GmbH, D-79576 Weil am Rhein)*

Siliconöl: für das Ölbad: Siliconöl M 100 *(Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe)*

Ultraschallbad: Sonorex Super RK 106 *(Bandelin Electronic, D-12207 Berlin)*

Vakuumpumpe: Type MZ 2C / 1.7 *(Vakuubrand GmbH + Co., D-97977 Wertheim)*

Variopipetten: Eppendorf Research, variabel, 10-100 µL und 100-1000 µL *(Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, D-50389 Wesseling-Berzdorf)*

2.3 *Chemikalien und Probenmaterial*

2.3.1 Chemikalien

Bachem Biochemika GmbH, D-69126 Heidelberg

D-Prolin, > 99 %	Bestellnr. F-2045
DL-Prolin, > 99 %	Bestellnr. F-2050
L-Prolin, > 99 %	Bestellnr. E-2290
L-Norleucin, > 99,5 %	Bestellnr. F-1915

Carl Roth GmbH & Co, D-76185 Karlsruhe

1-Propanol, ≥ 99,5 %	Bestellnr. 6776.1
Ammoniaklösung, ≥ 25 %	Bestellnr. 6774.2
Ethanol, ≥ 96 %, vergällt	Bestellnr. T171.4
Natriumhydroxid, ≥ 99 %	Bestellnr. 6771.1
Seesand mit Salzsäure gereinigt	Bestellnr. 8441.2

Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim

1-Butanol, ≥ 98 %	Bestellnr. 19430
4-Aminobuttersäure (GABA)	Bestellnr. 07239
Acetonitril, E Chromasolv®, gradient grade	Bestellnr. 34888
Acetylchlorid, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 00990
Aktivkohle	Bestellnr. 22874
Amberlite® 120 IR	Bestellnr. 06428
Ameisensäure, ~ 98 %	Bestellnr. 06440
L-Alanin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 05130
D-Alanin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 05140
DL-Alanin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 05150
L-2-Aminobuttersäure, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 07200
D-2-Aminobuttersäure, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 07210
D-Asparaginsäure, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 11200
L-Asparaginsäure, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 11159
Butyl-hydroxy-toluol (BHT), ≥ 99,0 %	Bestellnr. 34750
Chloroform, purum 99,5 %	Bestellnr. 25693
Diphosphorpentoxid, ≥ 97,0 %	Bestellnr. 79612
Essigsäureethylester, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 45770
L-Glutaminsäure	Bestellnr. 49450
Glycin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 50050
Kieselgel 60	Bestellnr. 60741
L-Leucin, ≥ 98 %	Bestellnr. 61820
Methanol, mind. 99,8 %	Bestellnr. 65548
L-Methionin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 64320
L-Norvalin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 74650

D-Norvalin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 74660
L-Phenylalanin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 78020
L-Phenylglycin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 78565
D-Phenylglycin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 78570
Salzsäure, ≥ 32 %	Bestellnr. 84421
L-Serin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 84960
L-Threonin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 89180
D-Threonin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 89190
Trichloressigsäure, ≥ 99,5 %	Bestellnr. 91230
Trifluoressigsäureanhydrid, ≥ 99 %	Bestellnr. 91719
L-Tyrosin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 93830
L-Valin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 94620

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D-52313 Düren

Chromabond® SA	Bestellnr. 730077

Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

2-Propanol, reinst	Bestellnr. 101040
Aceton, ≥ 99,0 %	Bestellnr. 100013
Dichlormethan, ≥ 99,9 %	Bestellnr. 1.06048
Ninhydrin	Bestellnr. 487683
Tetrazolblau	Bestellnr. 1.08103

Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-30926 Seelze

Essigsäure, 99 – 100 %	Bestellnr. 27221
Isopropanol, ≥ 99,5 %	Bestellnr. 24137

Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89555 Steinheim

Aminosäure-Standard-Lösung	Bestellnr. AA-S-18
D-(+)-Glucose, 99,5 %	Bestellnr. G7528
L-Glutamin, ≥ 99,5 %	Bestellnr. G3126
D-Glutamin, ≥ 99,5 %	Bestellnr. G9003
D-Glutaminsäure, ≥ 99,5 %	Bestellnr. G1001

L-Isoleucin, ≥ 98 %	Bestellnr. I2752
DL-Isoleucin, ≥ 98 %	Bestellnr. I5393
D-Leucin, ≥ 98 %	Bestellnr. L-7750
L-Lysin, ≥ 98 %	Bestellnr. L-5501
D-Lysin ≥ 98 %	Bestellnr. L8021
D-Methionin, ≥ 98 %	Bestellnr. M9375
L-Ornithin-Monohydrochloride, ≥ 99 %	Bestellnr. O2375
D-Ornithin-Monohydrochloride, ≥ 98 %	Bestellnr. O5250
Petrolether, puriss. p.a., bp 40-60 °C	Bestellnr. 77379
D-Phenylalanin, ≥ 98 %	Bestellnr. P1751
DOWEX® 50W X 4-400, Ionenaustauscher	Bestellnr. 217484
DOWEX® 50W X 8-400, Ionenaustauscher	Bestellnr. 217514
L-Serin, ≥ 99,0 %	Bestellnr. S4500
D-Serin, ≥ 98,0 %	Bestellnr. S4250
Trifluoressigsäure (TFA), purum >98%	Bestellnr. 91700
D-Tyrosin, ≥ 98 %	Bestellnr. T3254
D-Valin, ≥ 98 %	Bestellnr. V0250

2.3.2 Probenmaterial

Kaffee:

7 verschiedene Kaffeeproben wurden im regionalen Einzelhandel in Gießen erworben (toom Verbrauchermarkt, Metro Handelskette), 1 Probe (K8) wurde in Sumatra Bukittingi erworben (vor Ort von einer Studentin im Jahre 2006):

Nescafé Gold ***(K1)***
Instant Kaffee; Granulat, gefriergetrocknet; Mischung aus Arabica-Kaffee Lateinamerikas und Kenias
(Nestle Deutschland AG, D-60523 Frankfurt am Main)

Mocca Fix Gold ***(K2)***
Filterfein gemahlener Röstkaffee
(Röstfein Kaffee GmbH, Hafenstraße 9, D-39106 Magdeburg)

Rondo Melange ***(K3)***
Röstkaffee; zum Teil kandiert, filterfein gemahlen
(Röstfein Kaffee GmbH, Hafenstraße 9, D-39106 Magdeburg)

Nescafé Classic ***(K4)***
Instant Kaffee; Granulat, sprühgetrocknet, eine Mischung aus würzig-kräftigem Robusta- und aromatischem Arabica-Kaffee
(Nestle Deutschland AG, D-60523 Frankfurt am Main)

Granarom Finest Quality Caffee ***(K5)***
Löslicher Kaffee gefriergetrocknet: 100 % Hochland Kaffee aus besten Arabica-Sorten
(Lidl Stiftung & Co. KG, D-74167 Neckarsulm)

Café Gold Bellarom ***(K6)***
100 % Arabica, gemahlener Röstkaffe
(Lidl Stiftung & Co. KG, D-74167 Neckarsulm)

*Segafredo Intermezzo **(K7)***
Espresso ganze Bohnen; Mischung aus Arabica und Robusta
(73601 Sotteville Les Rouen, Frankreich)

*Kopi Luwak **(K8)***
Gemahlener Röstkaffee (Sumatra Bukittingi)

Honig:

5 verschiedene Honigproben wurden im regionalen Einzelhandel in Gießen erstanden (Metro Gießen):

*Kastanien Honig **(BH1)**;*
(Breitsamer Honig, 81735 München)

*Akazienhonig **(BH2)**,*
Ernte 2008, Frühjahrstracht
(Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG, D- 38110 Braunschweig)

*Waldhonig **(BH3)**,*
Kalt geschleudert
(Langnese Honig, D-22933 Bargteheide)

*Tannenhonig **(BH4)**,*
(Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG, D- 38110 Braunschweig)

*Ägäischer Pinien Honig **(BH5)***
(Dr. med. Hans Plümer Nachf. GmbH & Co. KG, D- 38110 Braunschweig)

Diese Honige wurden vom Landesbetrieb Hessisches Landeslabor mit standardisierten Methoden charakterisiert: Wassergehalt (§ 64 LFGB L 40.00-2), Prolin Konzentration (§ 64 LFGB L 40.00-3 + GC-MS), HMF Konzentration (SLMB 23A/9.1 – 9.3), Glucose, Fructose und Saccharose Konzentration (§ 64 LFGB L 40.00 – 7); Tabelle 2.5 zeigt die Ergebnisse der untersuchten Parameter.

Tab. 2-5 Standardparameter der ausgewählten Honigproben

Parameter/Probe	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5
Wassergehalt (g/100g)	16,0	17,5	16,5	16,0	15,6
Prolin Konzentration (mg/kg)	500,4	274,2	795,8	454,8	539,3
HMF Konzentration (mg/kg)	11,2	6,1	2,5	16,6	4,3
Glucose (g/100g)	26,5	27,1	27,3	27,0	23,9
Fructose (g/100g)	42,3	40,9	37,4	35,5	31,0
Saccharose (g/100g)	5,4	4,8	5,4	5,3	5,8

2.3.3 Verwendete Aib-Peptide und native Peptaibole

Die verwendeten synthetischen Aib-Peptide und nativen Peptaibole stammen aus der Sammlung von Prof. Dr. H. Brückner. Für eine Übersicht (vgl. Abbildungen in Kapitel 3.5) und eine genaue Beschreibung über deren Synthese siehe THEIS et al. (2008) und TONIOLO und BRÜCKNER (2009).

2.3.4 Verwendete Amadori-Verbindungen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die proteinogenen Amadori-Verbindungen Fructose-L-Alanin (Fru-L-Ala), Fructose-L-Prolin (Fru-L-Pro) und Fructose-L-Phenylalanin (Fru-L-Phe) und die nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen Fructose-L-Norvalin (Fru-L-Nva), Fructose-L-Phenylglycin (Fru-L-Phg) und Fructose-L-*α*-Aminobuttersäure (Fru-L-Abu) verwendet. Deren Synthese wird in Kapitel 2.4 und die Charakterisierung der Verbindungen in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

2.4 *Synthese der verwendeten Amadori-Verbindungen*

Die Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala, Fru-L-Pro, Fru-L-Phe, Fru-L-Nor, Fru-L-Phg und Fru-L-Abu wurden modifiziert nach einer Methode von REUTTER und EICHNER (1989) synthetisiert. Je 0,04 mol Glucose (7,20 g) wurde zusammen mit je 0,02 mol der entsprechenden Aminosäuren (L-Ala 1,78 g, L-Pro 2,30 g, L-Phe 3,30 g, L-Phg 3,02 g, L-Nva 2,34 g, L-Abu 2,06 g) in einem Mörser homogenisiert und mit 400 mL

Methanol in einen Rundkolben überführt. Die Lösungen wurden mit Hilfe eines Magnetrührers unter ständigem Rühren bei 90 °C in einem Ölbad unter Rückflusskühlung erhitzt und anschließend im Eisbad gekühlt. Die Synthesezeiten der einzelnen Lösungen wurden durch Erstellung von Reaktionskinetiken der Verbindungen Fru-Ala und Fru-Phe bestimmt und optimiert. Nach je 15 min wurde eine Aliquot von 2,5 mL aus der Reaktionslösung entnommen und der Reaktionsverlauf mittels HPLC (Anlage 2, Gradientenprogramm siehe Tabelle 2-8) bestimmt. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Synthesezeiten zu gelb-orangen Färbungen der Synthese-Lösungen führten (vgl. Abbildung 3-6). Aufgrund der Ergebnisse (siehe Kapitel 3.2.1) wurden für die einzelnen Amadori-Verbindungen folgende Synthesezeiten definiert: Fru-L-Ala 3,5 h, Fru-L-Pro 6 h, Fru-L-Phe 2,5 h, Fru-L-Phg 5 h, Fru-L-Nva 2,5 h und Fru-L-Abu 3 h.
Zur Entfernung von möglicherweise entstandenen polymeren Verbindungen wurden die Lösungen über Aktivkohle filtriert. Die Filtrate wurden in einem Spitzkolben aufgefangen und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers eingeengt. Anschließend wurden die Substanzen über Nacht gefriergetrocknet. Die synthetisierten Verbindungen enthielten immer noch gewisse Anteile an freien AS und Glucose, die in weiteren Aufreinigungsschritten entfernt wurden (siehe Kapitel 2.6).

2.5 *Herstellung der verwendeten Lösungen*

2.5.1 Herstellung der Lösungen für die DC

8,8 % NH_3: Zur Herstellung wurden 35,2 mL der 25 %igen NH_3 mit bidestilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

17 % NH_3: 68 mL der 25 %igen NH_3 wurden mit 32 mL bidestilliertem Wasser versetzt.

2.5.2 Herstellung der Sprühreagenzien für die DC

Ninhydrin: Zur Herstellung wurden 0,2 g Ninhydrin in einen 100 mL Messkolben eingewogen, 5 mL 10 %ige Essigsäure zugegeben und der Kolben mit *n*-Butanol aufgefüllt.

10 %ige Essigsäure: Zur Herstellung wurden 10 mL einer 99 – 100 %igen Essigsäure in einen 100 mL Messkolben pipettiert und dieser mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Tetrazolblau:

Lösung 1: Zur Herstellung wurden 0,25 mg Tetrazolblau in einen 50 mL Messkolben eingewogen und dieser mit Methanol aufgefüllt.

Lösung 2: 12,0 g Natriumhydroxid-Plätzchen wurden in einem 50 mL Messkolben in bidestilliertem Wasser gelöst.

Die Lösungen wurden vor dem Gebrauch in gleichen Anteilen zusammen gegeben und gemischt.

2.5.3 Standard-Lösungen

Für die entsprechenden analytischen Fragestellungen wurden quantitativ definierte Standardlösungen eingesetzt.

2.5.3.1 L-AS-Standardgemisch (proteinogene AS)

Zur Herstellung des L-AS-Standardgemisches wurde ein kommerzielles äquimolares L-AS-Gemisch (siehe Kapitel 2.3.1; AA-S-18) verwendet. Zu dieser Lösung wurden die AS GABA, L-Orn und L-Nle in gleicher Menge (2,5 mmol) zugesetzt. Das Standardgemisch wurde mit 0,1 M HCl auf 5 mL aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde 1 mL für die Derivatisierung verwendet.

2.5.3.2 DL-AS-Standardgemisch

Zur Entwicklung der Methoden wurde eine DL-AS-Standardmischung hergestellt. Das Verhältnis der L-AS zur entsprechenden D-AS betrug zwei zu eins (*g:g*). Die theoretischen Einwaagen der nichtproteinogenen Substanzen sind in Tabelle 2-6 und die theoretischen Einwaagen der proteinogenen Substanzen sind in Tabelle 2-7 dargestellt. Die angegebenen Soll-Einwaagen wurden in einem 50 mL Messkolben eingewogen. Anschließend wurde bis zur Marke mit 0,1 M HCl aufgefüllt. Abweichungen bei der Einwaage wurden durch einen Korrekturfaktor, berechnet aus Soll- und Ist-Einwaage, berücksichtigt. Die Konzentration der L-Enantiomere betrug im fertigen Standard 20 mM und die der D-Enantiomere 10 mM.

Tab. 2-6 Soll-Einwaage [mg] der nichtproteinogenen AS zur Herstellung von 50 mL einer 10 mM bzw. 20 mM DL-AS-Standard-Lösung

AS	M [g/mol]	Einwaage [mg]
L-Abu	103,12	103,1
D-Abu	103,12	51,6
L-Nva	117,15	117,2
D-Nva	117,15	58,6
L-Phg	151,17	151,2
D-Phg	151,17	75,6
L-Nle	131,17	131,2

Tab. 2-7 Soll-Einwaage [mg] der proteinogenen AS zur Herstellung von 50 mL einer 10 mM bzw. 20 mM DL-AS-Standard-Lösung

AS	M [g/mol]	Einwaage [mg]	AS	M [g/mol]	Einwaage [mg]
Gly	75,07	75,1	L-Nle	131,17	131,2
L-Ala	89,10	89,1	L-Ile	131,17	131,2
D-Ala	89,10	44,6	D-Ile	131,17	65,6
L-Asp	133,12	133,2	L-Lys	146,19	146,2
D-Asp	133,12	66,6	D-Lys	146,19	73,1
L-Thr	119,12	119,2	L-Val	117,15	117,2
D-Thr	119,12	59,6	D-Val	117,15	58,6
L-Ser	105,09	105,0	L-Leu	131,17	131,2
D-Ser	105,09	52,5	D-Leu	131,17	65,6
L-Phe	165,19	165,2	L-Tyr	181,19	181,2
D-Phe	165,19	82,6	D-Tyr	181,19	90,6
L-Met	149,21	149,2	L-Pro	115,13	115,1
D-Met	149,21	74,6	D-Pro	115,13	57,6
L-Glu	147,14	147,2	L-Orn	132,16	132,2
D-Glu	147,14	73,6	D-Orn	132,16	66,1

Die Chromatogramme der nach Kapitel 2.9 derivatisierten Standards werden für die proteinogenen DL-AS Standards in den Kapiteln 3.1, 3.3 und 3.4.1 bzw. für die entsprechenden L-Standards im Anhang gezeigt. Das DL-Standard Chromatogramm der nichtproteinogenen AS wird in Kapitel 3.4.2 gezeigt.

2.5.3.3 Standardgemisch der proteinogenen Amadori-Verbindungen

Zur Herstellung eines externen Standards wurden die nach Kapitel 2.4 hergestellten und nach Kapitel 2.6 aufgereinigten Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala, Fru-L-Pro und Fru-L-Phe in folgenden Konzentrationen angesetzt:
1000 mg/L; 500 mg/L; 200 mg/L; 100 mg/L; 40 mg/L und 20 mg/L
Die durchgeführte Methodenvalidierung wird in Kapitel 2.11.4 beschrieben.

2.5.3.4 Weitere Standardgemische

L-Norleucin-Lösung (Interner Standard): Zur Herstellung einer 10 mM Lösung von L-Norleucin (L-Nle) wurden 13,2 mg der Aminosäure mit 0,1 M HCl in einen 10 mL Messkolben überführt und aufgefüllt.

GABA-Lösung: Für eine 10 mM GABA-Lösung wurden 10,3 mg GABA eingewogen und mit 0,1 M HCl auf 10 mL aufgefüllt.

L-Ornithin-Lösung: Für eine 10 mM L-Orn-Lösung wurden 16,9 mg eingewogen und mit 0,1 M HCl auf 10 mL aufgefüllt.

2.5.4 Reagenzien zur Probenaufarbeitung

6 M HCl: 693,8 mL der 32 %igen HCl wurden auf 1000 mL mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

2 M HCl: 227,9 mL der 32 %igen HCl wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

1 M HCl: 113,9 mL der 32 %igen HCl wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

0,1 M HCl: 11,4 mL der 32 %igen HCl wurden mit 988,6 mL bidestilliertem Wasser gemischt.

5 M NH_3: 379 mL der 25 %igen NH_3-Lösung wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

4 M NH_3: 303 mL der 25 %igen NH_3-Lösung wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

1 M NH_3: 76 mL der 25 %igen NH_3-Lösung wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

0,2 M NH_3: 15 mL der 25 %igen NH_3-Lösung wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

2 M NaOH: 80,0 g NaOH-Plätzchen wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und dieser mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

20 %ige Essigsäure: 200 mL der 100 %igen Essigsäure wurden in einem 1000 mL Messkolben mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

0,2 M Trichloressigsäure (TCE): 33,2 mL der ≥ 99,5 %igen TCE wurden in einen 1000 mL Messkolben pipettiert und dieser mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Aktivierung der Kationenaustauscher-Harze DOWEX® 50W X8-400 und Amberlite IR 120 H^+: Der Kationenaustauscher wurde mit 2 M NaOH für 45 min am Rotationsverdampfer durchmischt. Nach Absetzen des Austauscherharzes wurde der Überstand abdekantiert und mit bidestilliertem Wasser neutral gewaschen. Dieser Vorgang wurde jeweils mit 2 M HCl, 5 M NH_3 und 1 M HCl wiederholt. Das aktivierte und neutral gewaschene Harz wurde im Anschluss an diese Verfahren in 0,1 M HCl suspendiert.

2.5.5 Reagenzien zur Derivatisierung

Alkohol/HCL-Gemische: Methanol, 1-Propanol bzw. 2-Propanol wurden unter ständigem Rühren im Eisbad gekühlt. Vorgekühltes Acetylchlorid wurde tropfenweise zu dem verwendeten Alkohol zugesetzt. Das Verhältnis zur Herstellung einer 2,66 M HCl-Lösung im entsprechenden Alkohol betrug 8 Volumenanteile Alkohol zu 2 Volumenanteilen Acetylchlorid.

1 %ige 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol (BHT)-Lösung: Zur Herstellung wurden 50 mg BHT in 5 mL Methanol gelöst.

2.6 *Aufreinigung der Amadori-Verbindungen*

2.6.1 Präparative Aufreinigung mittels Ionenaustauscher (Entfernung des überschüssigen Zuckers)

Der überschüssige Zucker wurde mittels präparativer Kationenaustausch-chromatographie modifiziert nach einer Methode von STAEMPFLI et al. (1994)

entfernt. Die gefriergetrockneten Amadori-Verbindungen (ca. 3 g) wurden in 200 mL Essigsäure (20 %) gelöst, und der pH-Wert wurde mittels HCl- bzw. NaOH-Lösungen auf pH 2,3 eingestellt und auf eine mit Harz (Amberlite IR 120 H^+) gefüllte Chromatographiesäule (3 cm x 40 cm) aufgebracht. Die Säule wurde zunächst mit 3 L Ethanol/Wasser (7:3; *v/v*) und anschließend solange mit bidest. Wasser gewaschen, bis die Eluate negativ auf den Tetrazolblau-Test (vgl. Kapitel 2.5.2 und Kapitel 2.6.2.1) reagierten. Die am Ionenaustauscher adsorbierten Amadori-Verbindungen wurden mit 400 mL Ammoniumhydroxid (0,2 mol/L) eluiert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40 °C bis zur Trockne eingeengt. Anschließend wurde die Substanz 24 h unter Diphosphorpentoxid (P_2O_5) getrocknet.

2.6.2 Präparative Trennung mittels Säulenchromatographie (Entfernung der überschüssigen Aminosäure)

2.6.2.1 Vorbereitung mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Als stationäre Phase wurden ALUGRAM® SIL G mit SiO_2 60 beschichtete Fertigplatten (*Macherey-Nagel, Düren; Germany)* verwendet. Zur Trennung der Fructose-AS (Fru-Ala, Fru-Pro und Fru-Phe) von den jeweiligen freien AS (Ala, Pro und Phe) wurden verschiedene Lösungsmittel getestet (vergleiche Tabelle A-3). Die verschiedenen Probenäquivalente wurden auf die DC-Platten aufgetragen und diese in die zuvor gesättigte DC-Kammer eingebracht. Die beste Trennung (vgl. Kapitel 3.2.2.2) für alle synthetisierten Amadori-Verbindungen wurde mit einer Mischung aus 75 mL *n*-Butanol, 15 mL Ameisensäure und 10 mL bidestilliertem Wasser (*v/v/v*) erzielt. Für die Identifizierung der Aminokomponenten wurden die Platten mit der Sprühreagenz Ninhydrin **(S1)** (0,2 g Ninhydrin in 5 mL 10 %ige Essigsäure und 95 mL *n*-Butanol) für 2 min bei 100 °C entwickelt (Amadori-Verbindungen und Aminosäuren rot/violett). Die Zuckerkomponente der Amadori-Verbindung wurde mit der Sprühreagenz Tetrazolblau **(S2)** (5 mL 0,5 % Tetrazolblau in MeOH und 5 mL 6 N NaOH) durchgeführt. Entwickelt wurde die Platte für 1 min bei Raumtemperatur (Amadori-Verbindungen violett/ AS keinen Nachweis) (STAHL 1967).

2.6.2.2 Übertragung auf die Säulenchromatographie

Kieselgel 60 wurde im Fließmittel (*n*-Butanol-Ameisensäure-bidestilliertes Wasser / 75:15:10, v/v/v) aufgeschlämmt und in die Chromatographiesäule (4,5 cm x 45 cm) eingebracht. Auf das Kieselgel wurde eine Schicht Seesand (1 cm) gegeben. Eine 4 %ige Probenlösung (360 mg) der synthetisierten Amadori-Verbindungen wurde im Fließmittel (9 mL) gelöst und langsam auf die Chromatographiesäule aufgebracht. Fraktionen von je 15 mL des Eluats wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen und anschließend dünnschichtchromatographisch überprüft. Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte, wie bereits in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben, mit den Sprühreagenzien **S1** und **S2**. Fraktionen, die mit beiden Reagenzien positiv reagierten, wurden vereinigt und bei 40 °C am Rotationsverdampfer eingeengt. Zur vollständigen Entfernung des im Fließmittel enthaltenen *n*-Butanols wurde Essigsäureethylester zugegeben und erneut am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde der Vorgang mit Methanol wiederholt, um eine vollständige Trocknung zu gewährleisten. Die Ergebnisse und die Charakterisierung der aufgereinigten Substanzen werden im Kapitel 3.2 dargestellt.

2.7 *Analytische Trennung und Massenspektrometrie der synthetisierten Amadori-Verbindungen mittels HPLC-ESI-MS*

2.7.1 Methodenentwicklung mittels HPLC

Zur analytischen Trennung der Amadori-Verbindungen wurden verschiedene HPLC-Säulen (Polaris® C18-Ether; Pursuit® PFP; Dionex Acclaim® Polar Advantage; Microsorb-MV 100-5 Amino) in Kombination mit den HPLC Anlagen Nr. 1 und Nr. 2 getestet (vgl. Kapitel 2.1.2).

Die Amadori-Verbindungen wurden zunächst einzeln und später zusammen in zwei Gruppen analysiert. In Gruppe 1 wurde versucht, die Verbindungen Fru-Ala, Fru-Pro und Fru-Phe zusammen in einem Lauf zu trennen und analog dazu in Gruppe 2 die Verbindungen Fru-Nor, Fru-Abu und Fru-Phg.

Folgende Laufmittelkombinationen wurden getestet:
A) bidestilliertes Wasser isokratisch (pH mittels TFA auf 1,5 eingestellt)
B) bidestilliertes Wasser isokratisch (pH mittels NH_3 auf 8 eingestellt)
C) bidestilliertes Wasser isokratisch (ohne pH Einstellung)
D)* bidestilliertes Wasser und Acetonitril (pH mittels TFA auf 1,5 eingestellt);
E)* bidestilliertes Wasser und Acetonitril (pH mittels NH_3 auf 8 eingestellt)
F)* bidestilliertes Wasser und Acetonitril (ohne pH Einstellung)
*Für D-F) wurden verschiedene Gradientenprogramme getestet

Die Säulentemperatur wurde konstant auf 25 °C gehalten. Die Elutionsprofile der Amadori-Verbindungen wurden für Fru-Ala, Fru-Pro, Fru-Abu und Fru-Nva bei einer Wellenlänge von 205 nm und für Fru-Phe und Fru-Phg bei einer Wellenlänge von 265 nm bzw. zusätzlich, bei Verwendung der HPLC Anlage Nr. 1, als sogenannte „total ion currents (TIC)“ im positiven Ionisierungs-Modus (online-ESI-MS) aufgezeichnet (vgl. Kapitel 2.7.2). Die zu analysierenden Verbindungen (5 %ig) wurden in bidestilliertem Wasser analysiert. Das Injektionsvolumen betrug 15 µL.

2.7.2 Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse wurde die HPLC Anlage Nr. 1 mit der Polaris® C18-Ether Säule (250 x 4,6 mm ID, 3 µm Korngröße) von *Varian,* kombiniert mit dem **LCQ-MS™** Detektor (siehe Kapitel 2.1.3), verwendet. Die Säulentemperatur wurde konstant auf 25 °C gehalten. Die Elutionsprofile der Amadori-Verbindungen wurden als sogenannte „total ion currents“ (TIC) im positiven Ionisierungs-Modus (online-ESI-MS) aufgezeichnet. Zur genauen Charakterisierung der Verbindungen wurden die synthetisierten Substanzen bei 0 % und 20 % relativer „Collision-Energy“ detektiert (CID-MS).

Das zur Trennung entwickelte Gradientenprogramm (vgl. Kapitel 2.7.1) ist in Tabelle 2-8 dargestellt. Die zu analysierenden Verbindungen (5 %ig) wurden in bidestilliertem Wasser analysiert. Das Injektionsvolumen betrug 15 µL. Als Eluenten wurden bidestilliertes Wasser und Acetonitril (ohne vorherige pH Einstellung) verwendet.

Tab. 2-8 Gradientenprogramm zur analytischen Trennung und massenspektrometrischen Analyse der synthetisierten Amadori-Verbindungen

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flußrate [ml/min]
0	95	5	0.8
3	95	5	0.8
6	90	10	0.8
10	90	10	0.8
15	95	5	0.8
23	95	5	0.8

Eluent A: bidest. Wasser**; Eluent B:** Acetonitril

2.8 *Erhitzungsexperimente*

Jedes in diesem Kapitel beschriebene Experiment wurde mindestens doppelt durchgeführt. Zudem wurden die synthetisierten Substanzen einer Totalhydrolyse mit anschließendem Kationenaustausch unterzogen und gaschromatographisch analysiert, um eventuelle Racemisierungen im Ausgangsmaterial zu bestimmen. Diese Werte wurden als Blindwert definiert.

2.8.1 Erhitzungsexperimente mit den proteinogenen Amadori-Verbindungen bei 130 °C

Für die Erhitzungsversuche bei 130 °C wurden aus den synthetisierten Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala und Fru-L-Pro 0,2 M Stammlösungen in MeOH angesetzt. Die entsprechenden Einwaagen werden in Tabelle 2-9 gezeigt. Jeweils 100 µL dieser Lösungen wurden in ein Reacti-Vial pipettiert und kalt unter Stickstoffstrom eingeengt.

Tab. 2-9 Einwaagen [mg] von Fru-Ala und Fru-Pro für 0,2 M Stammlösungen in MeOH

Substanz	M [g/mol]	V [mL]	m [mg]
Fru-Ala	251,3	5	251,3
Fru-Pro	277,8	5	277,8

M = molare Masse; V = Volumen des Messkolbens; m = Einwaage

Die vorbereiteten Proben wurden für 0,5 h, 1 h, 3 h, 9 h, 15 h und 24 h im geschlossenen Reacti-Vial bei 130 °C ± 1 °C in einem elektrisch beheizten Sandbad erhitzt. Nach der Erhitzung wurden sie sofort im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Probenaufbereitung erfolgte mit und ohne vorangegangene Totalhydrolyse (siehe Kapitel 2.9.1).

2.8.2 Erhitzungsexperimente der nichtproteinogenen Aminosäuren und nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen im Honig bei 130 °C

2.8.2.1 Erhitzungsexperimente der nichtproteinogenen Aminosäuren

Die nichtproteinogenen Aminosäuren L-Phg, L-Nva und L-Abu (100 mg gelöst in 10 mL bidestilliertem Wasser) wurden in 200 g Bienenhonig (Probe BH2) für 1 h mittels Rotation homogenisiert. Zur Überprüfung der Homogenität wurde der L-AS Gehalt in der Honigprobe mittels GC-SIM-MS bestimmt (vgl. Tabelle 3-11). Die berechneten Werte wurden als Ausgangsgehalte in mg/100g Probe für die Erhitzungsversuche definiert. Das Reaktionsgemisch wurde gleichmäßig in kleine Probengefäße (Schnappdeckelgläser, 50 x 30 mm HxB) verteilt. Jedes Glas beinhaltete mindestens 10 g des Probenmaterials. Die offenen Probengefäße wurden in einem Sandbad bei 130 °C ± 1 °C erhitzt. Nach jeweils 15 min, 30 min, 60 min und 120 min Erhitzung wurde eine Probe aus dem Sandbad entnommen und sofort im Eisbad auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Probenaufbereitung erfolgte mit und ohne vorangegangene Totalhydrolyse (siehe Kapitel 2.9.1). Von allen Proben

wurde 1 g für die GC-Analysen und von den Proben nach 30 min, 60 min und 120 min wurde zusätzlich 1 g für die HPLC-ESI-MS Analysen verwendet.

2.8.2.2 Erhitzungsexperimente der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen

Die Einwaagen der synthetisierten nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen wurden entsprechend den in Kapitel 2.8.2.1 verwendeten Mengen der nichtproteinogenen Aminosäuren angepasst (gleiche Stoffmengen der AS). Dem entsprechend wurden 257 mg Fru-Abu, 207 mg Fru-Phg und 238 mg Fru-Nva in 10 mL bidestilliertem Wasser gelöst und zu 200 g Bienenhonig (Probe BH2) zugesetzt. Die Erhitzung und Probennahme erfolgte analog zu Kapitel 2.8.1.1. Von allen Proben wurde 1 g für die GC-Analysen verwendet. Die Probenaufbereitung erfolgte mit und ohne vorangegangene Totalhydrolyse (siehe Kapitel 2.9.1).

2.9 *Probenaufbereitung*

2.9.1 Proben für GC-SIM-MS Analysen

Die Isolierung mittels Kationenaustausch und Derivatisierung der in diesem Kapitel beschriebenen Aminosäuren erfolgte, jeweils modifiziert auf die einzelnen Proben, nach einem Protokoll von PÄTZOLD und BRÜCKNER et al. (2009).

2.9.1.1 Probenaufbereitung mittels Kationenaustauscher

In eine Pasteurpipette (Säulendimension: Höhe = ca. 23 cm; Ø = 0,5 cm) wurde ein Filter aus Glaswolle eingebracht und mit dem verwendeten Austauschermaterial (DOWEX® 50W X8-400) bis zu einer Säulenhöhe von 6-8 cm gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit bidestilliertem Wasser neutral gewaschen. Die nach den Kapiteln 2.9.1.5 bis 2.9.1.7 hergestellten Probenlösungen wurden vollständig auf die Säule gebracht und der Kationenaustauscher anschließend mit bidestilliertem Wasser wieder neutral gewaschen. Die am Ionenaustauscher adsorbierten

Aminosäuren wurden mit 4 mL einer 4 M Ammoniaklösung in einen Spitzkolben eluiert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40 °C bis zur Trockne eingeengt. Nach Zugabe von 1 mL 0,1 M HCl wurde der Inhalt des Spitzkolbens in ein Reacti-Vial überführt und bei 70 °C unter Verwendung von Stickstoff technischer Qualität (*Messer-Griesheim, D-47793*) eingeengt.

2.9.1.2 Derivatisierung der Aminosäuren für die Gaschromatographie

Im ersten Schritt der Derivatisierung wurde die Carboxylgruppe der Aminosäure mit einem Alkohol verestert. Hierzu wurden die Proben mit 500 µL des jeweils für die unterschiedlichen Proben (siehe Kapitel 2.9.1.5 bis 2.9.1.7) verwendeten Alkohol/HCl Gemisches und 10 µL BHT-Lösung, das als Antioxidans fungiert, versetzt und 1 h bei 100 °C im Heizblock belassen. Nach dem Abkühlen wurden die Proben bei Raumtemperatur bis zur Trockne eingeengt. Die Veresterung von Alanin mit Methanol ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

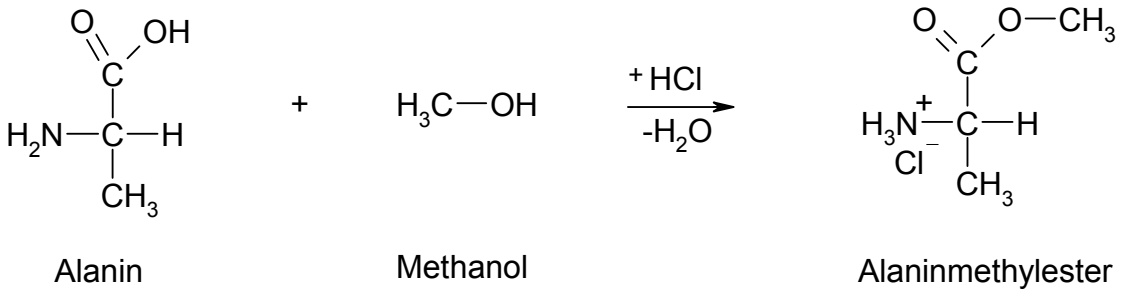
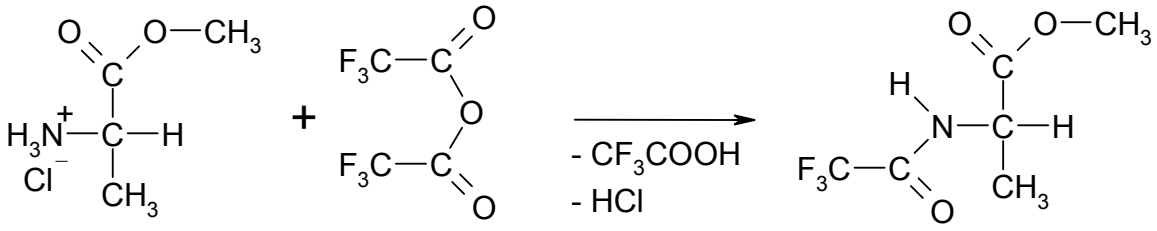


Abb. 2-1 Veresterung von Alanin mit Methanol

Den zweiten Schritt der Derivatisierung stellte die Acylierung der Aminogruppe des entstandenen Aminosäureesters mit einem Säureanhydrid dar. Dafür wurden 50 µL Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und 300 µL Dichlormethan zur veresterten Probe pipettiert und für weitere 20 min bei 100 °C im Heizblock erhitzt. Die zwischen TFAA und der Aminogruppe ablaufende Reaktion ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Nach dem Abkühlen wurde die Probe erneut bei Raumtemperatur unter Stickstoffstrom eingeengt. Zur vollständigen Entfernung noch verbliebener Säureanhydride wurde die eingeengte Probe dreimal in jeweils 100 µL Dichlormethan gelöst und erneut bis zur Trockne eingeengt. Die aus dieser Derivatisierung entstandene flüchtige Probe wurde in einer für die entsprechenden Proben definierten Menge an Dichlormethan

aufgenommen (100 µL zur Bestimmung der freien AS in den Kaffee-Proben (Kapitel 2.9.1.5); 100 µL zur Bestimmung der proteinogenen AS nach den Erhitzungsexperimenten (Kapitel 2.9.1.7); 300 µL zur Bestimmung der freien AS im Honig (Kapitel 2.9.1.6); 300 µL zur Bestimmung der nichtproteinogenen AS im Honig nach den Erhitzungsexperimenten (Kapitel 2.9.1.7)) und ein Aliquot von 0,5-1 µL in den entsprechenden Gaschromatographen injiziert.



Alaninmethylester TFAA Trifluoracetylmethylester

Abb. 2-2 Acylierung von Alaninmethylester mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA)

Die durchgeführte Derivatisierungsmethode im sauren Bereich führte zu einer Konversion von Asparagin (Asn) und Glutamin (Gln) zu Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu), weshalb die beiden detektierten Enantiomerenpaare mit Asx und Glx bezeichnet werden. Eine Trennung der Enantiomere der AS Histidin, Arginin, Tryptophan und Cystein ist mittels der verwendeten Methode nicht möglich.

2.9.1.3 Überprüfung der Probenaufbereitung

Die Überprüfung der Probenaufbereitung erfolgte durch die in Kapitel 2.9.1.1 beschriebenen Bedingungen der Isolierung der Proben mittels Kationenaustauscher. Das bei dieser Aufbereitung anfallende Waschwasser wurde aufgefangen und auf einen Durchbruch der Aminosäuren überprüft. Hierzu wurde das Waschwasser erneut durch den Kationenaustauscher aufbereitet und anschließend nach den in Kapitel 2.9.1.2 beschriebenen Bedingungen derivatisiert.

2.9.1.4 Totalhydrolyse der Amadori-Verbindungen

Die Totalhydrolysen wurden modifiziert nach den in der Literatur üblicherweise verwendeten Methoden durchgeführt (beispielsweise LIARDON et al. 1981; WETTENGEL et al. 1987).

Zur Totalhydrolyse wurden die proteinogenen AS nach der jeweiligen Erhitzung mit 500 µL 6 M HCl versetzt und die nichtproteinogenen AS (ca. 1 g der Honigmatrix) mit 4 mL 6 M HCl versetzt. Beide Ansätze wurden jeweils für 18 h bei 100 °C im Heizblock erhitzt. Nach den 18 h wurden die Proben abgekühlt und bei 70 – 80 °C unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt.

Die proteinogenen Amadori-Verbindungen wurden direkt nach der in Kapitel 2.9.1.7 beschriebenen Methode weiterverarbeitet.

Die nichtproteinogenen AS in der Honigmatrix wurden zunächst mit 4 mL 0,1 M HCl versetzt, 10 min mittels Ultraschall behandelt und anschließend in ein Pyrexröhrchen überführt. Die Probe wurde 15 min bei 3500 U/min zentrifugiert und der Überstand in einen Spitzkolben überführt. Das Pellet im Pyrexröhrchen wurde mit 1 mL 0,1 M HCl ausgewaschen, nochmals zentrifugiert und der Überstand in den Spitzkolben überführt. Dieses Verfahren wiederholte sich noch zwei weitere Male. Im Anschluss wurden die im Spitzkolben vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer unter Vakuum im Eisbad eingeengt, mit 1 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Zum Spülen des Spitzkolbens wurde erneut 1 mL bidestilliertes Wassers zugegeben und ebenfalls in das Reagenzglas überführt. Anschließend wurde der pH-Wert der Probe mit 0,1 M HCl auf 2,3 eingestellt und wie in Kapitel 2.9.1.7 beschrieben weiter verfahren.

2.9.1.5 Chirale GC-SIM-MS Analyse der freien Aminosäuren von verschiedenen Kaffeeprodukten

Eine definierte Menge an Probenmaterial (1 g) wurde in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Zum Entfetten wurde die Probe in 4 mL Petrolether suspendiert, 15 min bei 3500 U/min zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Vorgang wurde

noch zwei weitere Male wiederholt. Der Rückstand wurde in 3 mL 0,1 M HCl aufgenommen und 20 min im Ultraschallbad belassen, anschließend wurde die Probe bei 3500 U/min 15 min zentrifugiert und der Überstand in einen Spitzkolben überführt. Dieses Verfahren wiederholte sich zwei weitere Male. Im Anschluss wurden die im Spitzkolben vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei einer Temperatur von 40 ºC eingeengt und in 2 mL 0,1 M HCl gelöst. Von diesem Probenvolumen wurden 100 µL entnommen und mit 2 mL bidestilliertem Wasser sowie mit 20 µL 10 mM L-Norleucin (Nle) Lösung als internem Standard versetzt. Der pH-Wert dieser hergestellten Probelösung wurde mit 0,1 M HCl auf pH 2,3 eingestellt und die freien Aminosäurenenantiomere durch Kationenaustausch an Dowex 50 WX8 - 400 isoliert. Es folgte deren Bestimmung mittels Veresterung mit 1-Propanol/HCl, gefolgt von Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan und chiraler Kapillargaschromatographie an Chirasil®-L-Val mittels Selected Ion Monitoring Massenspektrometrie (GC-SIM-MS) unter Verwendung des Gaschromatographen 1 (vgl. Kapitel 2.1.1).

Tabelle 2-10 zeigt die charakteristischen Massenfragmente (*m/z*) der Trifluorpropionyl-Derivate der Enantiomerenpaare mit den Zeitfenstern (Ionsets) gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val.

Tab. 2-10 Zeitfenster [min] und Massenfragmente [*m/z*] der Trifluorpropionyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val (Gaschromatograph 1) zur Bestimmung der freien AS in Kaffeeprodukten; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1 und 2.9.1.5

NR.	Zeitfenster [min]	Aminosäure	Massenfragment [*m/z*]
1	6.50 – 13.20	DL-Ala	140, 141
		DL-Val	153, 168, 169
		DL-Thr	152, 153
		Gly	126, 127
2	13.20 – 21.00	DL-Ile	153, 171, 182, 183
		DL-Ser	138, 139
		DL-Leu	140, 182, 183
		DL-Pro	166
		L-Nle	114, 140, 182
3	21.00 – 32.00	GABA	126, 153, 182
		DL-Asp	139, 166, 184, 212
		DL-Met	153, 171, 213
		DL-Phe	91, 148, 190
		DL-Glu	153, 180, 198
4	32.00 – 41.00	DL-Tyr	203, 260
		DL-Orn	166
		DL-Lys	180

2.9.1.6 Chirale GC-SIM-MS Analyse der freien Aminosäuren von Honigen

Ein Aliquot von jedem Bienenhonig (1 g) wurde in 10 mL bidestilliertem Wasser gelöst und mit 30 µL 10 mM L-Nle Lösung als internen Standard versetzt. Der pH-Wert wurde mittels 0,1 M HCl auf pH 2,3 eingestellt. Nach Isolierung der freien Aminosäuren mittels Kationenaustausch an Dowex 50 WX8 – 400 wurden die AS in flüchtige *N*(*O*)-Trifluoressigsäure-2-Propyl Ester mittels Veresterung mit 2-Propanol/HCl, gefolgt von Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan überführt. Tabelle 2-11 zeigt die charakteristischen Massenfragmente (*m/z*) der Trifluorpropionyl-Derivate der Enantiomerenpaare mit den Zeitfenstern (Ionsets) gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val unter Verwendung des Gaschromatographen 1 (vgl. Kapitel 2.1.1).

Tab. 2-11 Zeitfenster [min] und Massenfragmente [*m/z*] der Trifluorpropionyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val (Gaschromatograph 1) zur Bestimmung der freien AS in Honig; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1 und 2.9.1.6

NR.	Zeitfenster [min]	Aminosäure	Massenfragment [*m/z*]
1	6.00 – 12.00	DL-Ala	140, 141
		DL-Val	153, 168, 169
		DL-Thr	152, 153
		Gly	126, 127
2	12.00 – 17.50	DL-Ile	153, 182
		DL-Ser	138, 139
		DL-Leu	140, 182, 183
		DL-Pro	166
3	17.50 – 18.50	L-Nle	114, 126, 140, 182
4	19.00 – 22.00	Gaba	126, 154, 182
5	22.00 – 25.50	DL-Asp	139, 184, 212
6	25.50 – 28.50	DL-Met	153, 171, 213, 287
7	28.50 – 30.50	DL-Phe	91, 148
		DL-Glu	152, 180, 198
8	30.50 – 32.50	DL-Tyr	203, 260
	32.50 – 37.00	DL-Orn	166
		DL-Lys	180

2.9.1.7 Chirale GC-SIM-MS Analyse der proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren nach den Erhitzungsexperimenten

Zur Analyse der freien AS wurden die nach Kapitel 2.8 verarbeiteten Proben zum einen direkt mittels Kationenaustausch bearbeitet, und zum anderen wurde zur Analyse der freien und gebundenen AS erst nach vorhergehender Totalhydrolyse die Isolierung mittels Kationenaustausch durchgeführt.

Proteinogene Aminosäuren: Zur Analyse der freien AS wurden die nach Kapitel 2.8.1 erhitzten Proben in 1 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Zum Spülen des Reacti-Vials wurde erneut 1 mL bidestilliertes Wassers zugegeben und ebenfalls in das Reagenzglas überführt. Anschließend wurde der pH-Wert der Probe mit 0,1 M HCl auf 2,3 eingestellt. Die

enantioselektive Trennung der proteinogenen AS Ala und Pro wurde mittels chiraler Kapillargaschromatographie an FS-LIPODEX® E durchgeführt. Zuvor erfolgte die Isolierung mittels Kationenaustausch an DOWEX® 50W X8 - 400 und anschließender Derivatisierung mit Methanol/HCl, gefolgt von Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan. Die Analyse erfolgte mittels Selected Ion Monitoring Massenspektrometrie (GC-SIM-MS). Tabelle 2-12 zeigt die charakteristischen Massenfragmente (*m/z*) der Trifluormethyl-Derivate der Aminosäuren-Enantiomerenpaare mit den zugehörigen Zeitfenstern (Ionsets) gemäß ihrer Elutionsfolge auf FS-LIPODEX® E unter Verwendung des Gaschromatographen 2 (vgl. Kapitel 2.1.1).

Tab. 2-12 Zeitfenster [min] und Massenfragmente [*m/z*] der Trifluormethyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf FS-LIPODEX® E (Gaschromatograph 2) zur Bestimmung der freien AS nach Erhitzungsexperimenten; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1, 2.8.1 und 2.9.1.7

NR.	Zeitfenster [min]	Aminosäure	Massenfragment [*m/z*]
1	04.00 – 16.00	DL-Val	114, 153, 168
		DL-Ala	140, 141
		DL-Ile	126, 153, 182
		DL-Leu	140, 153, 182
		Gly	88, 126
		L-Nle	114, 126, 153, 182
2	16.00 – 21.00	DL-Thr	141, 152, 153
		DL-Ser	118, 138, 139
3	21.00 – 30.00	DL-Pro	166, 167
		DL-Asp	85, 156, 198
		DL-Glu	82, 152, 180
		DL-Met	125, 153, 185
		Gaba	88, 112, 126
		DL-Phe	91, 162
4	30.00 – 38.00	DL-Orn	126, 166
		DL-Lys	180

Zur Analyse der freien und gebundenen AS wurden die erhitzen Proben zunächst direkt einer Totalhydrolyse (siehe Kapitel 2.9.1.4) unterzogen und anschließend analog der freien AS behandelt.

Nichtproteinogene Aminosäuren: Zur Analyse der freien AS wurde ein Aliquot (ca. 1 g) von den nach Kapitel 2.8.2 erhitzten Proben in 10 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen und mit 60 µL 10 mM L-Nle Lösung als internem Standard versetzt. Der pH-Wert der Probe wurde mit 0,1 M HCl auf 2,3 eingestellt. Die enantioselektive Trennung der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg wurde mittels chiraler Kapillargaschromatographie an Chirasil®-L-Val durchgeführt. Zuvor erfolgte die Isolierung mittels Kationenaustausch an DOWEX® 50W X8-400 und anschließender Derivatisierung mit 2-Propanol/HCl, gefolgt von Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan. Die Analyse erfolgte mittels Selected Ion Monitoring Massenspektrometrie (GC-SIM-MS). Tabelle 2-13 zeigt die charakteristischen Massenfragmente (*m/z*) der Trifluorpropionyl-Derivate der Enantiomerenpaare mit den Zeitfenstern (Ionsets) gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val unter Verwendung des Gaschromatographen 1 (vgl. Kapitel 2.1.1).

Tab. 2-13 Zeitfenster [min] und Massenfragmente [*m/z*] der Trifluorpropionyl-Derivate gemäß ihrer Elutionsfolge auf Chirasil®-L-Val (Gaschromatograph 1) zur Bestimmung der nichtproteinogenen AS nach Erhitzungsexperimenten; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.1, 2.8.2 und 2.9.1.7

NR.	Zeitfenster [min]	Aminosäure	Massenfragment [*m/z*]
1	5.50 – 11.50	DL-Abu	126, 154, 155
2	11.50 – 16.50	DL-Nva	126, 168, 169
3	16.50 – 24.00	L-Nle	114, 126, 140, 182
4	24.00 – 40.00	DL-Phg	202, 203

Zur Analyse der freien und gebundenen AS wurde ein Aliquot (1 g) der Honigproben zunächst einer Totalhydrolyse (siehe Kapitel 2.9.1.4) unterzogen und anschließend analog der freien AS behandelt.

2.9.2 Proben für HPLC-ESI-MS Analysen

2.9.2.1 Isolierung von Amadori-Verbindungen in Honig mittels Festphasenextraktion

Ein Aliquot von jedem Bienenhonig (1 g) wurde in 5 mL bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 2,2 eingestellt. Für die Festphasenextraktion wurden Chromabond SA Kartuschen (Benzolsulfonsäure Kationenaustauscher) von *Macherey-Nagel (Darmstadt; Germany)* verwendet. Die Kartuschen wurden mit 5 mL MeOH, 5 mL MeOH / 0,1 M HCl (1:1, *v*/*v*) und mit 5 mL 0,1 M HCl konditioniert. Anschließend wurden die 5 mL Proben auf die Kartusche gegeben und mit 5 mL bidestilliertem Wasser gewaschen. Die am Ionenaustauscher adsorbierten Amadori-Verbindungen wurden mit 3 mL einer 1 M Ammoniaklösung in einen Spitzkolben eluiert und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40 °C bis zur Trockne eingeengt und anschließend in 1 mL bidestilliertem Wasser gelöst und in ein HPLC-Probengefäß überführt. Die Analyse mittels HPLC-ESI-MS erfolgte analog der in Kapitel 2.7 beschriebenen Methode. Das Injektionsvolumen betrug 15 µL.

2.10 *Spaltungsexperimente mit Aib-Peptiden und nativen Peptaibolen*

2.10.1 Trifluoroacetolyse

Jeweils 1 mg der Proben (vgl. Kapitel 2.3.3; Antiamoebin; Trichotoxin A50/E; Alamethicin F50; Paracelsin A; Ac-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu; Z-$(Aib)_7$-O*t*Bu; Z-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu) wurde in 1 mL MeOH (0,1 %) gelöst und ein Aliquot von jeweils 100 µL in sieben HPLC-Probengläser (32,5 mm x 11,5 mm ID) mit Mikroeinsätzen überführt. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeengt. In jedes Probengefäß wurden 100 µL TFA gegeben und die Proben in einem beheizten Sandbad bei 37 °C für 0,5 h, 1 h, 3 h, 8 h, 15 h, 20 h und 26 h, außer Antiamoebin (nur bis 15 h), fest verschlossen inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Stickstoffstrom eingeengt. Zur vollständigen Entfernung der TFA-Reste wurde zweimal 100 µL Dichlormethan zugegeben und erneut im Stickstoffstrom eingeengt.

2.10.2 Analyse der Spaltungsprodukte mittels HPLC-ESI-MS

Die Analyse erfolgte nach Aufnahme in 100 µL MeOH mittels HPLC (HP 1100 Series; Anlage 1) und ESI-CID-MS. Die verwendete HPLC Säule (Kromasil KR 100-3 C_8; 150 mm x 4.6 mm ID) wurde konstant auf 35 °C gehalten und die Elutionsprofile bei einer Wellenlänge von 205 nm bzw. als sogenannte „total ion currents“ (TIC) im positiven Ionisierungs-Modus (online-ESI-MS) aufgezeichnet. Zur genauen Charakterisierung der Spaltungsprodukte wurden die Elutionsprofile bei 0 % und 45 % relativer „Collision-Energy“ detektiert (CID-MS).
Das zur Trennung verwendete Gradientenprogramm ist in Tabelle 2-14 dargestellt. Das Injektionsvolumen betrug 15 µL. Jedes Experiment wurde mindestens doppelt durchgeführt.

Tab. 2-14 Gradientenprogramm zur massenspektrometrischen Analyse (HP 1100 Series; Anlage 1) der Spaltungsprodukte der Aib-Peptide und nativen Peptaibole nach Trifluoroacetolyse

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.8
5	100	0	0.8
45	50	50	0.8
65	0	100	0.8
75	0	100	1
76	100	0	1
85	100	0	1

Eluent A: MeOH/ MeCN/ H_2O (32:32:36)**; Eluent B:** MeOH/ MeCN (50:50)**;** beide Eluenten wurden mit TFA (0,1%) angesäuert

2.11 *Methodenvalidierungen und mathematische Grundlagen der Auswertung*

2.11.1 Statistische Berechnungen

Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden nach folgenden Gleichungen berechnet:

Arithmetisches Mittel (Mittelwert) : $\overline{X} = \frac{1}{n}\sum_{1}^{n} Xi$

Standardabweichung (Streuung): $S = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{1}^{n} (Xi - \overline{X})^2}$

Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) [%]: $VK = \frac{S}{\overline{X}} * 100$

n **=** *Anzahl der Messwerte*

x_i **=** *Ergebnis der einzelnen Messwerte*

2.11.2 Retentionsfaktoren der Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 mit einer Schichtdicke von 0,2 mm verwendet.

Die Retentionsfaktoren R_f wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

$$R_f = \frac{b}{a}$$

a **=** *Laufmittelfront*

b **=** *Substanz*

2.11.3 Validierung GC-MS

2.11.3.1 Responsefaktoren

Für die Methodenvalidierungen wurden die nach Kapitel 2.5.3 hergestellten Standard-Lösungen verwendet. Die zu bestimmenden Standardlösungen wurden wie in Kapitel 2.9.1.1 und 2.9.1.2 aufgearbeitet und gaschromatographisch analysiert. Die jeweiligen Standardlösungen wurden fünfmal aufgearbeitet und innerhalb kürzester Zeit nach Ablauf des Programms nacheinander in den verwendeten GC je zweimal injiziert. Die detektierten Peaks wurden mittels der Auswertungssoftware integriert. Anhand der ermittelten Fläche der einzelnen Peaks wurden die Responsefaktoren nach folgender Gleichung bestimmt:

Responsefaktor:

$$f_R = A_{AS} / A_{IS}$$

f_R = Responsefaktor
A_{AS} = Peakfläche der Aminosäuren
A_{IS} = Summe der Fläche der einzelnen Massenfragmente, bzw. Ionenspuren (TIC) des internen Standards (Nle)

Aus den Doppelbestimmungen der Standardlösungen wurde jeweils der Mittelwert der Responsefaktoren gebildet. Anschließend wurde die Standardabweichung aus den Mittelwerten der Doppelbestimmung der fünf aufgearbeiteten Proben bestimmt. Diese ist charakteristisch für die Wiederholbarkeit der Messergebnisse und sollte unter 15 % liegen (vgl. Tabellen A-4 bis A-7).

2.11.3.2 Berechnung der absoluten und relativen AS-Gehalte

Jede untersuchte Probe wurde mindestens doppelt aufbereitet und unabhängig voneinander gaschromatographisch analysiert. Der Aminosäuregehalt im untersuchten Probenmaterial wurde unter Beachtung des Probenvolumens und der Einwaage berechnet. Dabei wurde jede aufbereitete Probe zweimal in den GC

injiziert. Aus den Mittelwerten der Doppelinjektion wurde das arithmetische Mittel der aufbereiteten Proben bestimmt. Dieser Wert entsprach dem Aminosäuregehalt der analysierten Probe.
Die Berechnung der Gehalte erfolgte anhand der nachfolgenden Gleichungen.

Relativer Aminosäuregehalt:

$$\%D = A_D / (A_L + A_D) * 100$$

%D = *relativer Anteil an D-AS* [%]
A_L = *Fläche des L-Enantiomers*
A_D = *Fläche des D-Enantiomers*

Absoluter Aminosäuregehalt:

$$m_{AS} / g\ Probe = 1 / f_R * (A_{AS} / A_{IS}) * n_{IS} * (MW / m) * V_f$$

m_{AS} = *Masse AS* [g]
f_R = *Responsefaktor des jeweiligen AS-Standards (TIC)*
A_{AS} = *Peakfläche des TICs oder der entsprechenden Ionenspur der jeweiligen AS*
A_{IS} = *Peakfläche des TICs des internen Standards (Nle) in der Probe*
n_{IS} = *Stoffmenge des zur Probe zugesetzten internen Standards* [mol]
MW = *Molekulargewicht des jeweiligen Standard bzw. der AS* [g/mol]
m = *Einwaage der Probe* [g]
V_f = *Verdünnungsfaktor*

Um die Wiederholbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen wurde, jeweils aus den Werten der Doppelinjektion der mehrfachen Probenaufbereitung das arithmetische Mittel gebildet. Die Abweichung der berechneten arithmetischen Mittelwerte voneinander sollte unter 15 % betragen. Nur die ermittelten Aminosäuren, die auch dieses Kriterium erfüllten, wurden bei der Ergebnisangabe berücksichtigt.

2.11.4 Validierung HPLC-ESI-MS

Die Quantifizierung der Amadori-Verbindungen in den Realproben erfolgte anhand einer externen Fünf-Punkte-Kalibrierung. Diese wurde mittels der synthetisierten Amadori-Verbindungen durchgeführt. Hierzu wurden aus jeder Einzelsubstanz Standardlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (siehe Kapitel 2.5.3.3). Um mögliche Verluste bei der Probenaufbereitungsmethode auszugleichen, wurde jede Lösung zunächst über die zur Probenaufbereitung verwendete Festphasenkartusche (vgl. Kapitel 2.9.2.1) gegeben. Anschließend wurde jede Standardlösung zweimal in das chromatographische System injiziert (Injektionsvolumen: 15 µL). Für die Fünf-Punkte-Kalibrierung wurde der Konzentrationsbereich zwischen 20 mg/L und 500 mg/L verwendet. Dabei wurden die Peakflächen im sogenannten „TIC-Modus“ (vgl. Kapitel 2.7.1) analysiert. Die detektierten Signale wurden integriert und die errechneten Peakflächen der Substanzsignale gemittelt. Diese Werte dienten zur Berechnung der Kalibierfunktionen. In Abbildung 2-3 ist beispielhaft die Kalibrierfunktion mit dem Bestimmtheitsmaß r^2 der Amadori-Verbindung Fru-L-Ala abgebildet.

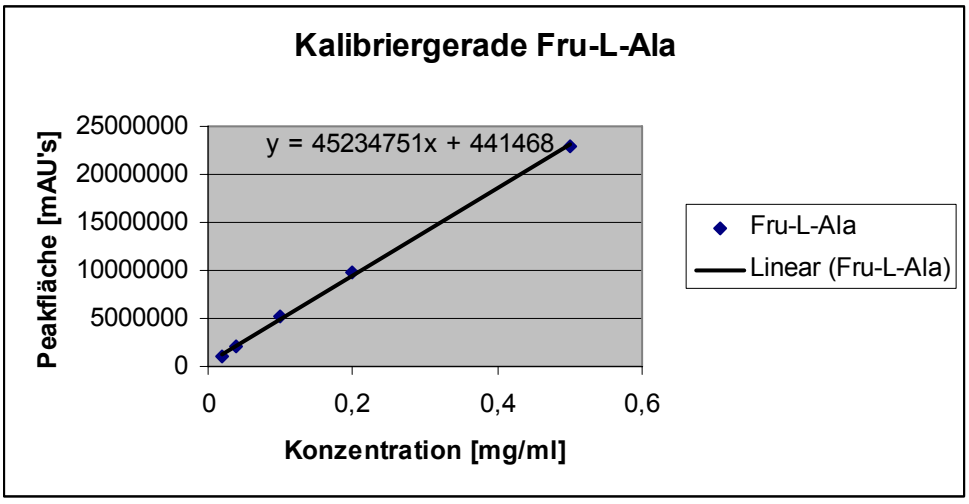


Abb. 2-3 **Zusammenhang zwischen Peakfläche (y in [mAU*s]) und Fru-L-Ala Konzentration (x in [mg/ml]), sowie der daraus resultierenden Kalibrierfunktion y = 45234751 x + 441468; Bestimmtheitsmaß r^2 = 0,9988; Bedingungen siehe Kapitel 2.7**

Tabelle 2-15 zeigt die Retentionszeiten, Kalibrierfunktionen (dargestellt in Achsenabschnitt und Steigung) sowie das Bestimmtheitsmaß r^2 der eingesetzten Standardsubstanzen. Das Bestimmtheitsmaß r^2 gibt Auskunft über die Stärke des Zusammenhangs bzw. der Linearität mit 0 = kein Zusammenhang und 1 = vollständiger Zusammenhang (KÖHLER et al. 2007).

Tab. 2-15 Retentionszeiten, Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß r^2 der synthetisierten proteinogenen Amadori-Verbindungen

	Retentionszeit [min]	Steigung	Achsen-abschnitt	Bestimmtheitsmaß r^2
Fru-L-Ala	3,37	45234751	441467	0,9988
Fru-L-Pro	3,96	28949941	-4863	0,9907
Fru-L-Phe	9,67	488897574	176949	0,9977

Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit und Stabilität der entwickelten Methode wurden zusätzlich die relative Standardabweichung (STABW), die Bestimmungs- (LOQ; Limit Of Quantitation) und Nachweisgrenzen (LOD; Limit Of Detection) sowie die Wiederfindungsraten (WF) nach der Festphasenextraktion (vgl. Kapitel 2.9.2.1) der analysierten Referenzsubstanzen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-16 dargestellt.

Tab. 2-16 Relative Standardabweichung, Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) sowie Wiederfindungsraten der synthetisierten proteinogenen Amadori-Verbindungen

	Rel. STABW [%]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	WF [%]
Fru-L-Ala	12,1	4	20	104,5
Fru-L-Pro	12,3	4	20	84,0
Fru-L-Phe	15,5	4	20	91,1

Für die relative Standardabweichung wurden die synthetisierten Amadori-Verbindungen (c = 500 mg/L) (vgl. Kapitel 2.5.3.3) fünfmal jeweils in Doppelbestimmungen analysiert. Zur Bestimmung der Nachweis- und

Quantifizierungsgrenze diente die Annahme, dass sowohl die Peakhöhe als auch die Peakfläche jeweils proportional zur Konzentration im Injektionsvolumen waren. Die Nachweisgrenze wurde als die dreifache Höhe des Basislinienrauschens definiert und die Quantifizierungsgrenze bzw. Detektionsgrenze als die fünffache Höhe des Grundrauschens festgesetzt.

Für die synthetisierten Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala (r^2 = 0,9988), Fru-L-Pro (r^2 = 0,9988) und Fru-L-Phe (r^2 = 0,9988) konnte eine gute Linearität im Konzentrationsbereich zwischen 20 mg/l und 500 mg/l erzielt werden. Die berechneten Standardabweichungen (nach 5 hintereinander injizierten Proben) lagen aber mit Werten von 12,1 bis 15,5 % sehr hoch und auch die bestimmte Nachweisgrenze mit 4 µg/mL zeigte die „Grenze“ des eingesetzten Gerätes (vgl. Kapitel 2.1.3) zur Quantifizierung der Amadori-Verbindungen mittels des verwendeten ESI-MS-Detektors auf. Aufgrund dieser Werte war für dieses Gerät nur eine „semi-quantitative“ Bestimmung der absoluten Gehalte möglich.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 *Chirale Aminosäureanalyse in Röstkaffee mittels Gaschromatographie–Massenspektrometrie*

Abbildung 3-1 zeigt das DL-AS-Standard-Chromatogramm (vgl. Abbildung A-1; L-Standard-Chromatogramm) der chiralen Trennung auf Chirasil®-L-Val der proteinogenen AS (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (vgl. Kapitel 2.9.1.2). Für alle verwendeten AS konnte eine Basislinien-Trennung der jeweiligen Enantiomerenpaare erzielt werden. Die Bedingungen der angewendeten Methode werden in Kapitel 2.9.1.5 gezeigt. Die für die Methodenvalidierung bestimmten Responsefaktoren sind im Anhang (Tabelle A-4) aufgeführt.

In 8 untersuchten Kaffeeproben wurden insgesamt 11 AS, davon 7 Enantiomeren-Paare detektiert. Die AS L-Ala, Gly, L-Asx, L-Phe und L-Glx wurden in allen Proben, die AS L-Val in allen außer Probe K4 und K7, L-Thr in den Proben K2, K3, K5 und K6, die AS L-Leu in allen außer Probe K1, L-Ser in K1, K2, K5 und K6 und die AS L-Orn und L-Tyr nur in Probe K4 detektiert. Die D-Enantiomere der AS Ala, Glx, Asx und Phe konnten in allen untersuchten Proben mit auffällig hohen relativen Gehalten (D-Ala 13,2 bis 32,2 %; D-Asx 21,0 bis 50,7 %, D-Phe 10,5 bis 35,1 %; D-Glx 20,0 bis 42,6 %) nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3-1). Des Weiteren konnte in der Probe K6 die AS D-Leu (26,3 %), in den Proben K1 und K5 die AS D-Ser (24,8 bzw. 25,4 %) und in Probe K4 die AS D-Orn (11,6 %) detektiert werden. Die D-Enantiomere D-Val, D-Thr und D-Tyr konnten in keiner Probe detektiert werden.

Die in allen Proben detektierten D-AS neigen in folgender Reihenfolge zum Racemisieren: D-Asx >> D-Glx > D-Ala > D-Phe.

Die Abbildungen 3-2 und 3-3 zeigen beispielhaft die GC-SIM-MS-Chromatogramme der Proben K7 (Segafredo Intermezzo) und K8 („Kopi Luwak“), die mit TFAA und 1-Propanol derivatisiert wurden.

Die Chromatogramme der Kaffeeproben K1 bis K6 sind im Anhang (Abbildungen A-6 bis A-11) aufgeführt.

Tab. 3-1 Relative D-AS (%D=D/(D+L)*100) Gehalte in verschiedenen Kaffeeproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5

AS	Proben							
	K1	**K2**	**K3**	**K4**	**K5**	**K6**	**K7**	**K8**
D-Ala	27,7	18,7	13,2	25,5	31,5	27,4	30,0	32,2
D-Val	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d.	n.d.	n.d.
D-Thr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d.	n.d.	n.d.
D-Ser	24,8	n.d.	n.d.	n.d.	25,4	n.d.	n.d.	n.d.
D-Leu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	26,3	n.d.	n.d.
D-Asx	48,5	38,5	21,0	36,1	48,9	50,7	32,0	32,1
D-Phe	18,0	10,5	17,4	12,3	17,9	20,3	24,4	35,1
D-Glx	29,8	24,7	36,9	20,0	29,8	36,2	32,4	42,6
D-Orn	n.d.	n.d.	n.d.	11,6	n.d	n.d.	n.d.	n.d.
D-Tyr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: nicht detektiert

Beim Vergleich von Probe K8 („Kopi Luwak“) mit den handelsüblichen Kaffeeproben (vgl. Tabelle 3-1) wurden in nahezu allen Fällen (Ausnahme D-Asx) die höchsten relativen Gehalte an D-Enantiomeren in „Kopi Luwak“ nachgewiesen. In den in dieser Arbeit analysierten Proben unterschied sich die „Katzenkaffeeprobe“ somit merklich in den relativen D-Enantiomerengehalten von den anderen Handelsproben. Ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der gefriergetrockneten Proben (K1, K5) mit der sprühgetrockneten Probe (K4) bzw. den gemahlenen Röstkaffee-Proben (K2, K3, K6, K7) konnte nicht festgestellt werden.

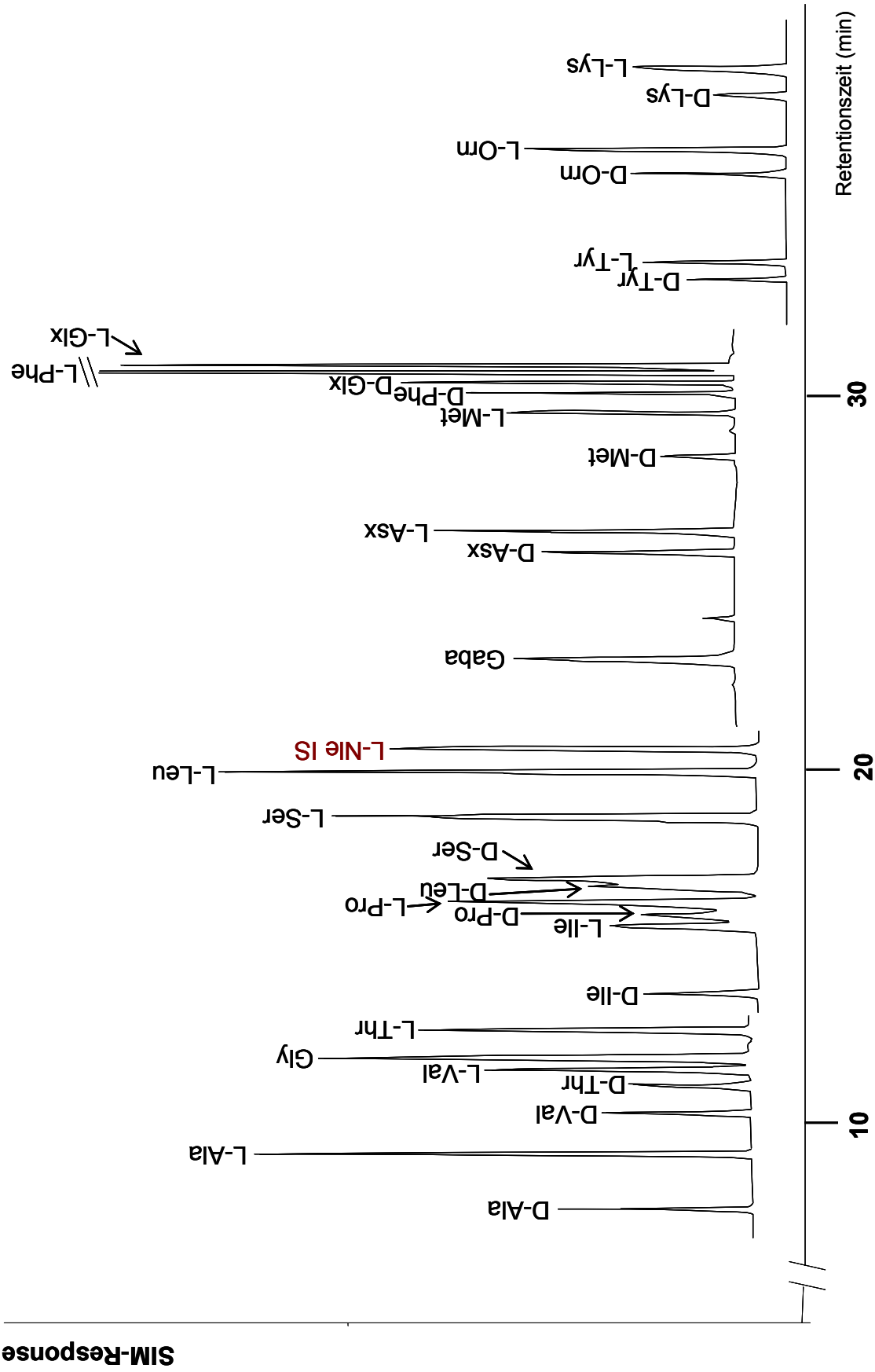


Abb. 3-1 GC-SIM-MS eines DL-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5

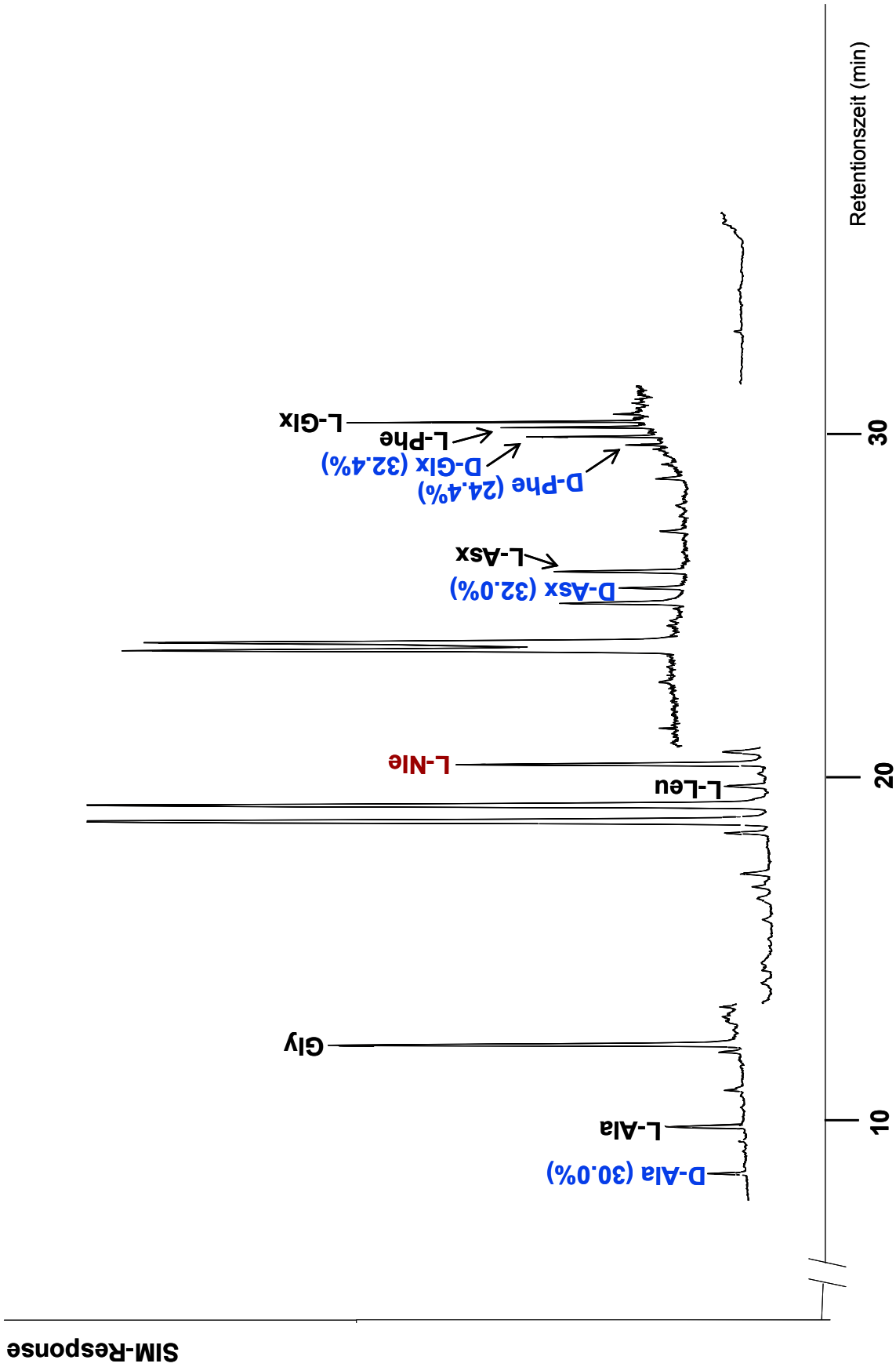


Abb. 3-2 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr.7 (Segafredo Intermezzo) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

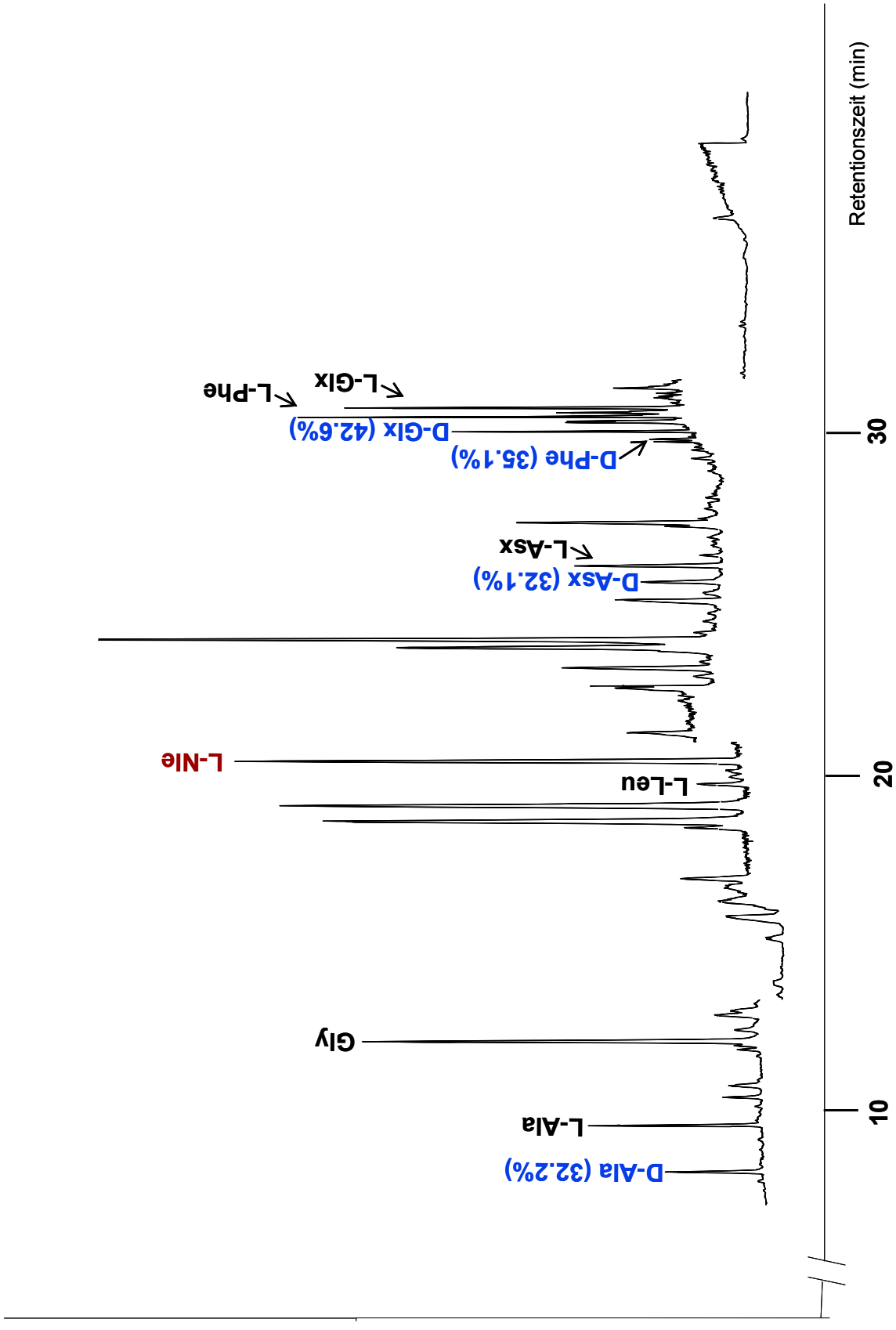


Abb. 3-3 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr.8 (Kopi Luwak) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

3.1.1 Diskussion

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass in zahlreichen Kaffeeproben sowohl freie als auch gebundene D-AS nachzuweisen sind (PALLA et al. 1989; BRÜCKNER und HAUSCH 1989a; NEHRING 1991; NEHRING und MAIER 1992; CASAL et al. 2005). Die dabei detektierten unterschiedlichen Mengen können zum einen durch deren Herkunft (Art, Sorte) und Reifegrad und zum anderen durch die Prozessparameter während der Verarbeitung der Kaffeebohnen erklärt werden. Hierbei spielen beispielsweise die Lagerung, die Fermentation, die Trocknung und die Röstung der Bohnen eine Rolle.

Beim Fermentieren werden die Kaffeefrüchte entweder aufgeschichtet und drei bis vier Tage unter Selbsterhitzung fermentiert oder durch die sogenannte nasse Aufbereitung in wasserdurchströmten Gärbassins 12 bis 48 h fermentiert. Durch kaffeeeigene Enzyme und durch Mikroorganismen wird das Fruchtfleisch aufgelockert und abgebaut. Die Trocknung der vom Fruchtfleisch getrennten Bohnen erfolgt bei Temperaturen zwischen 65 und 85 °C (BELITZ et al. 2008).
Beim Rösten wird die Kaffeebohne bis zu 15 min auf Temperaturen zwischen 100 °C und 260 °C (je nach Prozessbedingungen) erhitzt. Zwischen 180 °C und 200 °C platzen die Bohnen auf und durch die ablaufenden chemischen Reaktionen entfaltet sich das typische Kaffeearoma (BELITZ et al. 2008).
Bei der Herstellung von löslichem Kaffee erfolgt bei der Extraktion des groben Mahlgutes ebenfalls ein Wärmeeintrag von bis zu 190 °C mittels Wasserdampf (STEINHÄUSER et al. 1999). Die Trocknung des Kaffeeextraktes erfolgt durch Gefriertrocknung oder Sprühtrocknung, wobei die Sprühtrocknung auch bei Temperaturen von bis zu 220 °C im Heißluftstrom durchgeführt wird. Die thermische Belastung der Inhaltsstoffe ist demzufolge sehr hoch (GARLOFF et al. 1996).

NEHRING und MAIER (1992) zeigten in einer Studie die Auswirkungen verschiedener Röstbedingungen auf den Gehalt bzw. die Entstehung von D-AS. Die Autoren korrelierten das relative Verhältnis von D- zu L-AS mit der indirekten Bestimmung des organischen Röstverlusts von unbekannten Kaffeeproben.

PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006b) zeigten, dass die Intensität der Röstung von Kakaobohnen eine Steigerung der relativen Gehalte der detektierten D-AS bewirkte. Während die fermentierten Kakaobohnen und die bei relativ geringen Temperaturen gerösteten Bohnen nur geringe Anteile an D-AS (beispielsweise bis zu 3,7 % D-Ala oder 3,4 % D-Ile) enthielten, führten Erhitzungen bei 150 °C über 120 min zu einer deutlichen Steigerung der relativen Anteile der D-Enantiomeren (beispielsweise bis zu 17,5 % D-Ala oder 11,7 % D-Ile). Zudem konnten sie in eigens durchgeführten Erhitzungsversuchen mit Kakaopulver ebenfalls eine Zunahme der relativen Anteile an D-AS feststellen, die von der Erhitzungstemperatur und der Erhitzungszeit beeinflusst wurde. Die absoluten Gehalte an L- und D-AS nahmen im Verlauf dieser Erhitzungsversuche sehr stark ab, was mit einem irreversiblen Abbau der Verbindungen im Zuge der fortschreitenden Maillard-Reaktion erklärt wurde.

Durch die verschiedenen Verarbeitungsprozesse ergeben sich mehrere Möglichkeiten zur Erklärung der D-AS-Gehalte in den Kaffeeproben. Zum einen können diese durch die Mikroorganismen während der Fermentation entstehen bzw. in die Bohnen gelangen (BRÜCKNER und HAUSCH 1989a; FRIEDMAN 1999) und zum anderen können durch die Trocknungsverfahren und vor allem durch die Röstprozesse Maillard-Reaktionen ablaufen und somit eine Bildung der D-AS aus den vorhandenen L-AS zur Folge haben (vgl. Kapitel 1.3.1). Den Einfluss der Röstprozesse zeigten vor allem die Untersuchungen von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006b), die einen deutlichen Anstieg der relativen D-AS in Kakao nach den Röstprozessen detektierten.

Aus chemischer Sicht enthält Kaffee einen Anteil an reduzierenden Zuckern (Fructose, Glucose, Galactose) zwischen 9 und 13 % und einen Anteil an Proteinen bzw. an AS (überwiegend Glu, Asp) von ca. 12 %, die während der Fermentation aus den Proteinen freigesetzt werden (BELITZ et al. 2008). Diese Zusammensetzung ermöglicht den Ablauf der Maillard-Reaktion vor allem während des Röstvorgangs und führt zur Bildung von Amadori-Verbindungen und Heyns-Verbindungen. BRÜCKNER et al. (2002) und PÄTZOLD und BRÜCKNER (2004) postulierten, dass D-AS aus diesen Verbindungen entstehen können. Durch Erhitzungsversuche mit Amadori-Verbindungen zeigten PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006b), dass eine

Enantiomerisierung der in den Amadori-Verbindungen eingesetzten L- bzw. D-AS (beispielsweise D-Phe aus Fru-L-Phe) nach deren Freisetzung stattgefunden hat. Diese Betrachtung kann auch für die in dieser Arbeit analysierten Kaffeeproben vermutet werden. Die detektierten D-AS entstehen überwiegend durch die induzierte Maillard-Reaktion unter Berücksichtigung der Bildung von glykosilierten Verbindungen wie beispielsweise Amadori- bzw. Heyns-Verbindungen (vgl. Kapitel 1.3.1.3).
Auch Studien von CASAL et al. (2005) zeigten, dass bedingt durch die Röstung eine erhebliche Enantiomerisierung der in den Kaffeeproben vorhandenen L-AS zu beobachten war. Die Autoren stellten durch Versuche mit zwei verschiedenen Kaffeesorten (Arabica und Robusta) fest, dass der Anstieg an D-AS während der Röstung als wichtiger Parameter für die Kontrolle des Röstprozesses dienen kann. Die Höhe der Rösttemperatur wirkte sich direkt auf den Racemisierungsgrad aus. Je höher die Rösttemperatur umso höher war der Anteil an racemisierten Aminosäuren. Zudem nahm der Anteil an freien AS während der Röstung, besonders bei Temperaturen über 180 °C, stark ab. Diese Daten zeigen, dass der Grad der Racemisierung direkt mit der durch die Röstung ablaufenden Maillard-Reaktion in Verbindung steht. Zu Beginn der Röstung (bei 140 °C) konnten nur sehr geringe Mengen (<10 %) an D-AS detektiert werden, die im weiteren Verlauf der Röstung stark zunahmen. Bei Temperaturen von 220 °C wurden zum Teil Werte über 50 % relativer Anteil an D-AS bestimmt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit zeigt, dass für die AS Ala, Asx, Phe und Glx in beiden Arbeiten der höchste Anteil an D-Enantiomeren festgestellt wurde. Die Racemisierungswerte in dieser Arbeit entsprechen ca. den Werten von CASAL et al. (2005) bei Rösttemperaturen zwischen 180 °C und 200 °C. Somit kann postuliert werden, dass die in dieser Arbeit detektierten D-AS überwiegend während der Röstung entstanden sind. Die AS Asp zeigte dabei in beiden Arbeiten die höchste Racemisierungsanfälligkeit.

Auf dem Markt sind verschiedene Kaffeesorten erhältlich, die sich zum Teil extrem im Preis unterscheiden. Dies macht eine Authentizitäts- und Qualitätskontrolle nötig. Eine besondere Kaffeespezialität ist z. B. „Kopi Luwak“ der auch als Katzenkaffee bekannt ist (ca. 1000 Euro kostet ein Kilo). Ausgangsmaterial sind die süßen, roten Kaffeekirschen, die der Fleckenmusang (*Paradoxurus hermaphroditus;*

Schleichkatzenart), der auf den indonesischen Inseln Sumatra, Java und Sulawesi lebt, unzerkaut verschlingt und als Bohnen wieder ausscheidet. Die Bohnen werden durch seine Magensäure und mikrobielle Enzyme „veredelt“ bzw. durch Milchsäurebakterien fermentiert und erhalten somit ein einzigartiges Aroma (MARCONE 2004). Vergleichend wurde in dieser Arbeit das aus Indonesien bezogene Kaffeeprodukt „Kopi Luwak“(Sumatra Bukittingi; großer Hügel) mit sieben im Handel erhältlichen Proben (eine gefriergetrocknete, zwei sprühgetrocknete und vier gemahlene Kaffeesorten) analysiert. Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich postulieren, dass die besondere Fermentation dieser Kaffeespezialität zu höheren Gehalten an D-AS führt, als dies bei den handelsüblichen Kaffeesorten der Fall ist. Für eine statistische Aussage sowie eine Authentizitätskontrolle bedarf es allerdings weiterer Analysen mit einer größeren Probenanzahl.

Eine Unterscheidung bezüglich der gefriergetrockneten Proben (K1, K5) mit der sprühgetrockneten Probe (K4) bzw. den gemahlenen Proben (K2, K3, K6, K7) ist durch die detektierten D-AS Muster nicht möglich. CASAL et al. (2003) zeigten, dass verschiedene Kaffeesorten unterschiedliche Zusammensetzungen und auch unterschiedlich hohe Gehalte an L- und D-AS haben. So ergab sich für die verschiedenen Sorten jeweils ein unterschiedliches, charakteristisches Muster. Dies konnte für die Ergebnisse in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die in den analysierten Kaffeeproben detektierten D-AS durch verschiedene Verarbeitungsmethoden entstanden sind. Eine bekannte und in der Literatur gut beschriebene Quelle von D-AS stellen die zur Fermentation verwendeten Mikroorganismen dar (NEHRING 1991). Eine andere Ursache ist die durch die verschiedenen Prozessparameter induzierte Maillard-Reaktion (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006b). Die Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen, dass die in dieser Arbeit und in der angegeben Literatur detektierten D-AS zum größten Teil bedingt durch die Röstung und somit im Zuge der Maillard-Reaktion entstanden sind. Der Fermentationprozess spielt bei der Bildung eher eine untergeordnete Rolle.
Der Entstehungsweg über die Maillard-Reaktion soll im Folgenden anhand weiterer Analysen und Modellversuche verifiziert werden.

3.2 *Synthese, Aufreinigung und Analyse von Amadori-Verbindungen (Fructose-Aminosäuren)*

3.2.1 Synthese der Amadori-Verbindungen

Durch Kombination der verwendeten AS mit D-Glucose wurden die jeweiligen Amadori-Verbindungen modifiziert nach einer Methode von REUTTER und EICHNER (1989) hergestellt. Die nach Kapitel 2.4 vorbereiteten Lösungen wurden unter ständigem Rühren bei 90 °C in einem Ölbad unter Rückflusskühlung erhitzt. Die dabei ablaufende Reaktion ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

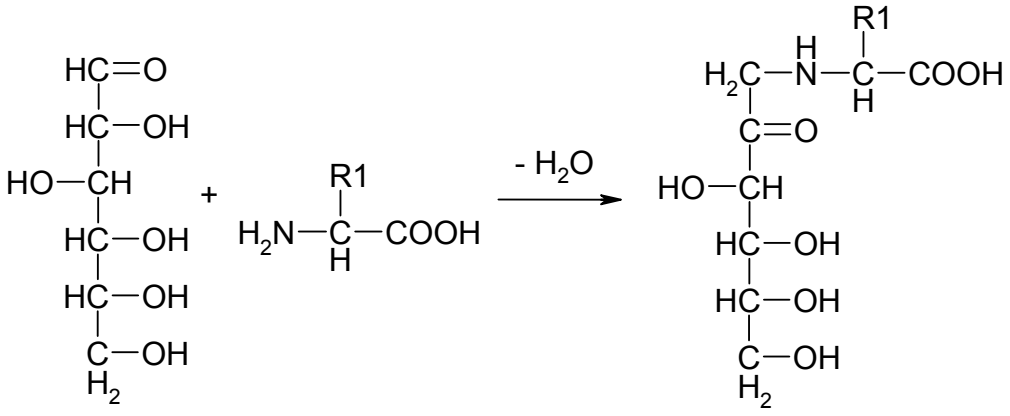


Abb. 3-4 Reaktionsverlauf zur Bildung von Amadori-Verbindungen

Um Folgereaktionen (z. B. Bildung polymerer Verbindungen) der synthetisierten Amadori-Verbindungen zu vermeiden, wurden die Synthesezeiten individuell auf die einzelnen AS angepasst. Abbildung 3-5 zeigt die erstellte HPLC-Reaktionskinetik für die Amadori-Verbindung Fru-Phe. Im Verlauf des Syntheseprozesses werden die Amadori-Verbindungen kontinuierlich aus den Edukten gebildet. Für die Verbindung Fru-Phe konnte ab einer Synthesezeit von 150 min eine Bildung von Folgeprodukten (FP) nachgewiesen werden.

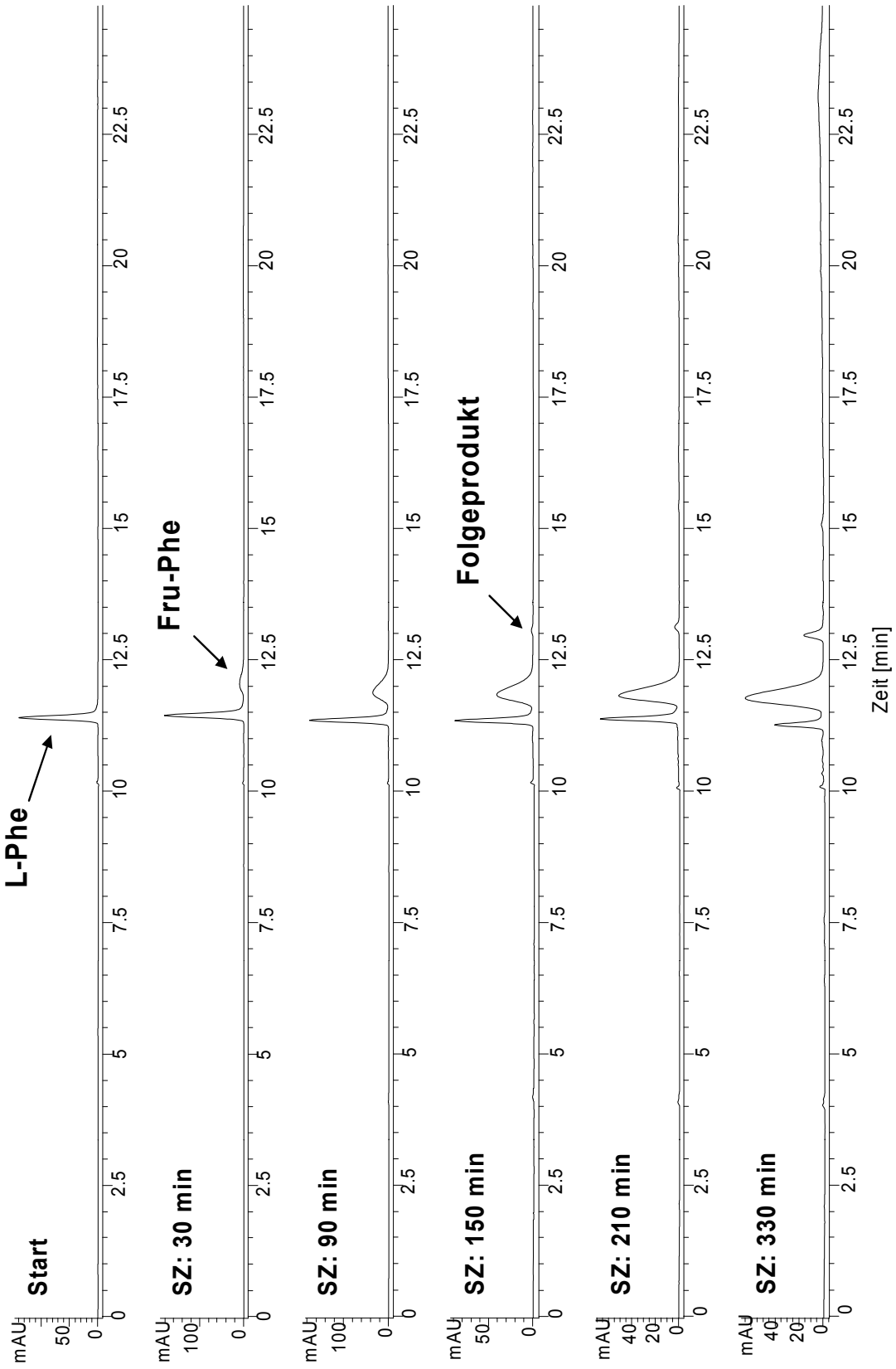


Abb. 3-5 **HPLC-Chromatogramme Syntheseverlauf der Amadori-Verbindung Fru-Phe; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.1 / λ =265 nm**

Tabelle 3-2 zeigt die Auswertung der integrierten Flächen der detektierten Peaks der nach bestimmten Zeiten entnommenen Probenaliquots. Nach 150 min Synthesezeit nahm die Konzentration der Folgeprodukte stark zu, während die Konzentration der Amadori-Komponente nur noch geringfügig zunahm. Die Peakfläche der freien AS verringerte sich nahezu kontinuierlich über den gesamten Synthesezeitraum. Ab einer Synthesezeit von 360 min wurde sowohl die freie AS als auch die Amadori-Verbindung stark abgebaut.

Tab. 3-2 Syntheseverlauf der Amadori-Verbindung Fru-Phe über einen Synthesezeitraum von 360 Minuten/ mAU: milli Absorption Unit (Integrierte Flächen); Synthesebedingungen siehe Kapitel 2.4

Zeit [min]	Fläche L-Phe [mAU]	Fläche Fru-Phe [mAU]	Fläche FP [mAU]
0	1201,3	n.d.	n.d.
30	1124,8	187,1	n.d.
60	1069,5	517,8	n.d.
90	1055,1	775,5	n.d.
120	708,0	731,5	n.d.
150	508,6	780,4	12,8
180	472,4	975,7	21,5
210	365,1	862,0	31,7
240	310,3	929,0	43,6
270	248,6	915,4	50,7
300	198,3	866,4	63,6
330	228,6	1279,4	134,4
360	200,2	1118,8	133,9

FP: Folgeprodukte

Neben den erhaltenen Daten der Kinetik wurde die entstehende Färbung des Reaktionsgemisches ebenfalls als wichtiges Merkmal für die Synthesezeit berücksichtigt. Je dunkler sich das Reaktionsgemisch verfärbte, umso mehr Maillard-Reaktionsprodukte (z. B. Melanoidine) wurden bereits gebildet. Abbildung 3-6 zeigt die auftretende Änderung der Farbe im Verlauf der Synthese.

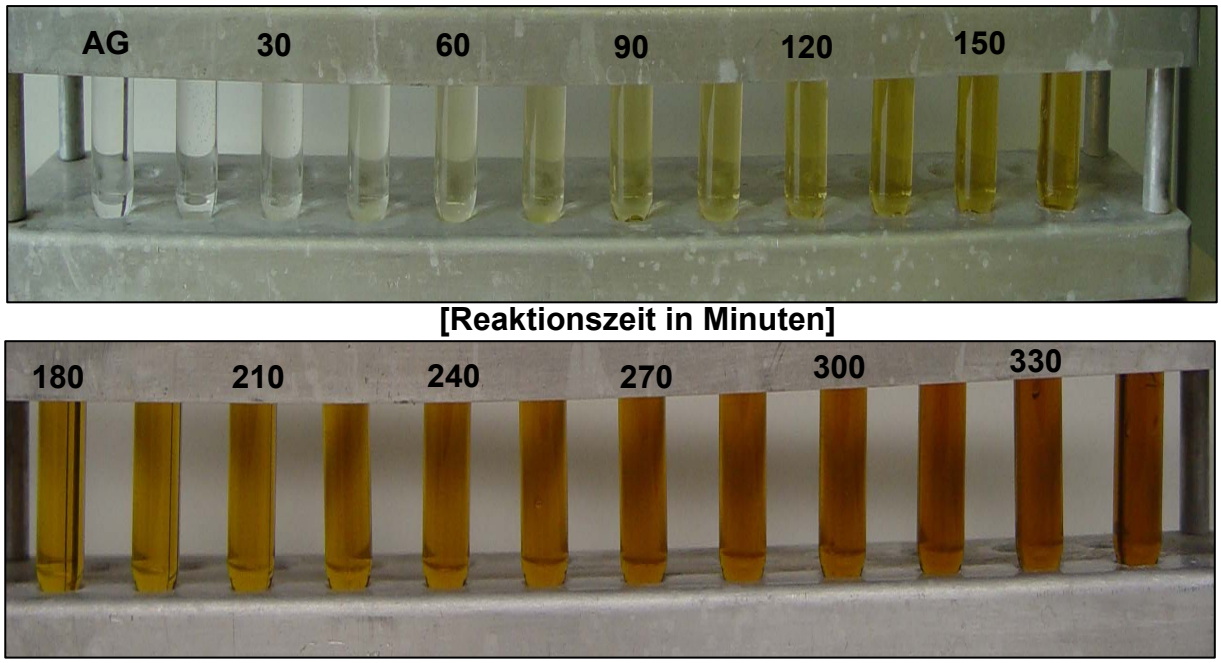


Abb. 3-6 **Farbveränderungen des Reaktionsgemisches während der Synthese von Fru-Phe über einen Synthesezeitraum von 360 Minuten; Synthesebedingungen siehe Kapitel 2.4**

Nach 150 min konnte eine gelb-orange Farbe festgestellt werden, die im weiteren Verlauf ins Bräunliche überging. Aufgrund der Ergebnisse, dass sich ab einer Synthesedauer von 150 min der Anteil der Amadori-Verbindungen nur noch geringfügig erhöhte und die Konzentration der Folgeprodukte stark zunahm, wurde für die Verbindung Fru-Phe eine optimale Synthesedauer von 150 min festgelegt, woraus ein gelb-oranges Reaktionsgemisch resultierte.
Analog wurde diese Kinetikanalyse mit der Verbindung Fru-Ala durchgeführt. Auch bei dieser Verbindung war ein gelb-oranges Endprodukt Indikator für eine optimale Synthesezeit. Die Erkenntnisse wurden auf die anderen Verbindungen übertragen und die Synthesezeiten (vgl. Kapitel 2.4) entsprechend bis zu einer gelb-orangen Färbung des Reaktionsgemisches festgelegt.

Nach der Synthese wurden die Lösungen zur Entfernung polymerer Verbindungen über Aktivkohle filtriert, am Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend gefriergetrocknet. Aus allen synthetisierten Verbindungen bildete sich dabei ein gelbliches Pulver.

3.2.2 Aufreinigung

Für die Verwendung der Amadori-Verbindungen als Standardverbindungen bedarf es einer Aufreinigung der synthetisierten Substanzen. Diese erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde der überschüssige Zucker entfernt und in einem zweiten Schritt wurde die verbliebene freie AS entfernt, die nicht zur Amadori-Verbindung umgesetzte wurde.

3.2.2.1 Entfernung von Glucose

Die Entfernung der im Reaktionsgemisch verbliebenen freien Glucose wurde modifiziert nach einer Methode von STAEMPFLI et al. (1994) mittels präparativer Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Nach Aufgabe des Reaktionsgemisches konnte der überschüssige Anteil an Glucose vollständig aus der Chromatographiesäule gespült werden (vgl. Kapitel 2.6.1). Die am Kationenaustauscher gebundenen Amadori-Verbindungen wurden mit einer 0,2 M Ammoniumhydroxid-Lösung eluiert und anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt. Bei dieser Methode wurden aber auch geringe Anteile der noch freien AS, die ebenfalls am Kationenaustauscher gebunden vorlagen, mit den Amadori-Verbindungen von der Säule eluiert.

3.2.2.2 Methodenentwicklung zur präparativen Entfernung der freien AS mittels DC

Zur Entfernung der noch im Reaktionsgemisch verbliebenen freien AS wurde eine neue Methode mittels präparativer Säulenchromatographie entwickelt. Hierzu wurden zuerst verschiedene Laufmittel auf einer Kieselgel DC-Platte getestet. Zum Testen der verschiedenen Fließmittel wurden sowohl die reinen AS als auch die synthetisierten Amadori-Verbindungen auf die DC-Platte aufgetragen. Die beste Trennleistung wurde mit einer Mischung aus *n*-Butanol, Ameisensäure und bidestilliertem Wasser (75:15:10, *v/v/v*) erzielt. Die weiteren getesteten Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische sowie deren Trennleistung für die proteinogenen AS sind tabellarisch im Anhang (Tabelle A-3) aufgeführt.

Die Visualisierung der freien AS erfolgte mit der Sprühreagenz (S1) Ninhydrin, welche mit dem Stickstoff (*N*) der AS reagierte und in einer rot/violetten Färbung resultierte (die AS Prolin ergab eine hellgelbe Färbung). Die Identifizierung der Amadori-Verbindung wurde sowohl mit der Sprühreagenz S1 (Visualisierung der Amino-Komponente der Amadori-Verbindung) als auch mit Tetrazolblau (S2) durchgeführt, wobei S2 mit der Zuckerkomponente der Amadori-Verbindung reagierte und in einer violetten Färbung resultierte. Abbildung 3-7 zeigt am Beispiel der proteinogenen AS und Amadori-Verbindungen, dass die freien AS im Vergleich zu den synthetisierten Amadori-Verbindungen eine geringere Affinität zur stationären Phase Kieselgel hatten.

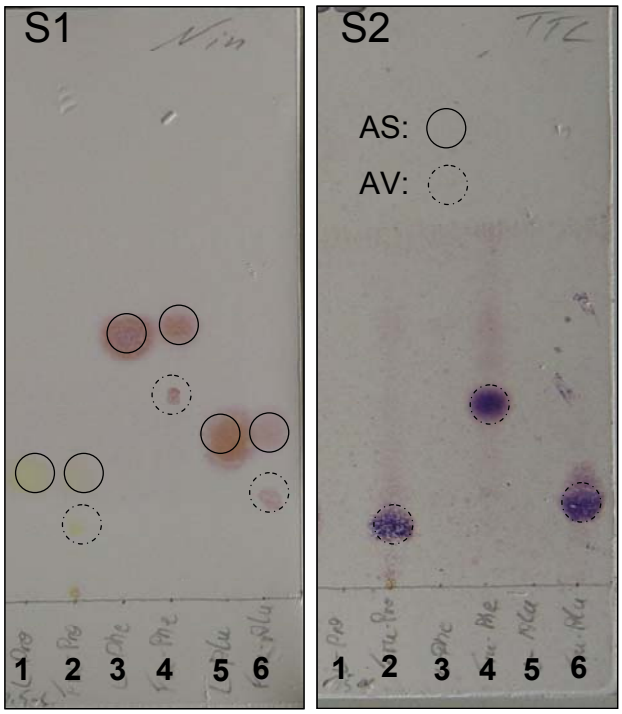


Abb. 3-7 **Dünnschichtchromatographie der proteinogenen AS Prolin, Alanin und Phenylalanin und aus diesen synthetisierten Amadori-Verbindungen; AS: Aminosäuren; AV: Amadori-Verbindungen; S1: Ninhydrin, S2: TZB; 1: L-Pro; 2: Fru-L-Pro; 3: L-Phe; 4: Fru-L-Phe; 5: L-Ala; 6: Fru-L-Ala; Bedingungen siehe Kapitel 2.6.2.1**

Folgende Retentionsfaktoren wurden bei einer Lösungsmittelfront von 8 cm berechnet: L-Pro 0,37; Fru-L-Pro 0,19; L-Ala 0,44; Fru-L-Ala 0,22; L-Phe 0,72; Fru-L-Phe 0,48. Eine durchschnittliche Trennung von ca. 1 cm zwischen der freien

AS und der entsprechenden Amadori-Verbindung wurde bei diesem Chromatographiesystem erreicht. Auch bei den nichtproteinogenen Verbindungen konnten die AS von den synthetisierten Amadori-Verbindungen unter Verwendung der angegebenen Chromatographie-Bedingungen sehr gut getrennt werden (vgl. Abbildung A-2). Folgende Retentionsfaktoren wurden bestimmt: L-Abu 0,66; Fru-L-Abu 0,44; L-Nva 0,83; Fru-L-Nva 0,53; L-Phg 0,73; Fru-L-Phg 0,47.

3.2.2.3 Präparative Aufreinigung mittels Säulenchromatographie

Die Übertragung auf die Säulenchromatographie erfolgte mit dem Laufmittel aus *n*-Butanol, Ameisensäure und bidestilliertem Wasser. Durch die geringere Affinität zur stationären Phase eluierten die freien AS früher als die Amadori-Verbindungen. Die gesammelten Fraktionen des Eluats von je 15 mL wurden mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Die Entwicklung der DC-Platten erfolgte, wie bereits in Kapitel 2.6.2.1 beschrieben, mit den Sprühreagenzien S1 und S2. Fraktionen, die mit beiden Reagenzien positiv reagierten, wurden vereinigt und bei 40 °C am Rotationsverdampfer eingeengt. Zwischen den Fraktionen, in denen die freien AS nachgewiesen werden konnten und denen, die positiv auf Ninhydrin und TZB reagierten und somit die Amadori-Verbindungen enthielten, lagen ca. vier Fraktionen, die nicht positiv auf die zwei Sprühreagenzien reagierten. Die Fraktionen, die sowohl auf Ninhydrin als auch auf TZB positiv reagierten, wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Durch Rückwaage der isolierten Amadori-Verbindungen unter Einbezug der Einwaage (vgl. Kapitel 2.6) konnte für jeden Säulenchromatographie-Durchgang eine Ausbeute zwischen 40 – 45 % (ca. 160 mg) der synthetisierten Amadori-Verbindungen ermittelt werden.

3.2.2.4 Überprüfung der Aufreinigung mittels DC und NMR

Die Reinheit der Verbindungen wurde zum einen mittels Dünnschichtchromatographie und zum anderen mittels NMR-Analysen überprüft. Die Abbildung 3-8 zeigt am Beispiel der Verbindung Fru-L-Ala, dass die freie AS vollständig mittels der durchgeführten Säulenchromatographie entfernt werden konnte.

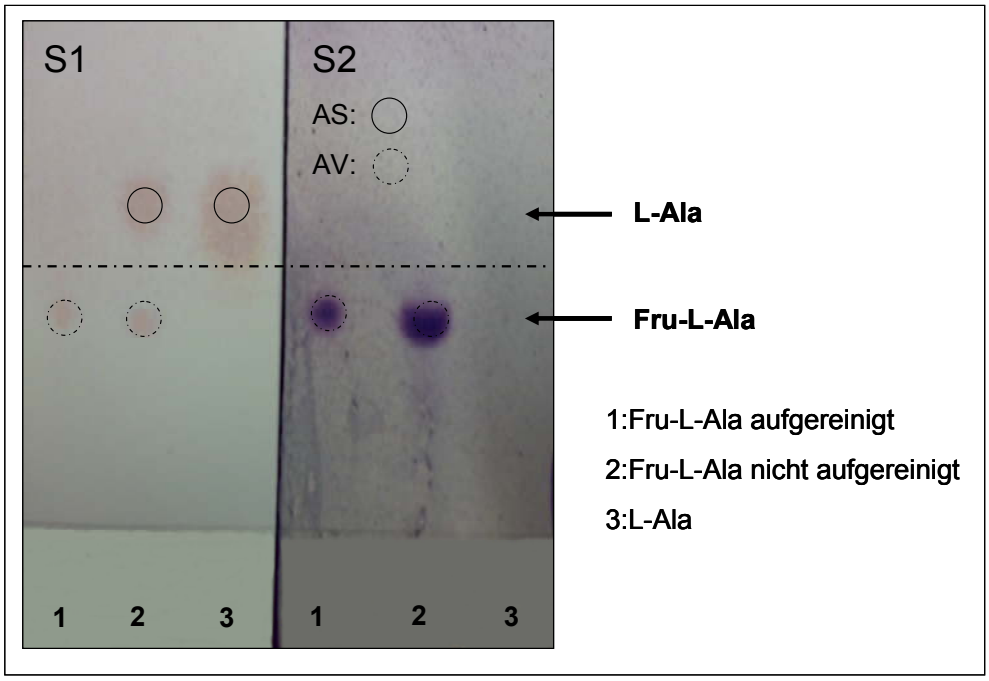


Abb. 3-8 **Überprüfung der Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie der synthetisierten Amadori-Verbindung Fru-L-Ala; AS: Aminosäuren; AV: Amadori-Verbindungen; S1: Ninhydrin, S2: TZB; Bedingungen siehe Kapitel 2.6.2.1**

Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Reinheit ^{1}H und ^{13}C NMR Profile der synthetisierten Amadori-Verbindungen erstellt.

Abbildung 3-9 zeigt die synthetisierten Amadori-Verbindungen in der *β*-Pyranoid-Form (vgl. Kapitel 1.4.3).

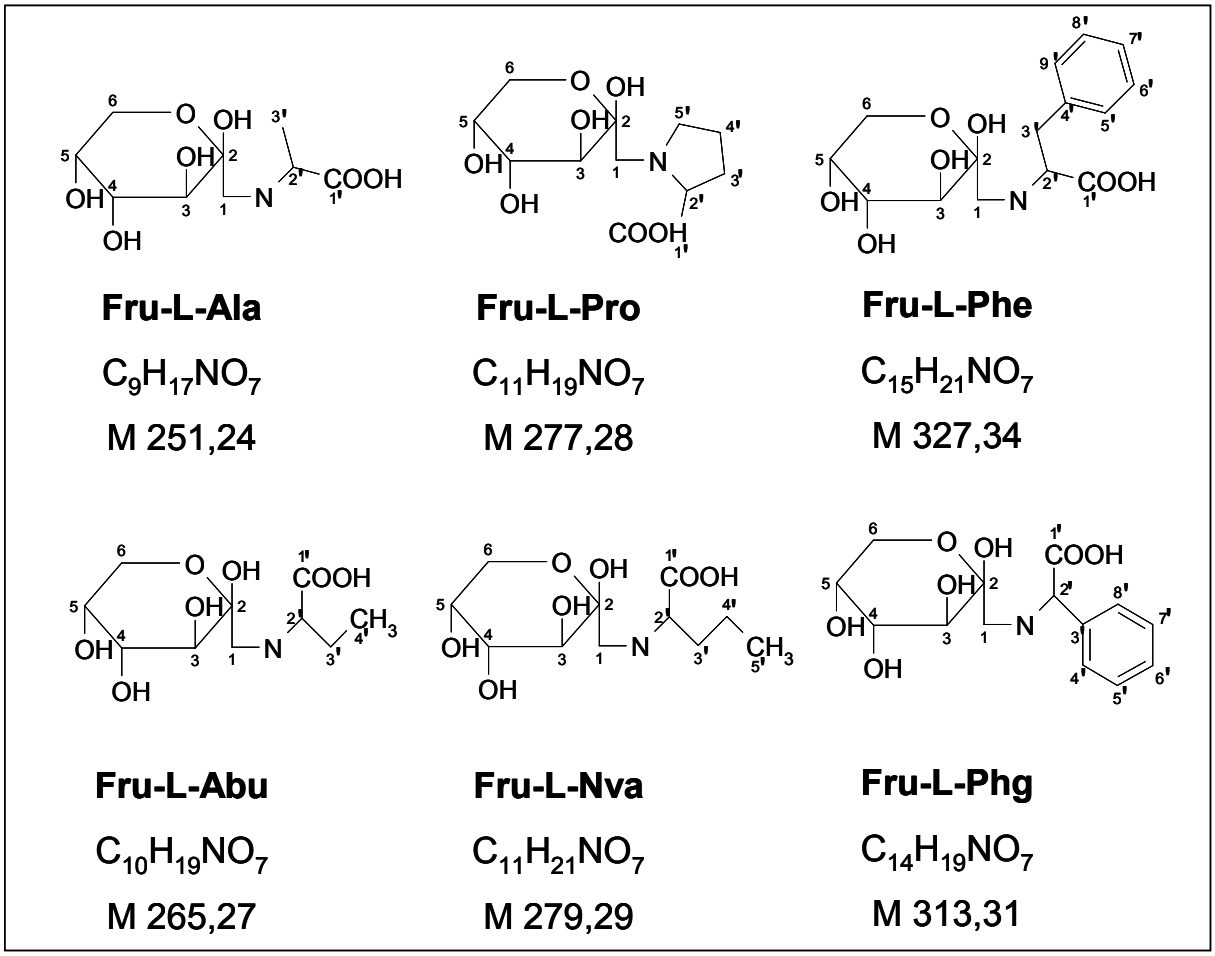


Abb. 3-9 **Struktur der synthetisierten Amadori-Verbindungen mit Summenformel und berechnetem Molekulargewicht; Darstellung in der *β*-Pyranoid Form**

Die Messungen der Amadori-Verbindungen zeigten, dass die Verbindungen in vier Konformeren vorlagen: Eine Hauptverbindung und drei Nebenkomponenten. Die Komponenten ergaben sich durch die *α*- und *β*-Anomere (*α*-D-Fructofuranose, *β*-D-Fructofuranose, *α*-D-Fructopyranose, *β*-D-Fructopyranose) der jeweiligen Ringformen der Fructose, die sich in wässriger Lösung ineinander umwandeln können. In allen analysierten Proben zeigten die Zuckermoleküle der Amadori-Verbindungen ähnliche Ergebnisse. Die Hauptkonfiguration war die *β*-Pyranoid Form, die einen Anteil von > 70 % ausmachte (vgl. ALTENA et al. 1981; RÖPER et. al 1983; MOSSINE et al. 1994). Anhand der Verbindung Fru-L-Abu wurde zusätzlich eine genaue Strukturaufklärung mittels 1D (^{1}H, ^{13}C) und 2D (COSY, TOCSY, HMQC und HMBC) NMR Spektren durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden für die Interpretation der ^{1}H und ^{13}C der anderen synthetisierten Amadori-Verbindungen verwendet. Tabelle 3-3 zeigt die ermittelten Ergebnisse der durchgeführten

Strukturaufklärung der Amadori-Verbindung Fru-L-Abu in der *β*-Fructopyranose Form und Tabelle 3-4 zeigt die detektierten Ergebnisse der entsprechenden Isomeren (*α*-D-Fructofuranose, *β*-D-Fructofuranose, *α*-D-Fructopyranose).

Tab. 3-3 ^{1}H und ^{13}C Strukturaufklärung der AV Fru-L-Abu (Hauptverbindung: *β*-Fructopyranose Isomer (71%))

	^{1}H		HMBC		^{13}C
	δ mult.	J	(H-C)		δ mult
1A CH_2 (H1A)	3.46 d	12.6	Cα, C2, C3	**1-CH_2** (C1)	53.1 t
1B CH_2 (H1B)	3.41 d	12.8	Cα, C2, C3	**2-C** (C2)	95.8 s
3-CH (H3)	3.88 d	10.0	C1, C2, C4	**3-CH** (C3)	70.4 d
4-CH (H4)	4.02 dd	9.8, 3.3	C2, C3, C5, C6	**4-CH** (C4)	69.8 d
5-CH (H5)	4.14 bd	3.3[a]		**5-CH**-C5	69.4 d
6A-CH_2 (H6A)	4.15 bd	12.9[a]	C2, C4, C5	**6-CH_2** (C6)	64.4 t
6B-CH_2 (H6B)	3.89 bd	12.9[a]	C2, C4, C5	**2'-CH** (Cα)	64.4 d
2'-CH (H)	3.85 t	6.0	C1, Cβ, Cγ	**3'-CH_2 (**Cβ)	23.3 t
3'-CH_2 (Hβ)	2.97 m		Cα, Cγ	**4'-CH_3** (Cγ)	9.20 q
4'-CH_3 (Hγ)	1.10 t	7.4	Cα, Cβ	**1'-COOH**	173.6 s s

[a] Vicinale Kopplung J(5-6A) und J(5-6B) sind klein und nicht getrennt

Tab. 3-4 ^{13}C Strukturaufklärung der AV Fru-L-Abu (Nebenverbindungen: *α*-D-Fructofuranose (11%), *β*-D-Fructofuranose (12%), *α*-D-Fructopyranose (5%) Isomere)

	Fructofuranose ^{13}C δ		*α*-Fructopyranose ^{13}C δ
	α	β	
1-CH_2 (C1)	52.2	50.9	56.0
2-C (C2)	102.2	99.3	96.4
3-CH (C3)	83.2[b]	78.5[c]	72.3[d, e]
4-CH (C4)	76.6	74.6[c]	70.8[d, e]
5-CH-C5	82.9[b]	81.5	[d, e]
6-CH_2 (C6)	62.3	61.4	63.1
2'-CH (Cα)	64.3		66.0
3'-CH_2 (Cβ)	23.1		24.1
4'-CH_3 (Cγ)	9.33		9.2
1'-COOH	173.6		173.6

[b, c, d] Zuordnung ist austauschbar in vertikaler Säule. [e] Nur zwei Signale wurden detektiert. Das dritte Signal überschneidet sich vermutlich mit einen Signal der anderen Isomere

Die Ergebnisse der AV Fru-L-Ala, Fru-L-Pro, Fru-L-Phe, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg wurden wie folgt bestimmt:

Tabelle 3-5 zeigt die ermittelten Ergebnisse der ^{1}H Spektren und Tabelle 3-6 die Ergebnisse der ^{13}C NMR Analysen.

Tab. 3-5 ^{1}H Strukturaufklärung der AV Fru-L-Ala, Fru-L-Pro, Fru-L-Phe, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg (Hauptverbindung: *β*-Fructopyranose Isomer)

^{1}H	Fru-L-Ala δ mult.	Fru-L-Pro δ mult.	Fru-L-Phe δ mult.	Fru-L-Nva δ mult.	Fru-L-Phg δ mult.
1A CH_2 (H1A)	3,51 d	3,45 d	3,51 d	3,56 d	3,61 d
1B CH_2 (H1B)	3,46 d	3,38 d	3,45 d	3,51 d	3,58 d
3-CH (H3)	3,87 d	3,81 d	3,81 d	3,74 d	3,75 d
4-CH (H4)	3,95 dd	3,94 dd	3,94 dd	3,82 dd	3,84 dd
5-CH (H5)	4,05 bd	4,00 bd	4,02 bd	3,97 bd	3,99 bd
6A-CH_2 (H6A)	4,11 bd	4,02 bd	4,05 bd	4,11 bd	4,10 bd
6B-CH_2 (H6B)	3,89 bd	3,87 bd	3,88 bd	3,88 bd	3,87 bd
2' (H)	3,29 q	4,08 m	3,92 t	3,61 m	3,95 t
3' (Hβ)	1,42 d	2,15, 2,1-1,7 m	3,15 d	1,91 t	
4' (Hγ)		2,1-1,7 m		1,35 t	
5' (H δ)		4,05 m		0,91 t	
Ph			7,15 m		7,45 m

Ph: Phenylring

Tab. 3-6 ^{13}C Strukturaufklärung der AV Fru-L-Ala, Fru-L-Pro, Fru-L-Phe, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg (Hauptverbindung: *β*-Fructopyranose Isomer)

^{13}C	Fru-L-Ala δ mult.	Fru-L-Pro δ mult.	Fru-L-Phe δ mult.	Fru-L-Nva δ mult.	Fru-L-Phg δ mult.
1-CH_2 (C1)	51,7	61,3	53,2	54,1	52,9
2-C (C2)	95,8	96,3	95,4	96,9	96,2
3-CH (C3)	71,8	72,1	70,6	71,5	71,7
4-CH (C4)	70,5	70,6	69,6	70,9	70,2
5-CH-C5	69,8	70,1	69,1	70,5	69,2
6-CH_2 (C6)	64,4	64,4	64,4	64,4	64,4
2'(Cα)	57,1	69,5	64,1	55,7	66,6
3' (Cβ)	14,4	29,3	36,0	33,1	132,0
4' (Cγ)		24,4	134,9	19,7	131,1
5' (C δ)		58,0	129,7	14,8	130,0
6' (C ε)			129,4		132,0
7' (C ζ)			128,1		130,0
8' (C η)			129,4		131,1
9' (C θ)			129,7		
1'-COOH	173,0	174,5	172,7	175,8	172,4

Reference Fru-L-Abu (6-CH_2 (C6): 64,4 ppm)

Wie zu erwarten war, wurden für die jeweiligen Zuckerkomponenten der einzelnen AV sowohl für die ^{1}H als auch für die ^{13}C NMR Spektren nahezu identische Signale detektiert.

Abbildung 3-10 zeigt beispielhaft das ^{1}H NMR Chromatogramm und Abbildung 3-11 das entsprechende ^{13}C NMR Chromatogramm der Verbindung Fru-L-Ala mit allen detektierten Signalen.

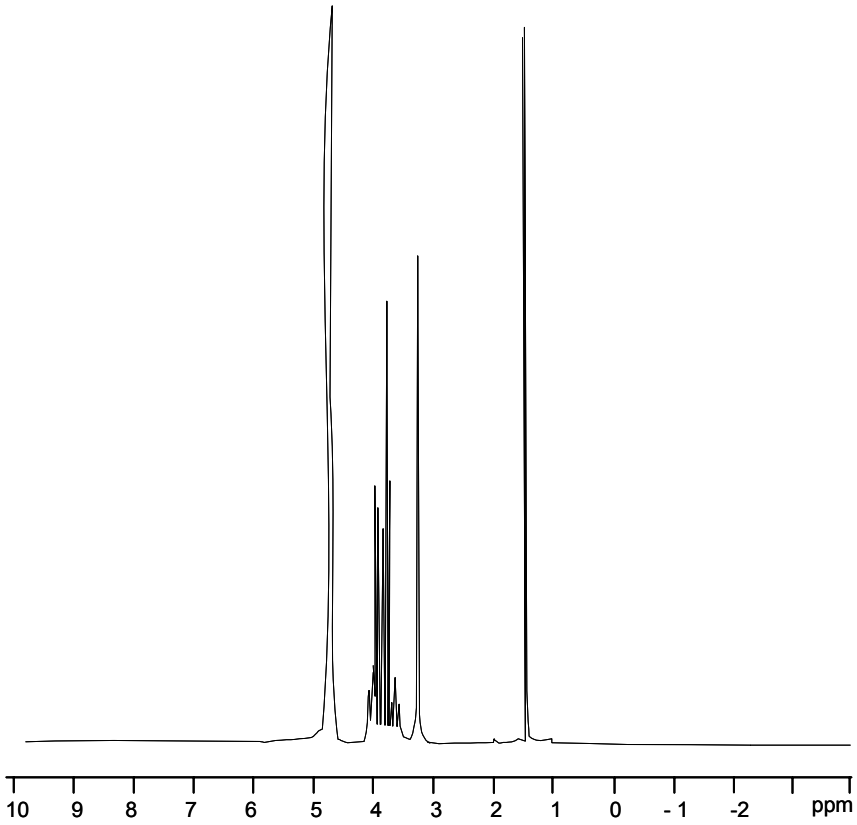


Abb. 3-10 **^{1}H NMR Spektrum der synthetisierten Amadori-Verbindung Fru-L-Ala; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.4**

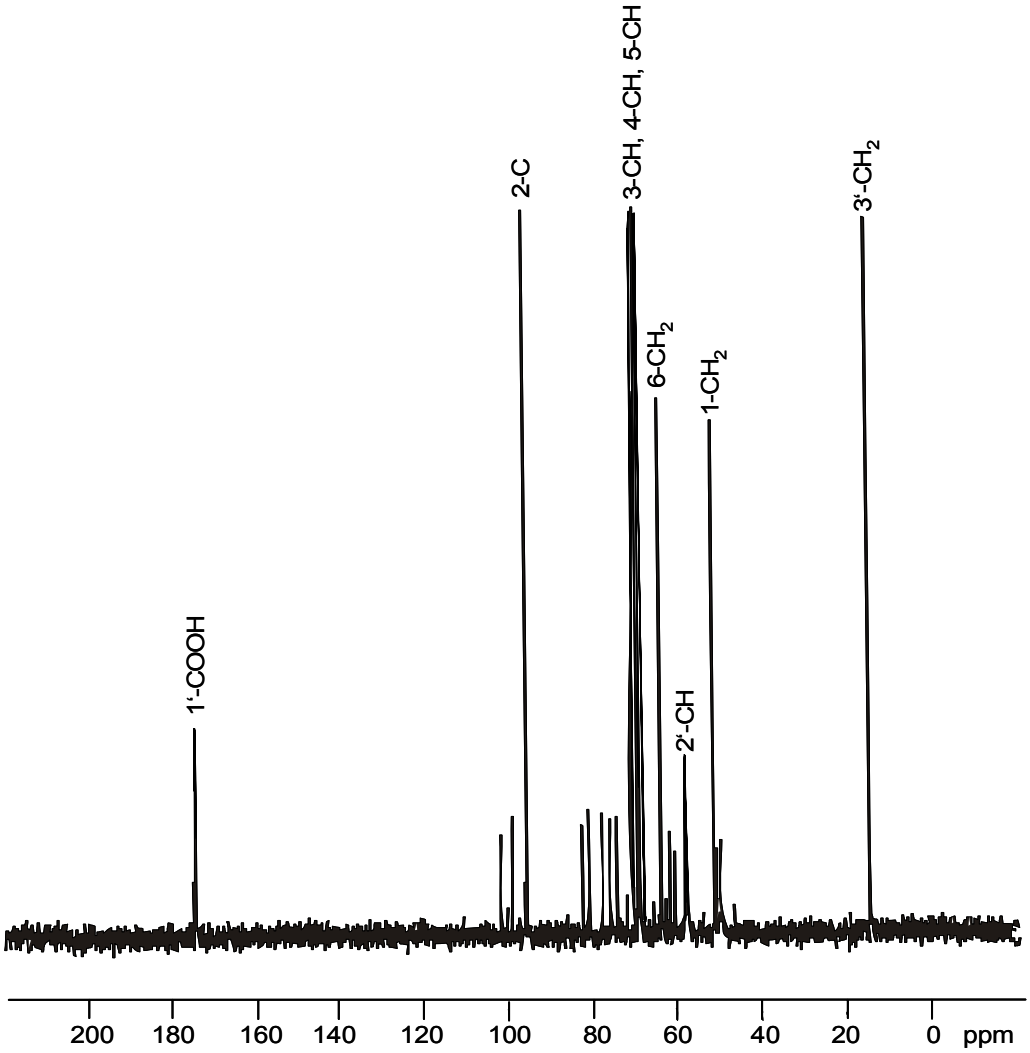


Abb. 3-11 **^{13}C NMR Spektrum der synthetisierten Amadori-Verbindung Fru-L-Ala; Bedingungen siehe Kapitel 2.1.4**

Die Strukturaufklärung führte zu dem Ergebnis, dass die synthetisierten Substanzen nach ihrer Aufreinigung mit einer Reinheit von > 98 % und circa 1 % Restzucker (Glucose) vorlagen. Verunreinigungen konnten nicht festgestellt werden.

3.2.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Amadori-Verbindungen mittels HPLC-ESI-MS

Zur genauen Charakterisierung der synthetisierten Amadori-Verbindungen wurden die MS-Messungen (wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben) im positiven Ionisierungsmodus mit 20 % relativer „Collision-Energy“ (CID-MS) durchgeführt.

Die CID-MS Analyse zeigte für alle synthetisierten Verbindungen kennzeichnende bzw. charakteristische Fragmente. Abbildung 3-12 zeigt als Beispiel die Fragmentierung der Verbindung Fru-L-Ala (vgl. Abbildung A-3; Fragmentierung von Fru-L-Nva).

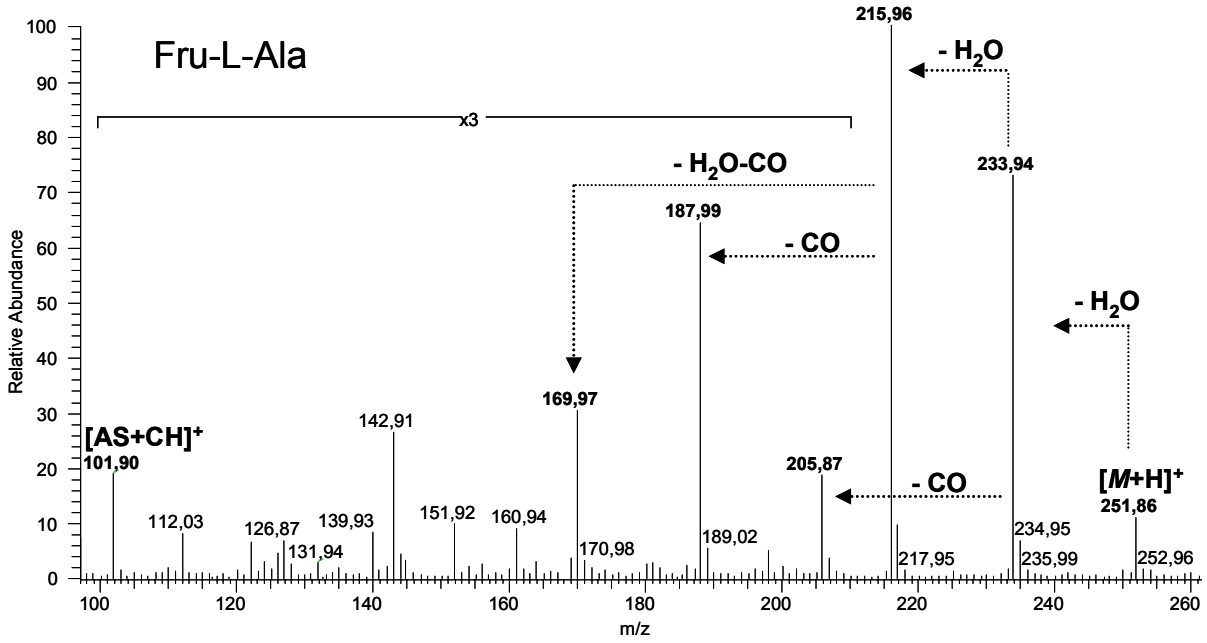


Abb. 3-12 **HPLC-ESI-MS-CID Massenspektrum der synthetisierten Verbindung Fru-L-Ala mit protonierter Molekülmasse *m/z* 251,86 und den mittels CID-MS induzierten, charakteristischen Fragmenten bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.2; M: Molekülion, AS: Aminosäure**

Nach induzierter Fragmentierung zeigte die Verbindung Fru-L-Ala das stärkste Signal mit einer Masse *m/z* 215,96 $[M+H-2H_2O]^+$. Zudem wurden die Fragmente $[M+H]^+$ mit *m/z* 251,86, $[M+H-H_2O]^+$ mit *m/z* 233,94, $[M+H-H_2O-CO]^+$ mit *m/z* 205,87, $[M+H-2H_2O-CO]^+$ mit *m/z* 187,99, $[M+H-3H_2O-CO]^+$ mit *m/z* 169,97 und $[AA+CH]^+$ mit *m/z* 101,90 detektiert.

Alle detektierten Fragmentierungen der synthetisierten Amadori-Verbindungen sind in Tabelle 3-7 dargestellt.

Tab. 3-7 Diagnostische Fragmente der synthetisierten AV nach Analyse mittels CID-MS bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.2

Verbindung	[*M*+H]+ *(m/z)*	*“Diagnostic ions CID-MS“
Fru-L-Ala	252	**234** [*M*+H-H_2O]$^+$, **216** [*M*+H-2H_2O]$^+$, **206** [*M*+H-H_2O-CO]$^+$, **188** [*M*+H-2H_2O-CO]$^+$, **170** [*M*+H-3H_2O-CO]$^+$, **102** [AS+CH]$^+$, **90** [AS+H]$^+$
Fru-L-Pro	278	**260** [*M*+H-H_2O]$^+$, **242** [*M*+H-2H_2O]$^+$, **232** [*M*+H-H_2O-CO]$^+$, **214** [*M*+H-2H_2O-CO]$^+$, **196** [*M*+H-3H_2O-CO]$^+$, **128** [AS+CH]$^+$, **116** [AS+H]$^+$
Fru-L-Phe	328	**310** [*M*+H-H_2O]$^+$, **292** [*M*+H-2H_2O]$^+$, **282** [*M*+H-H_2O-CO]$^+$, **264** [*M*+H-2H_2O-CO]$^+$, **246** [*M*+H-3H_2O-CO]$^+$, **244** [*M*+H-3H_2O-H_2CO]$^+$, **178** [AS+CH]$^+$, **166** [AS+H]$^+$
Fru-L-Abu	266	**248** [*M*+H-H_2O]$^+$, **230** [*M*+H-2H_2O]$^+$, **220** [*M*+H-H_2O-CO]$^+$, **202** [*M*+H-2H_2O-CO]$^+$, **184** [*M*+H-3H_2O-CO]$^+$, **182** [*M*+H-3H_2O-H_2CO]$^+$, **116**[AS+CH]$^+$, **104** [AS+H]$^+$
Fru-L-Nva	280	**262** [*M*+H-H_2O]$^+$, **244** [*M*+H-2H_2O]$^+$, **234** [*M*+H-H_2O-CO]$^+$, **216** [*M*+H-2H_2O-CO]$^+$, **198** [*M*+H-3H_2O-CO]$^+$, **196** [*M*+H-3H_2O-H_2CO]$^+$, **130** [AS+CH]$^+$, **118** [AS+H]$^+$
Fru-L-Phg	314	**296** [*M*+H-H_2O]$^+$, **278** [*M*+H-2H_2O]$^+$, **268** [*M*+H-H_2O-CO]$^+$, **250** [*M*+H-2H_2O-CO]$^+$, **232** [*M*+H-3H_2O-CO]$^+$, **230** [*M*+H-3H_2O-H_2CO]$^+$, **164** [AS+CH]$^+$, **152** [AS+H]$^+$

*Die angegebenen Werte wurden auf- bzw. abgerundet; M: Molekülion, AS: Aminosäure

In allen Massenspektren zeigte sich bei 20 %iger relativer „Collision-Energy“ das Ion [*M*+H-2H_2O]$^+$ als stärkstes Signal. Zudem zeigten alle analysierten Verbindungen ein ähnliches Fragmentierungsmuster und das berechnete Molekulargewicht stimmte mit dem analysierten überein.

3.2.3 Analytische Trennung mittels HPLC

Die nach Kapitel 2.7.1 beschriebene Methodenentwicklung führte nur mit der Polaris® C_{18}-Ether Säule (250 x 4,6 mm ID, 3 µm Korngröße) von *Varian* in Kombination mit dem in Kapitel 2.7.2 angegebenen Gradientenprogramm zu einer guten Trennleistung.

Abbildung 3-13 zeigt, dass die proteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala (RT: 3,37), Fru-L-Pro (RT: 3,96) und Fru-L-Phe (RT: 9,67) innerhalb von 12 min getrennt werden konnten. Für Fru-L-Ala (berechnetes Molekulargewicht 251,26 g/mol) konnten im sogenannten „TIC-Modus“ zwei charakteristische Fragmente mit den Massenzahlen *m/z* 251,90 $[M+H]^+$ und 274,01 $[M+H+Na]^+$ detektiert werden. Für Fru-L-Pro (berechnetes Molekulargewicht 277,29 g/mol) wurden die Massen *m/z* 277,96 $[M+H]^+$ und 300,05 $[M+H+Na]^+$ und für Fru-L-Phe (berechnetes Molekulargewicht 327,35 g/mol) die Masse *m/z* 327,89 $[M+H]^+$ detektiert.
Abbildung 3-14 zeigt die Trennung der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen. Die drei Substanzen Fru-L-Abu (RT: 4,18), Fru-L-Nva (RT: 5,43) und Fru-L-Phg (RT: 7,55) konnten ebenfalls mit der entwickelten Methode innerhalb von 9 min getrennt werden. Das Massenspektrum im positiven Ionisierungs-Modus zeigte für Fru-L-Abu (berechnetes Molekulargewicht 265,28 g/mol) drei charakteristische Fragmente mit den Massen *m/z* 247,96 $[M+H-H_2O]^+$, 265,81 $[M+H]^+$ und 287,95 $[M+H+Na]^+$. Für Fru-L-Nva (berechnetes Molekulargewicht 279,31 g/mol) wurden zwei charakteristische Fragmente mit den Massen *m/z* 261,96 $[M+H-H_2O]^+$ und 279,88 $[M+H]^+$ und für Fru-L-Phg (berechnetes Molekulargewicht 313,33 g/mol) die Massen *m/z* 295,95 $[M+H-H_2O]^+$ und 313,81 $[M+H]^+$ detektiert.

Mit allen anderen getesteten HPLC-Säulen und/oder durch Verwendung der in Kapitel 2.7.1 angegebenen Laufmittelkombinationen **A)-E)** coeluierten die synthetisierten Verbindungen bzw. eine im analytischen Maßstab sinnvolle Trennung war nicht möglich.

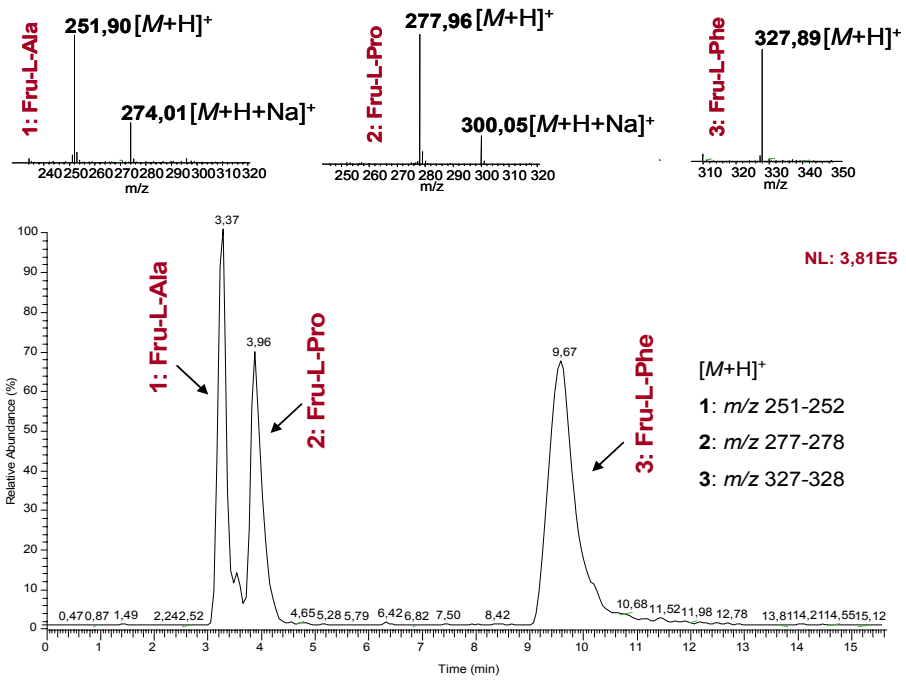


Abb. 3-13 **HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der proteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala, Fru-L-Pro und Fru-L-Phe mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen; Bedingungen siehe Kapitel 2.7**

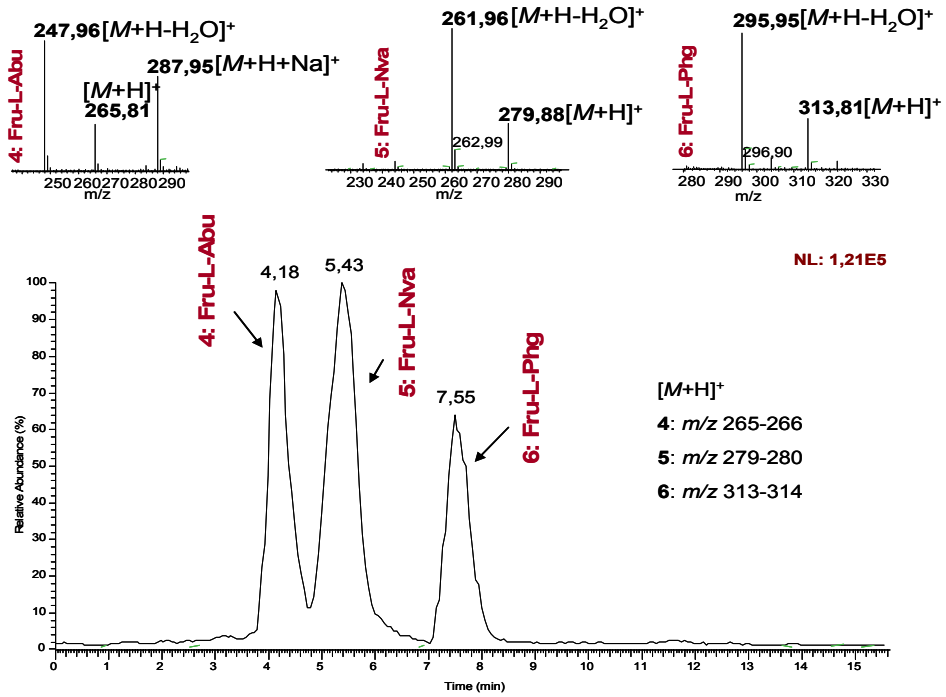


Abb. 3-14 **HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen; Bedingungen siehe Kapitel 2.7**

3.2.4 Diskussion

Zur Fortsetzung der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Forschungsarbeit über die Enantiomerisierung von AS in Lebensmitteln (FRIEBERTSHÄUSER et al. 2004; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005a, 2005b; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a, 2006b; MAYER et al. 2006; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009) wurde die Synthese von Amadori-Verbindungen zur Verwendung als „Standardmaterial“ durchgeführt. Die Synthese erfolgte modifiziert nach einer etablierten Methode von REUTTER und EICHNER (1989). Bei der Synthese handelt es sich um eine reversible Gleichgewichtsreaktion zwischen der jeweils verwendeten AS und dem reduzierenden Zucker (Glucose), die dem Massenwirkungsgesetz zu Grunde liegt. Folglich ist eine vollständige Umsetzung der Reaktanden nicht zu erwarten. Zudem führen zu lange Synthesezeiten im Zuge der ablaufenden Maillard-Reaktion bereits zu Folgereaktionen der synthetisierten Amadori-Verbindungen. Beispiele sind die Bildung von Desoxyosonen oder die Entstehung farbiger polymerer Verbindungen (BELITZ et al. 2008). Unter Beachtung der Literatur (REUTTER und EICHNER 1989; STAEMPFLI et al. 1994; YAYLAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994) und durch Erstellung von Reaktionskinetiken (vgl. Kapitel 3.2.1) wurden die Synthesezeiten auf die einzelnen AS genau abgestimmt. Durch diese Optimierung konnte eine starke Zunahme an Folgeprodukten während der Synthese weitgehend verhindert werden. Bereits entstandene Folgeprodukte wurden durch Filtration über Aktivkohle entfernt.

Zur Entfernung der im Reaktionsgemisch verbliebenen freien AS wurde eine neue Aufreinigungsmethode entwickelt. In Vorversuchen wurden anhand der eluotropen Reihe mehrere Lösungsmittel sowie Lösungsmittelgemische mittels DC auf ihre Fähigkeit, die sehr polaren Fru-AS von der jeweiligen freien AS zu trennen, getestet.

Die Übertragung auf die präparative Säulenchromatographie erfolgte mit dem Lösungsmittelgemisch *(n*-Butanol-Ameisensäure-bidestilliertes Wasser; 75:15:10, *v/v/v*), das in den Vorversuchen das beste Trennergebnis zeigte. Dieses Laufmittel führte nicht nur auf der DC-Platte zu einem sauberen Trennerfolg, auch bei der durchgeführten Säulenchromatographie konnte eine klare Bandentrennung zwischen der freien AS und der synthetisierten Amadori-Verbindung erzielt werden. Zudem erwies sich Tetrazolblau (S2) als ein schnelles und empfindliches Sprühreagenz zum

Nachweis von Fru-AS (vgl. Kapitel 2.6.2.1). Damit konnte gezeigt werden, dass eine effektive Aufreinigung mittels Säulenchromatographie möglich ist.

MOLL und GROSS (1981), FRIEBERTSHÄUSER et al. (2004) und auch WANG et al. (2008) isolierten synthetisierte Amadori-Verbindungen mittels präparativer HPLC-Methoden und erzielten sehr gute Aufreinigungsergebnisse. Für eine gute UV-Detektion sollten die isolierten Verbindungen möglichst über eine charakteristische chromophore Gruppe verfügen, die es ermöglicht, die Verbindung bei einem bestimmen Wellenlängenbereich zu detektieren. So konnte beispielsweise die Verbindung Fru-Phe bei einer Wellenlänge von 265 nm optimal erfasst werden. Bei Detektionen im Ultraviolettenbereich von 197 nm bis 208 nm können auch Verbindungen erfasst werden, die keine chromophore Gruppe besitzen (z. B. Fru-Ala), aber auch alle anderen Nebenprodukte werden in diesem Wellenlängenbereich sehr empfindlich detektiert und können das genaue Beurteilen der Aufreinigung stören. Zudem ist bei einer präparativen Aufreinigung mittels HPLC mit einem hohen Verbrauch der eingesetzten Lösungsmittel zu rechnen.

Die am häufigsten angewendete Methode ist die Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (WALTON et al. 1987; REUTTER und EICHNER 1989; MOSSINE et al. 1994; STAEMPFLI et al. 1994; DAVIDEK et al. 2005; FERRARI et al. 2007). Mit großen Säulenvolumina ist die Aufreinigung größerer Mengen im präparativen Maßstab möglich, allerdings sind die während und nach der Säulenchromatographie durchzuführenden Schritte (z. B. Kristallisation der Amadori-Verbindungen) sehr zeitaufwändig. Die vollständige Entfernung des im Reaktionsgemisch verbliebenen freien Zuckers ist ohne Schwierigkeiten mit diesen Methoden möglich, da sich der Zucker nicht an den Ionenaustauscher bindet und mit polaren Lösungsmitteln aus der Säule gewaschen werden kann. Die anschließende Trennung der freien AS von der synthetisierten Amadori-Verbindung ist sehr komplex und erfordert einiges an „praktischer Erfahrung“ (vgl. Kapitel 1.4.3.2): Die Auswahl der Eluenten und vor allem deren Konzentration sowie die Fließgeschwindigkeit sind für ein gutes Trennergebnis von entscheidender Bedeutung. REUTTER und EICHNER (1989) wählten für jede einzelne Amadori-Verbindung unterschiedliche Konzentrationen der eingesetzten Trichloressigsäure (0,05 mol/l für Fru-Asp bis 0,40 mol/l für Fru-Phe), während beispielsweise MOSSINE et al. (1994) oder STAEMPFLI et al. (1994) eine 0,2 N Ammoniumhydroxid-Lösung einsetzten. Durch

den Einsatz von Eluenten relativ geringer Konzentration eluieren die sehr polaren Amadori-Verbindungen vor den ebenfalls an den Austauscher gebundenen AS. Eine klare Trennung der beiden Verbindungen ist sehr schwierig, da meist auch ein gewisser Anteil der AS mit der Amadori-Fraktion coeluiert. Folglich müssen diese Fraktionen in einem weiteren Schritt bearbeitet werden. Hierzu können die Amadori-Verbindungen in einem Gemisch aus Ethanol und Wasser rekristallisiert oder durch Aufnahme in Methanol mittels Ether oder Aceton ausgefällt werden. Um reine Verbindungen zu erhalten, müssen diese Schritte mehrmals durchgeführt werden (ALTENA et al. 1981; REUTTER und EICHNER 1989; STAEMPFLI et al. 1994).

Im Vergleich zur Ionenaustauschchromatographie benötigt die Säulenchromatographie nur sehr wenige zeitaufwändige Schritte. Nach der Elution der AS und der Amadori-Verbindungen kann die Säule ohne vorherige Aktivierung wieder benutzt werden und die Amadori-Verbindungen können nach Entfernung des Fließmittels direkt weiterverwendet werden. Nachteilig bei der alleinigen Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (ohne zuvor den Zucker entfernt zu haben) ist, dass etwa 10 % bis 20 % freie Glucose im NMR-Spektrum nachzuweisen sind. Folglich muss zur vollständigen Aufreinigung der Amadori-Verbindung der freie Zucker in einem der Säulenchromatographie vorangestelltem Schritt entfernt werden. Dies wurde in dieser Arbeit mittels vereinfachter Ionenaustauschchromatographie, ohne das Sammeln von Fraktionen und anschließender Kristallisation, durchgeführt.

BEKSAN et al. (2003) und BLANK et. al. (2003) fällten die Amadori-Verbindungen direkt nach ihrer Synthese mittels tropfenweiser Zugabe von Aceton. Mehrmaliges Aufkonzentrieren, Kühlen und die Zugabe von Aceton führen zu Reinheiten von über 90 %.

Eine weitere Methode zur Aufreinigung wurde von MAYER et al. (2006) mittels präparativer DC durchgeführt. Zur Trennung von Fru-Pro und freiem Pro wurde ein Gemisch aus *n*-Butanol, Aceton, Eisessig und bidestilliertem Wasser (35:35:7:23, *v/v/v/v*) als Laufmittel sowie Cellulose als stationäre Phase verwendet. Mit der DC ist eine gute Trennung von AS und Fru-AS möglich und letztgenannte müssen nicht vom Laufmittel befreit werden. Diese Methode ist jedoch sehr zeitintensiv, da die isolierten Verbindungen gemeinsam mit der stationären Phase von der DC-Platte entfernt werden müssen. Zusätzlich muss die Cellulose anschließend ebenfalls vollständig entfernt werden, da diese sonst die Überprüfung des Reinheitsgrades

während der NMR-Messung stören würde. Zudem sind sehr viele Durchläufe nötig, um größere Mengen (bis 2 g) zu gewinnen.

Zusammenfassend ist die in dieser Arbeit verwendete Kombination aus Ionenaustausch- und Säulenchromatographie unter Beachtung der Trennleistung für den präparativen Maßstab eine sehr gute Methode, um gute Ausbeuten mit hohem Reinheitsgrad in einem angemessenen Zeitaufwand zu erzielen. Die durchgeführte Aufreinigung führte bei allen synthetisierten Verbindungen zu sehr guten Ergebnissen. Die in dieser Arbeit dargestellten NMR- und HPLC-ESI-MS-Ergebnisse stimmen sehr gut mit den bereits in der Literatur (ALTENA et al. 1981; BOCK und THOGERSEN 1982; RÖPER et al. 1983; WALTON et al. 1987; MOSSINE et al. 1994; HAU et al 2004; DAVIDEK et al. 2005; FROLOV et al. 2006b; FERRARI et al. 2007; WANG et al. 2008) beschriebenen NMR-Daten und massenspektrometrischen Ergebnissen überein. Es konnte gezeigt werden, dass mittels der verwendeten Aufreinigungsmethoden Substanzen mit sehr hohem Reinheitsgrad gewonnen werden können und diese als Standard-Referenzmaterial eingesetzt werden können.

Die analytische Trennung der synthetisierten Verbindungen mittels HPLC-ESI-MS ist in den Abbildungen 3-13 und 3-14 gezeigt. Viele Methoden zur Analyse von Amadori-Verbindungen mittels HPLC (insbesondere HPLC-MS) wurden bereits in der Literatur beschrieben (STAEMPFLI et al. 1994; SCHLICHTHERLE-CERNY et al. 2003; DAVIDEK et al. 2005; HAO et al. 2007; vgl. Kapitel 1.4.4). Alle verwendeten HPLC-Säulen haben die Eigenschaft, polare Komponenten zu trennen. In dieser Arbeit wurde eine Polaris® C_{18}-Ether Säule von *Varian* zur Trennung der Amadori-Verbindungen verwendet. Das Säulematerial basiert auf hochreinem Siliziumdioxid und einer „etherhaltigen“ polaren Gruppe, die bei diesem Säulentyp zwischen der primären C_{18}-Kette und der Silica-Beschichtung gebunden ist. Die Säule kann zu 100 % mit wässrigen Eluenten und einem großen pH-Bereich zwischen 1,5 und 10 betrieben werden und zeigt ein hervorragendes Retentionsverhalten bei der Trennung polarer Substanzen wie z. B. Amadori-Verbindungen. Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden konnte mit der in dieser Arbeit verwendeten Säule sowohl bei den proteinogenen Amadori-Verbindungen als auch bei den nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen eine nahezu basislinienmäßige Trennung innerhalb kürzester Zeit (vgl. Kapitel 3.2.3) erreicht werden.

Im Allgemeinen eignet sich die entwickelte HPLC-Methode hervorragend zur Trennung der Amadori-Verbindungen und auch die Detektion bzw. Identifizierung dieser Verbindungen im MS-Spektrum mittels ESI-MS ist ohne größeren Methodenaufwand möglich. Die synthetisierten Amadori-Verbindungen können schnell und ohne umfangreiche Probenaufbereitung, beispielsweise mittels Derivatisierungen, analysiert werden.
Im Folgenden soll die entwickelte Methode zur Analyse von Amadori-Verbindungen in der Probenmatrix Honig angewendet werden.

3.3 *Analyse von AS und Amadori-Verbindungen in Honig*

3.3.1 Chirale GC-SIM-MS Analyse der freien Aminosäuren

Die für die GC-SIM-MS Analyse verwendeten Bienenhonige (BH1 – BH5) wurden auf die für Honige typischen Analysenparameter untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen (vgl. Kapitel 2.3.2, Tabelle 2-5) zeigten, dass alle Parameter im Rahmen der für die individuellen Honigsorten vorgeschriebenen Werte im Sinne der aktuellen Honigverordnung (Honigverordnung vom 16. Januar 2004) lagen. Alle Proben hatten einen hohen Gehalt an reduzierenden Zuckern (Glucose: 23,9 – 27,3 g/100g; Fructose: 31,0 – 42,3 g/100g) und einen durchschnittlichen Wassergehalt von 16 %. Zudem konnte durch die geringen Hydroxymethylfurfural-Gehalte (HMF) zwischen 2,5 und 16,6 mg/kg gezeigt werden, dass die Honige keiner langen Lagerungszeit oder einem Wärmeeintrag ausgesetzt waren.
Mittels etablierten Methoden (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a) wurden die Honige auf ihren Gehalt an freien AS analysiert (vgl. Kapitel 2.9). Abbildung 3-15 zeigt das zugehörige GC-SIM-MS DL-Standard-Chromatogramm (vgl. Abbildung A-4; L-Standard-Chromatogramm), derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol. Abbildung 3-16 zeigt das GC-SIM-MS-Chromatogramm der Probe BH5. Die für die Methodenvalidierung bestimmten Responsefaktoren sind im Anhang (Tabelle A-5) aufgeführt.

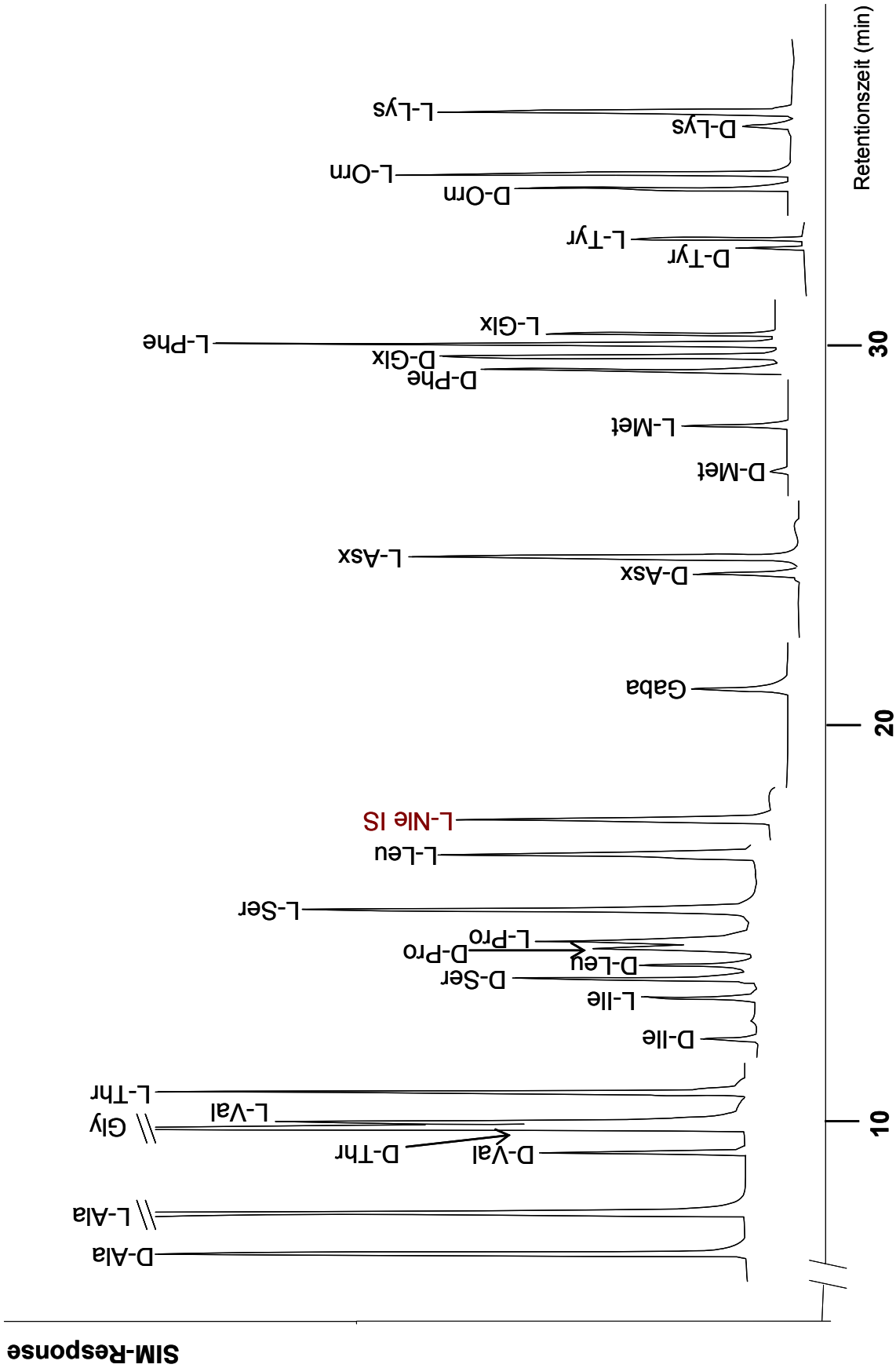


Abb. 3-15 **GC-SIM-MS eines DL-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6**

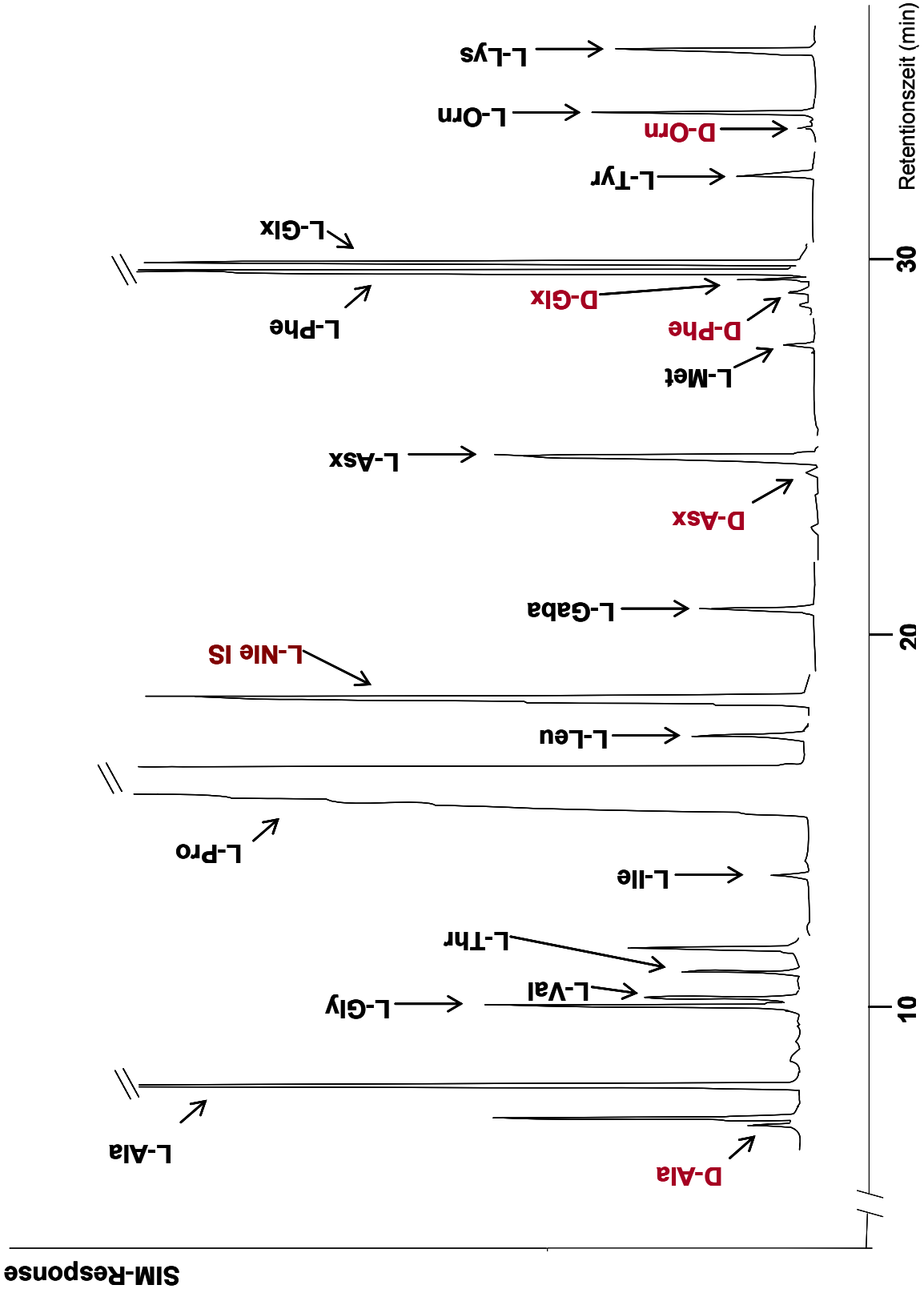


Abb. 3-16 GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH5 (*Ägäischer Pinien Honig*) derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6

In allen analysierten Honigproben konnten die AS L-Ala, Gly, L-Val, L-Thr, L-Ile, L-Pro, L-Leu, L-Asx (Asparagin und Asparaginsäure), L-Met, L-Glx (Glutamin und Glutaminsäure), L-Tyr (nicht in Probe BH3), L-Orn und L-Lys detektiert werden.

Die absoluten Gehalte in Tabelle 3-8 entsprachen den in der Literatur angegebenen Werten für Honig (DAVIES 1975; PAWLOWSKA und ARMSTRONG 1994; BELITZ et al. 2008) und lagen für die L-AS zwischen 0,15 mg/100g Trockenmasse (TM) (Probe BH2; L-Orn) im Minimum und 79,58 mg/100g TM (Probe BH3; L-Pro) im Maximum. In allen analysierten Honigproben zeigte die für Honige charakteristische AS Prolin (PAWLOWSKA und ARMSTRONG 1994) mit Werten zwischen 27,42 mg/100g TM bis 79,58 mg/100g TM den größten Anteil an detektierten AS. Die Probe BH3 (ein Waldhonig) enthielt im Vergleich der analysierten Proben den größten absoluten Anteil an AS. Besonders die AS L-Phe mit 32,81 mg/100g TM und L-Glx mit 22,89 mg/100g TM lagen deutlich über den Werten der anderen Honigproben. Der Akazienhonig (Probe BH2) enthielt den geringsten absoluten Anteil an AS. Sehr deutlich zeigt dies der Gehalt an L-Prolin, der mit 27,42 mg/100g TM deutlich unter den detektierten Gehalten der anderen Honigproben lag.

An D-Enantiomeren konnten in allen Proben die AS D-Ala (0,03 mg/100g TM bis 0,57 mg/100g TM), D-Asx (0,06 mg/100g TM bis 1,37 mg/100g TM), D-Phe (0,05 mg/100g TM bis 1,00 mg/100g TM) und D-Glx (0,06 mg/100g TM bis 0,73 mg/100g TM) nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die AS D-Orn in den Proben BH3 bis BH5 (0,05 mg/100g TM bis 0,16 mg/100g TM) und die AS D-Lys in Probe BH4 (0,02 mg/100g TM) detektiert. D-Pro konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

Tab. 3-8 Absolute L- und D-AS-Gehalte [mg/100g TM] in verschiedenen Honigproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6

AS	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5
D-Ala	0,12	0,03	0,57	0,10	0,18
L-Ala	2,04	1,01	6,35	1,67	4,51
Gly	0,70	0,40	3,22	0,97	2,32
L-Val	2,11	1,17	5,16	1,97	1,90
L-Thr	0,31	0,68	2,05	0,39	0,69
L-Ile	1,10	0,55	2,44	1,26	1,35
D-Pro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-Pro	50,04	27,42	79,58	45,48	53,93
L-Leu	0,51	0,42	1,92	0,77	1,49
D-Asx	0,12	0,06	1,37	0,23	0,29
L-Asx	4,01	3,48	27,38	6,25	7,11
L-Met	0,35	0,32	1,74	0,69	0,96
D-Phe	0,14	0,05	1,00	0,13	0,41
L-Phe	4,25	4,03	32,81	5,17	11,76
D-Glx	0,14	0,06	0,73	0,17	0,45
L-Glx	3,92	2,78	22,89	4,07	8,71
L-Tyr	2,36	1,13	n.d.	1,50	0,73
D-Orn	n.d.	n.d.	0,16	0,05	0,07
L-Orn	0,38	0,15	1,03	0,70	1,21
D-Lys	n.d.	n.d.	n.d.	0,02	n.d.
L-Lys	1,02	2,07	0,94	1,13	2,07

n.d.: nicht detektiert; TM: Trockenmasse

Die Chromatogramme der Honigproben BH1 bis BH4 sind im Anhang (Abbildungen A-12 bis A-15) aufgeführt.

3.3.2 Nachweis von Amadori-Verbindungen in Honig mittels High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS)

Die Analyse der Amadori-Verbindungen in diesem Kapitel wurde auf die in dieser Arbeit synthetisierten und zur Methodenentwicklung eingesetzten Amadori-Verbindungen (vgl. Kapitel 3.2) beschränkt. Die Isolierung der Amadori-Verbindungen aus den Honigproben wurde mittels Festphasenextraktion durchgeführt (vgl. Kapitel 2.9.2.1). Die dafür verwendete Chromabond SA Kartusche war mit einem Benzolsulfonsäure Kationenaustauscher-Harz gepackt und hatte eine pH-Stabilität zwischen 2 und 8. Die mittels 1 M HCl auf pH 2,2 eingestellten Amadori-

Verbindungen wurden mit ihrer AS-Komponente an das Austauschermaterial gebunden und anschließend mit einer 1 M Ammoniaklösung von der Kartusche eluiert.

Nach der Extraktion konnte die Amadori-Verbindung Fru-Ala in den Proben BH1, BH3 und BH5 und die Amadori-Verbindung Fru-Phe in allen Honigproben, außer in BH2, nachgewiesen werden. Abbildung 3-17 zeigt das HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der Probe BH5 mit den entsprechenden charakteristischen Ionen $[M+H]^+$ der Amadori-Verbindungen Fru-Ala und Fru-Phe.

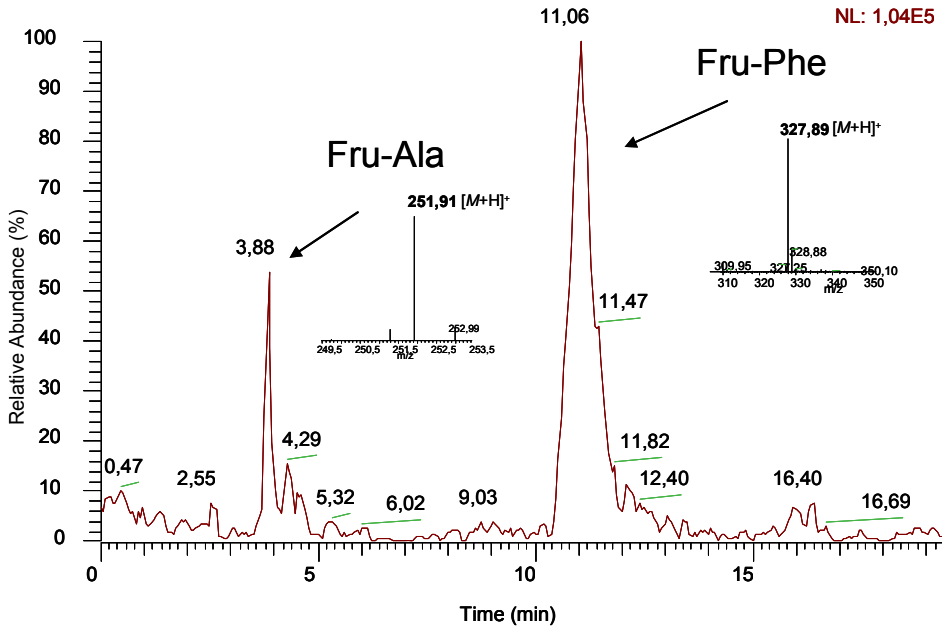


Abb. 3-17 **HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der Honigprobe BH5 mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen der detektierten AV; Bedingungen siehe Kapitel 2.7**

Die berechneten Konzentrationen der Amadori-Verbindungen waren relativ gering (vgl. Tabelle 3-9) und reichten bei Fru-Ala von 0,195 bis 0,265 mg/100g TM und für Fru-Phe von 0,732 bis 5,953 mg/100g TM und lagen somit zwischen der Detektionsgrenze und der Bestimmungsgrenze. Zudem konnten diese Werte aufgrund der hohen Standardabweichung (vgl. Kapitel 2.11.4) nur als semiquantitative Werte bzw. als qualitativer Nachweis der Amadori-Verbindungen

verwendet werden. Die Amadori-Verbindung Fru-Pro konnte in keiner Probe detektiert werden.

Tab. 3-9 Absolute Gehalte [mg/100g TM] an AV in verschiedenen Honigproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.7

AV	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5
Fru-Ala	0,195	n.d.	0,265	n.d.	0,236
Fru-Pro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fru-Phe	0,732	n.d.	5,953	1,273	1,161
Σ AV	0,927	---	6,218	1,273	1,397

n.d.: nicht detektiert; TM: Trockenmasse

3.3.3 Diskussion

Durch Bestimmung verschiedener Standardparameter (vgl. Tabelle 2-5) konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Honigproben nativen Ursprungs waren und kein Wärmeeintag stattgefunden hatte. In allen analysierten Honigproben konnten D-AS-Enantiomere detektiert werden. Abbildung 3-18 zeigt die relativen Gehalte der D-AS (%D=D/(D+L)*100), wobei die Anteile der einzelnen AS zwischen 1,2 und 13,4 % schwankten. Die D-Enantiomere von Ala, Asx, Phe und Glx wurden in jeder Probe detektiert. Zusätzlich konnten die AS D-Orn in den Proben BH3 bis BH5 und D-Lys in Probe BH4 noch nachgewiesen werden. Obwohl die AS Prolin mengenmäßig den größten Anteil aller AS in den Honigproben ausmachte, konnte in keiner Probe das entsprechende D-Enantiomer detektiert werden. Prolin ist die prädominante AS im Honig. Der überwiegende Anteil an Prolin im Honig stammt von der Biene (charakteristischer Bestandteil des Bienenspeichels). Weitere Quellen sind die entsprechenden Honigrohstoffe Nektar, Honigtau und Pollen. Beeinflusst wird der Prolingehalt somit auch von der Nahrungsaufnahme der Biene und ist folglich abhängig von der Vegetationszusammensetzung im Umfeld der Biene und auch von der Jahreszeit. In der Lebensmittelanalytik dient der Prolingehalt zur Beurteilung von Reife und Naturbelassenheit (LIPP 1990).

Diese Ergebnisse bzw. Werte stehen in sehr gutem Einklang zu den bereits veröffentlichten Daten von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a). Die Autoren konnten im nativen Honig ebenfalls die D-Enantiomere der AS Ala (bis 6,2 % D-AS), Asx (bis

1,5 % D-AS), Phe (bis 3 % D-AS), Glx (bis 5,9 % D-AS), Orn (bis 2,1 % D-AS) und Lys (bis 5,4 % D-AS) detektieren. Zudem konnten sie in einigen Proben die D-Enantiomere der AS Val (0,4 % D-AS) und Ser (1,5 % D-AS) detektieren. Das D-Enantiomer von Prolin konnte nur in einer Probe mit einem sehr geringen Gehalt von 0,1 % detektiert werden. Die von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) bestimmten relativen Gehalte entsprechen nahezu den in dieser Arbeit bestimmten Ergebnissen. Die Autoren erklärten das Vorkommen von D-AS in den nativen Honigproben durch den Ablauf der Maillard-Reaktion. Diese Erklärung trifft auch auf die in dieser Arbeit detektierten D-AS zu.

Auch PAWLOWSKA und ARMSTRONG (1994) konnten im Vergleich zu den AS Phe und Leu für Pro nur sehr geringe Mengen an D-AS, die zum Teil unter der Detektionsgrenze lagen, bestimmen. Dies zeigt, dass die AS Pro im Medium sehr schlecht bzw. nicht racemisiert. Eine mögliche Ursache der sehr unterschiedlichen Gehalte an detektierten D-AS in den verschiedenen Proben erklärten die Autoren mit verschiedenen Lagerungsbedingungen und Aufbereitungsschritten der Honige.

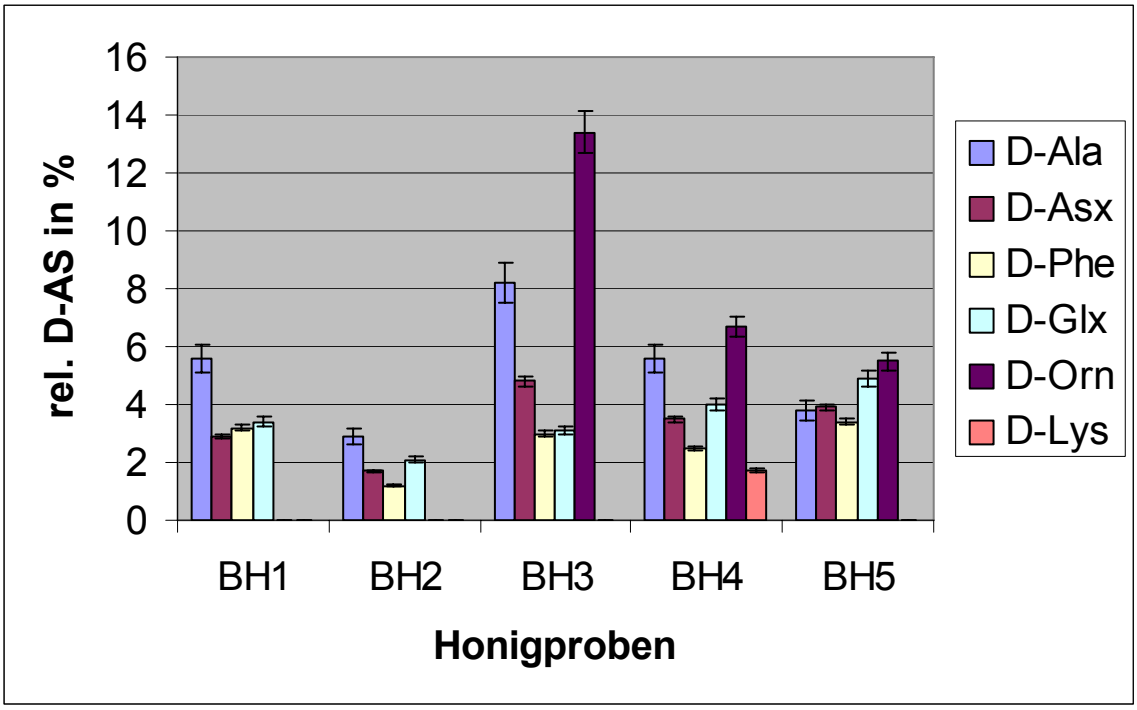


Abb. 3-18 **Relative D-AS (%D=D/(D+L)*100) Gehalte in verschiedenen Honigproben (vgl. Kapitel 2.3.2); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6**

Des Weiteren postulierten PÄTZOLD and BRÜCKNER (2004), dass D-AS über die Bildung von Amadori-Verbindungen oder Heyns-Verbindungen im Zuge der Maillard-Reaktion entstehen können. Honig enthält große Mengen an Glucose (23 – 28 %) und Fructose (31 – 43 %), folglich ist sowohl die Bildung von Amadori-Verbindungen, als auch die Bildung von Heyns-Verbindungen möglich (JAKAS et al. 2008; KRAUSE et al. 2008). Bezugnehmend auf den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Racemisierungsmechanismus ist die Bildung von D-AS in Honig über beide Verbindungen möglich. Dies belegen auch Racemisierungsstudien von KIM und LEE (2008, 2009), die sowohl Fructose als auch Glucose als Reaktionspartner mit verschiedenen AS in Erhitzungsversuchen eingesetzt haben.

Die Detektion von glykosilierten Verbindungen in Lebensmitteln, die sowohl reich an Fructose und Glucose, als auch an AS sind, bekräftigen den postulierten Mechanismus weiter. Bezugnehmend auf die synthetisierten Amadori-Verbindungen Fru-Ala, Fru-Pro und Fru-Phe werden die in dieser Arbeit detektierten Verbindungen im Honig als Amadori-Verbindungen bezeichnet, wohl wissend dass mit der entwickelten HPLC-ESI-MS-Methode (vgl. Kapitel 2.7) eine Unterscheidung der Amadori-Verbindungen von den Heyns-Verbindungen anhand des Massenspektrums sehr schwierig ist, da beide Verbindungen sich in ihren $[M+H]^+$ Ionen (KRAUSE et al. 2003; KRAUSE et al. 2008) und ihrer Fragmentierung (FROLOV et al. 2006b) nicht unterscheiden und somit die detektierten D-AS in dieser Arbeit auch durch Freisetzung aus den Heyns-Verbindungen stammen könnten. Generell wird in der Literatur aber diskutiert, dass die Heyns-Verbindungen im Vergleich zu den Amadori-Verbindungen weniger stabil sind und somit üblicherweise die detektierten Verbindungen als Amadori-Verbindungen angegeben werden (vgl. Kapitel 1.4.1, Entstehung von Amadori-Verbindungen). Dieser Detektionsnachteil beeinflusst aber nicht das Ziel dieser Arbeit, den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) beschriebenen Mechanismus zu bestätigen.

Die Ergebnisse der Amadori-Analysen zeigten, dass die Amadori-Verbindungen Fru-Ala und Fru-Phe nachgewiesen werden konnten. Fru-Pro wurde nicht detektiert. Betrachtet man die Synthesezeiten der Verbindungen (vgl. Kapitel 2.4), kann festgestellt werden, dass die Verbindung Fru-Pro mit 6 h die längste Reaktionszeit

benötigt, während Fru-Ala mit 3,5 h und Fru-Phe mit nur 2,5 h sehr schnell gebildet werden. Die Synthesezeiten und die Stabilität der Amadori-Verbindungen werden durch die individuellen AS stark beeinflusst. Im Einzelnen hängt die Bildung sehr stark von den sterischen und „elektronenziehenden" Eigenschaften der AS-Seitenkette ab. Die Seitenkette der sekundären AS Pro, mit dem im Ring eingeschlossenen *N*-Atom, bewirkt eine geringere Reaktionsfähigkeit mit den reduzierenden Zuckern. Bezugnehmend auf die Lagerungsbedingungen der Bienenhonige (vor allem bei Raumtemperatur) könnten diese eine Reaktion der AS Pro mit den vorhandenen reduzierenden Zuckern nicht begünstigt haben. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum keine Amadori-Verbindung Fru-Pro in den Proben detektiert werden konnte, obwohl der Gehalt an freiem Pro mit zwischen 27,42 und 79,58 mg/100g TM am höchsten von allen detektierten AS war. Da auch kein D-Pro gefunden wurde, kann postuliert werden, dass die Bildung von Amadori-Verbindungen als Precursor-Substanzen für die Racemisierung von AS notwendig ist.

In Probe BH2 konnten keine Amadori-Verbindungen nachgewiesen werden. Im Vergleich mit allen analysierten Proben wurde bei dieser Probe auch insgesamt der geringste AS-Gehalt (vgl. Tabelle 3-8) detektiert. Das geringe Verhältnis AS zu den reduzierenden Zuckern könnte bei dieser Probe die Ursache sein, dass keine Amadori-Verbindungen in detektierbaren Mengen generiert wurden. Ein weiterer Punkt könnte eine sehr kurze Lagerungszeit der Honigprobe sein, die noch nicht zur Bildung von Amadori-Verbindungen (in für die Detektion ausreichenden Mengen) geführt hat.

Die gezeigten Daten bekräftigen den vorgeschlagenen Mechanismus zur Bildung von D-AS als Resultat einer reversiblen Bildung von Amadori-Verbindungen oder Heyns-Verbindungen während der Maillard-Reaktion (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a) und zeigen, dass die MR schon bei moderaten Lagerungsbedingungen (ca. 20 °C Raumtemperatur) ablaufen kann. Somit ist auch eine in *vivo* Bildung von Amadori-Verbindungen bei physiologischen Temperaturen von 37 °C innerhalb kurzer Zeit möglich bzw. vorstellbar und diese Ergebnisse sollten bei Versuchen von in *vivo* Glykosilierungen von Peptiden und Proteinen, einschließlich Oxidation, Abbau und

Vernetzung von Amadori-Verbindungen, bis hin zur Entstehung von „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) berücksichtigt werden (vgl. Kapitel 1.4.1).

Fazit: Die Isolierung von Amadori-Verbindungen bzw. anderen glykosilerten Verbindungen aus Lebensmitteln (z. B. Honig) mittels der angewendeten Festphasenextraktion und deren Detektion mit der entwickelten HPLC-ESI-MS Methode konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Detektion von D-AS und Amadori-Verbindungen in Lebensmitteln, die reich an reduzierenden Zuckern und AS sind, unterstützen den postulierten Mechanismus der Enantiomerisierung von AS im Zuge der Maillard-Reaktion. Um die Rolle der Amadori-Verbindungen bei der Enantiomerisierung von D-AS genauer zu untersuchen, sollten im Folgenden anhand von synthetisierten Amadori-Verbindungen in Erhitzungsversuchen, die den Ablauf der MR simulieren, weitere Enantiomerisierungen zu beobachten sein.

3.4 *Untersuchungen zur Enantiomerisierung von aus Amadori-Verbindungen freigesetzten Aminosäuren während der Maillard-Reaktion*

3.4.1 Erhitzungsexperimente mit proteinogenen Amadori-Verbindungen

Abbildung 3-19 zeigt das DL-AS-Standard-Chromatogramm (vgl. Abbildung A-5; L-Standard-Chromatogramm) der chiralen Trennung der proteinogenen AS (vgl. 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und Methanol auf FS-LIPODEX® E (vgl. Kapitel 2.9.1.2). Für alle verwendeten AS konnte eine Basislinien-Trennung der jeweiligen Enantiomerenpaare erzielt werden. Die Bedingungen der angewendeten Methode werden in Kapitel 2.9.1.7 gezeigt.
Die für die Methodenvalidierung bestimmten Responsefaktoren sind im Anhang (Tabelle A-6) aufgeführt.

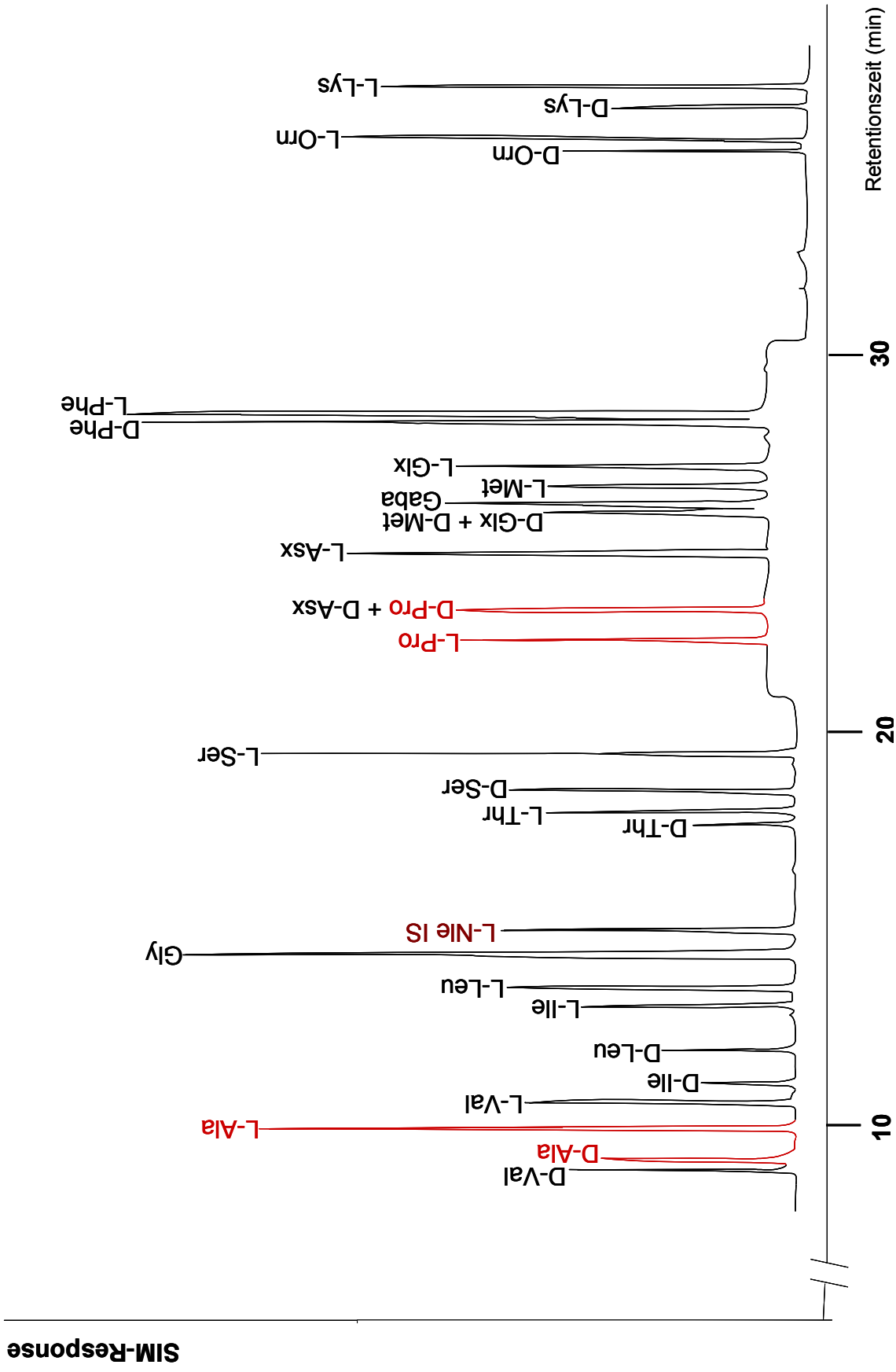


Abb. 3-19 **GC-SIM-MS eines DL-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.2) derivatisiert mit TFAA und Methanol (Trennung auf FS-LIPODEX® E); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7**

Die Ergebnisse der Erhitzungsexperimente der proteinogenen AS (vgl. Kapitel 2.8.1) sind in Tabelle 3-10 dargestellt und Abbildung 3-20 zeigt repräsentativ die Enantiomerisierung sowohl von D-Ala als auch von D-Pro nach der Erhitzung von Fru-L-Ala (für 1 h) bzw. nach der Erhitzung von Fru-L-Pro (für 15 h).
Die synthetisierten und aufgereinigten Amadori-Verbindungen wurden über verschiedene Zeiträume bei 130 °C trocken erhitzt. Die Bestimmung der Enantiomerisierung erfolgte zum einen direkt nach der Erhitzung zur Bestimmung der freien AS und zum anderen nach vorheriger Totalhydrolyse zur Bestimmung der freien und aus den Amadori-Verbindungen freigesetzten AS.

Tab. 3-10 Relative Gehalte (%D=D/(D+L)*100) der D-Enantiomere von Alanin (%D-Ala) und Prolin (%D-Pro) nach der Erhitzung (130 °C) von Fru-L-Ala bzw. Fru-L-Pro; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7

Erhitzungsdauer [h] bei 130 °C	**freie AS**		**freie und nach Totalhydrolyse freigesetzte AS**	
AV	Fru-L-Ala [% D-Ala]	Fru-L-Pro [% D-Pro]	Fru-L-Ala [% D-Ala]	Fru-L-Pro [% D-Pro]
BW	1,3	0,7	1,9	1,3
0,5	n.b.	n.b.	11,4	1,0
1	15,8	1,4	19,0	3,3
3	15,8	1,8	18,5	3,9
9	13,2	2,3	20,1	5,5
15	15,6	3,3	17,9	8,2
24	14,4	2,5	17,0	5,6

BW: Blindwert; n.b.: nicht bestimmt; Daten beziehen sich auf die Mittelwerte der Doppelbestimmung

Als Blindwert werden die Racemisierungsraten der unerhitzten Amadori-Verbindungen definiert. Bereits bei den Blindwerten (BW) konnten sowohl für Fru-L-Ala als auch für Fru-L-Pro relative Gehalte von 0,7 % bis 1,9 % des D-Enantiomers detektiert werden. Nach kurzer Erhitzungsdauer konnte bei allen Versuchen ein Anstieg der relativen D-AS-Gehalte detektiert werden. Für Fru-L-Ala wurden ohne vorherige Totalhydrolyse Gehalte zwischen 13,2 und 15,8 % und für Fru-L-Pro Gehalte zwischen 1,4 und 3,3 % des entsprechenden D-Enantiomers festgestellt.

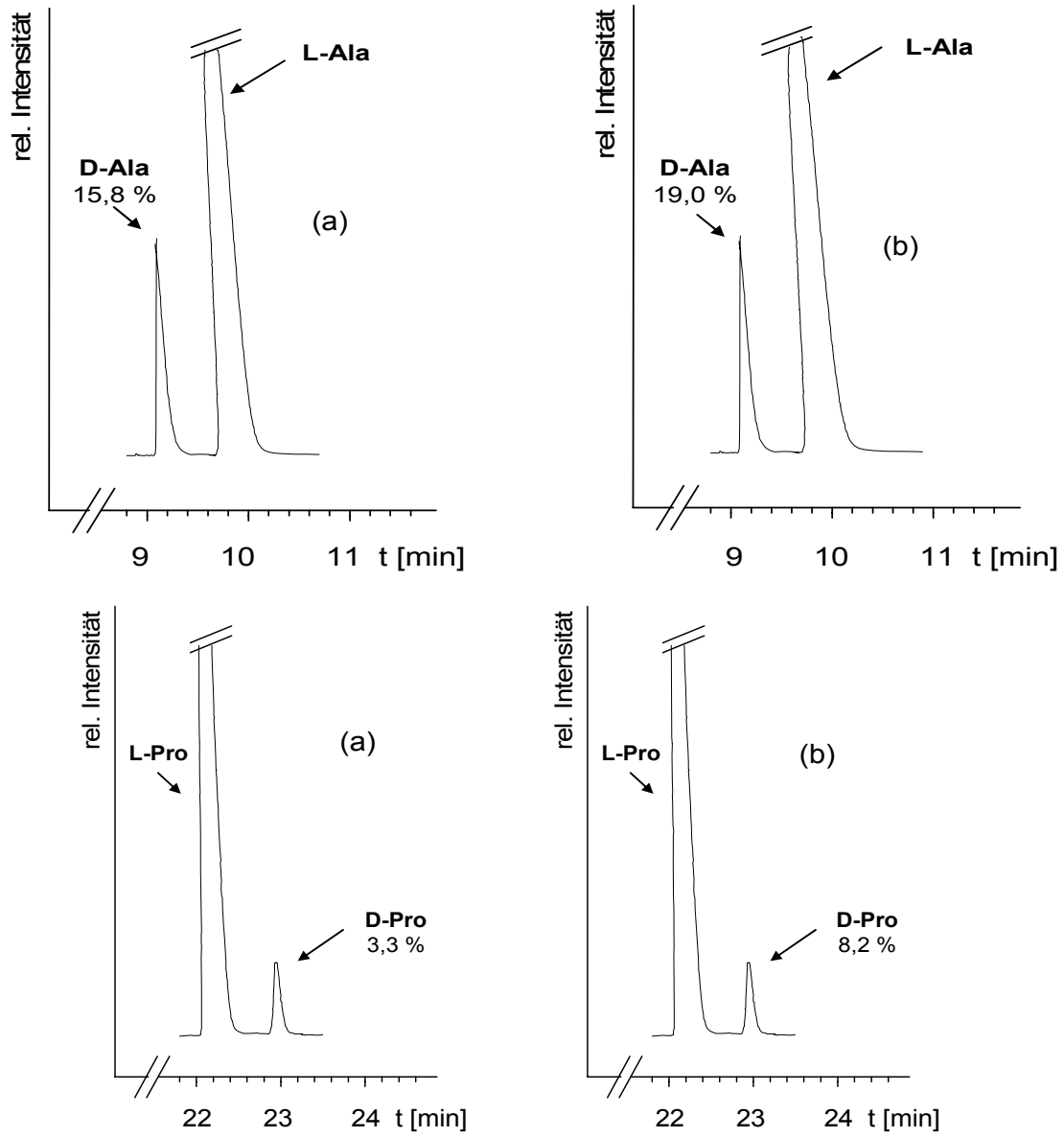


Abb. 3-20 **GC-SIM-MS der TFA/Methylester-Derivate von Alanin bzw. Prolin nach der Erhitzung bei 130°C von Fru-L-Ala (für 1 h) bzw. Fru-L-Pro (für 15 h). (a) Bestimmung der freien AS; (b) Bestimmung der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7**

Nach Totalhydrolyse der erhitzten Amadori-Verbindungen wurden für Fru-L-Ala relative Racemisierungsraten zwischen 11,4 und 20,1 % und für Fru-L-Pro Werte zwischen 1,0 und 8,2 % bestimmt. Somit konnte für Fru-L-Ala bzw. die AS Ala im Vergleich zur AS Pro eine höhere Racemisierungsrate festgestellt werden. Der höchste Gehalt an D-Ala mit 20,1 % wurde nach 9 h Erhitzung von Fru-L-Ala detektiert. Im Vergleich dazu wurde der höchste Gehalt an D-Pro mit 8,2 % nach

15 h Erhitzung von Fru-L-Pro bestimmt. Bei allen Versuchen konnte kein zeitabhängiger Anstieg der Racemisierungsraten über die Erhitzungsperiode von 24 h festgestellt werden. Ein durchschnittlicher Racemisierungsgrad wurde sowohl für die Verbindung Fru-L-Ala als auch für die Verbindung Fru-L-Pro schnell erreicht und maßgebliche Änderungen bzw. große Schwankungen der Racemisierungsraten waren nicht zu beobachten. Beim Vergleich der Racemisierungsraten der freien AS und der Bestimmung der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS konnten sowohl für Fru-L-Ala als auch für Fru-L-Pro geringfügig höhere D-AS-Gehalte nach vorheriger Totalhydrolyse detektiert werden.

3.4.2 Erhitzungsexperimente mit nichtproteinogenen Aminosäuren und Amadori-Verbindungen in der Probenmatrix Honig

Abbildung 3-21 zeigt das DL-AS-Standard-Chromatogramm der chiralen Trennung auf Chirasil®-L-Val der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg. Für alle verwendeten AS konnte eine Basislinien-Trennung der jeweiligen Enantiomerenpaare erzielt werden. Die Bedingungen der angewendeten Methode werden in Kapitel 2.9.1.7 gezeigt. Die für die Methodenvalidierung bestimmten Responsefaktoren sind im Anhang (Tabelle A-7) aufgeführt.

Eine Ergebnisübersicht der absoluten Gehalte der mittels GC-SIM-MS detektierten L- und D-AS der Erhitzungsexperimente (vgl. Kapitel 2.8.2) ist in Tabelle 3-11 dargestellt, die aus diesen Ergebnissen berechneten relativen Gehalte (%D=D/(D+L)*100) sind in Abbildung 3-22 dargestellt. Die Ergebnisse nach Zugabe der nichtproteinogenen AS in eine Honigprobe sind mit den Buchstaben A (Analyse der freien AS) und B (Analyse der AS nach Totalhydrolyse) gekennzeichnet und die Ergebnisse nach Zugabe der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen sind mit den Buchstaben C (Analyse der freien AS) und D (Analyse der AS nach Totalhydrolyse) gekennzeichnet.

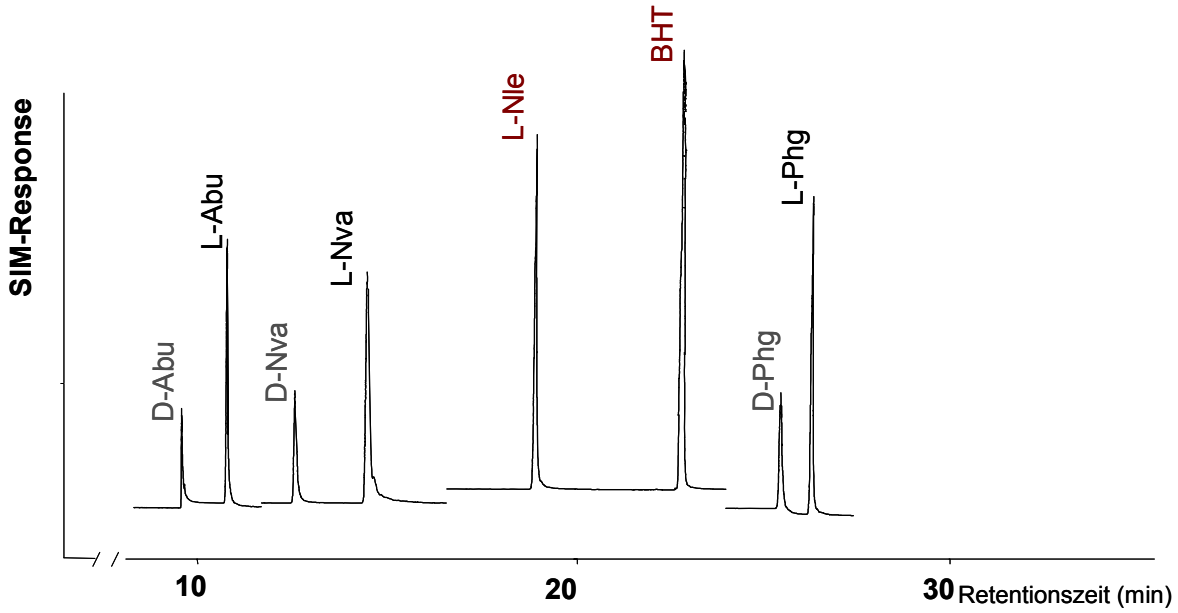


Abb. 3-21 **GC-SIM-MS DL-Standard (vgl. Kapitel 2.5.3.2) der nichtproteinogenen AS derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7**

Als Blindwert werden die Ergebnisse der Racemisierungsraten der unerhitzten Proben definiert. Geringe Mengen der entsprechenden D-Enantiomere, für Abu und Nva zwischen 0,03 und 0,12 mg/100g Honig und für Phg zwischen 0,02 und 0,90 mg/100g Honig, konnten bereits in den Ausgangsprodukten bzw. Versuchsansätzen detektiert werden.

Nach der Erhitzung der Honigproben konnte in jedem Experiment eine Bildung bzw. eine Konzentrationsänderung an D-AS nachgewiesen werden. Für alle Ergebnisse A-D (vgl. Tabelle 3-11) wurde eine zeitabhängige Abnahme der absoluten Gehalte an L-AS während der Erhitzungsexperimente beobachtet, wohingegen die absoluten Gehalte an D-AS zuerst anstiegen und im weiteren Verlauf wieder abnahmen.
Über die gesamte Versuchreihe stieg der detektierte Gehalt an D-AS nicht höher als 2 mg/100g Honig (50 mg an L-AS wurden in100 g Honig gelöst und erhitzt).

A) Für Versuchsreihe A (vgl. Tabelle 3-11) konnten für D-Abu mit 0,68 mg/100g Honig und für D-Nva mit 0,56 mg/100g Honig nach 30 min Erhitzung die höchsten absoluten Werte detektiert werden. Für die AS Phg wurde bereits nach 15 min mit

1,46 mg/100g Honig der höchste Gehalt bestimmt. Auffällig bei dieser AS ist der geringe L-AS-Gehalt in der Ausgangssubstanz (Blindwert). Von den zugesetzten 50 mg Phg/100g Probe konnten nur 26,21 mg Phg/100g Probe wieder nachgewiesen werden.
Für die AS Abu wurden relative Gehalte von 0,1 % im Ausgangsmaterial (BW) bis hin zu 2,6 % D-AS nach Erhitzung bei 130 °C für 120 min detektiert. Für die AS Nva wurden relative Gehalte zwischen 0,1 % (BW) bis 5,7 % D-Enantiomer und für Phg Werte von 1,6 % (BW) bis 21,4 % nach 120 min Hitzeeinwirkung detektiert. Insgesamt zeigte die AS Phg das beste Racemisierungsverhalten. Bereits nach 15-minütiger Erhitzung wurde ein relativer Gehalt von 10,9 % des D-Enantiomers detektiert. Dieses Ergebnis ist sehr gut in Abbildung 3-23 zu sehen, welche die Chromatogramme der zeitabhängigen Racemisierung der nichtproteinogenen AS über die Erhitzungsperiode von 120 min darstellt.

B) Die Analysen der freien und nach Totalhydrolyse aus den Amadori-Verbindungen freigesetzten AS (vgl. Tabelle 3-11; Daten B) zeigten ebenfalls nach 30-minütiger Erhitzung die höchsten absoluten Gehalte für die AS D-Abu mit 0,59 mg/100g Honig und für die AS D-Nva mit 0,69 mg/100g Honig und nach 15-minütiger Erhitzung für die AS D-Phg mit 1,11 mg/100g Honig. Sowohl die Ergebnisse der Versuche A als auch die Ergebnisse für B zeigten, dass bei allen drei analysierten AS zunächst ein Anstieg an D-AS bis zu einem Maximum zu beobachten war und anschließend die absoluten Gehalte im weiteren Verlauf der Experimente wieder abnahmen. Für Abu wurden relative Gehalte der D-Enantiomere zwischen 0,2 % im Ausgangsmaterial (BW) bis zu 4,1 % nach 120-minütiger Erhitzung bei 130 °C detektiert und für Nva relative Gehalte zwischen 0,3 % im BW und 4,3 % nach 120-minütiger Erhitzung bei 130 °C.
Beim Vergleich der nichthydrolisierten Proben (Daten A) mit den hydrolisierten Proben (Daten B) konnten für die AS L-Abu nur geringfügige Unterschiede der ermittelten Gehalte festgestellt werden, während die absoluten Gehalte der AS L-Nva nach Totalhydrolyse deutlich höher waren. Der größte Unterschied der beiden Experimente wurde für die AS Phg bestimmt. Besonders der relative Gehalt nach 120-minütiger Erhitzung erhöhte sich mit 39,1 % im Vergleich zu 21,4 % D-Phg nach Bestimmung der freien AS sehr stark.

Tab. 3-11 Absolute Gehalte (mg/100g Honig) der D- und L-Enantiomere der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg nach Zugabe von L-Abu, L-Nva und L-Phg (Daten A + B) bzw. Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg (Daten C + D) zur Probenmatrix Honig und anschließender Erhitzung bei 130 °C über verschiedene Zeitintervalle; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7

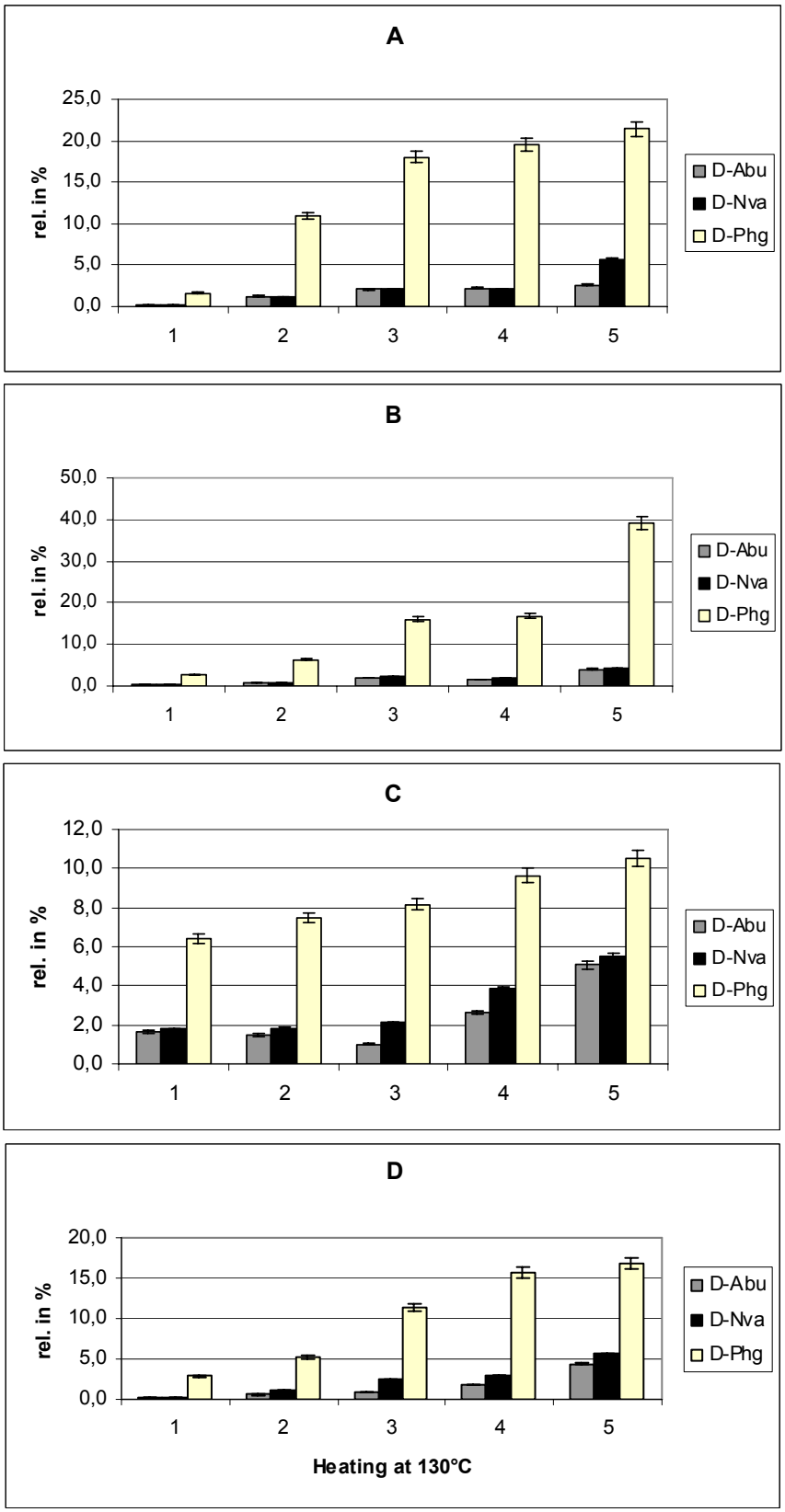
A	BW	15 min/130°C	30 min/130°C	60 min/130°C	120 min/130°C
D-Abu	0,06	0,49	0,68	0,32	0,13
L-Abu	51,28	38,97	31,68	13,88	5,14
D-Nva	0,05	0,42	0,56	0,25	0,15
L-Nva	47,89	33,69	25,07	11,06	2,50
D-Phg	0,44	1,46	1,23	1,45	0,29
L-Phg	26,21	11,85	5,61	1,85	1,07

B	BW	15 min/130°C	30 min/130°C	60 min/130°C	120 min/130°C
D-Abu	0,09	0,29	0,59	0,18	0,23
L-Abu	51,76	37,02	29,41	12,01	5,42
D-Nva	0,15	0,30	0,69	0,46	0,30
L-Nva	49,54	45,85	31,45	21,94	6,67
D-Phg	0,67	1,11	0,92	0,78	0,64
L-Phg	24,75	16,69	4,86	3,89	1,00

C	BW	15 min/130°C	30 min/130°C	60 min/130°C	120 min/130°C
D-Abu	0,04	0,24	0,13	0,13	0,20
L-Abu	2,43	15,78	13,15	4,69	3,71
D-Nva	0,03	0,14	0,12	0,13	0,06
L-Nva	1,84	7,52	5,56	3,16	1,06
D-Phg	0,02	0,06	0,04	0,01	0,01
L-Phg	0,22	0,71	0,40	0,11	0,08

D	BW	15 min/130°C	30 min/130°C	60 min/130°C	120 min/130°C
D-Abu	0,12	0,19	0,22	0,14	0,16
L-Abu	51,59	32,85	22,79	7,48	3,48
D-Nva	0,08	0,22	0,30	0,11	0,13
L-Nva	44,10	18,94	12,17	3,77	2,24
D-Phg	0,90	0,06	0,37	0,02	0,02
L-Phg	30,29	1,00	2,91	0,10	0,10

A: Analyse der freien AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AS; **B**: Analyse der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AS; **C**: Analyse der freien AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AV; **D**: Analyse der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AV; BW: Blindwert. Daten beziehen sich auf die Mittelwerte der Doppelbestimmung; relative Standardabweichungen der AS Abu, Nva und Phg < 7 %



A: Analyse der freien AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AS

B: Analyse der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AS

C: Analyse der freien AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AV

D: Analyse der freien und nach Totalhydrolyse freigesetzten AS nach der Erhitzung der nichtproteinogenen AV

1: BW (Blindwert)
2: 15 min/130°C
3: 30 min/130°C
4: 60 min/130°C
5: 120 min/130°C

Daten beziehen sich auf die Mittelwerte der Doppelbestimmung.

Rel. Standardabweichungen der AS Abu, Nva und Phg < 7 %

Abb. 3-22 **Relative D-AS Gehalte (%D=D/(D+L)*100) der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg nach Zugabe von L-Abu, L-Nva und L-Phg bzw. Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg zur Probenmatrix Honig und anschließender Erhitzung bei 130 °C über verschiedene Zeitintervalle; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7**

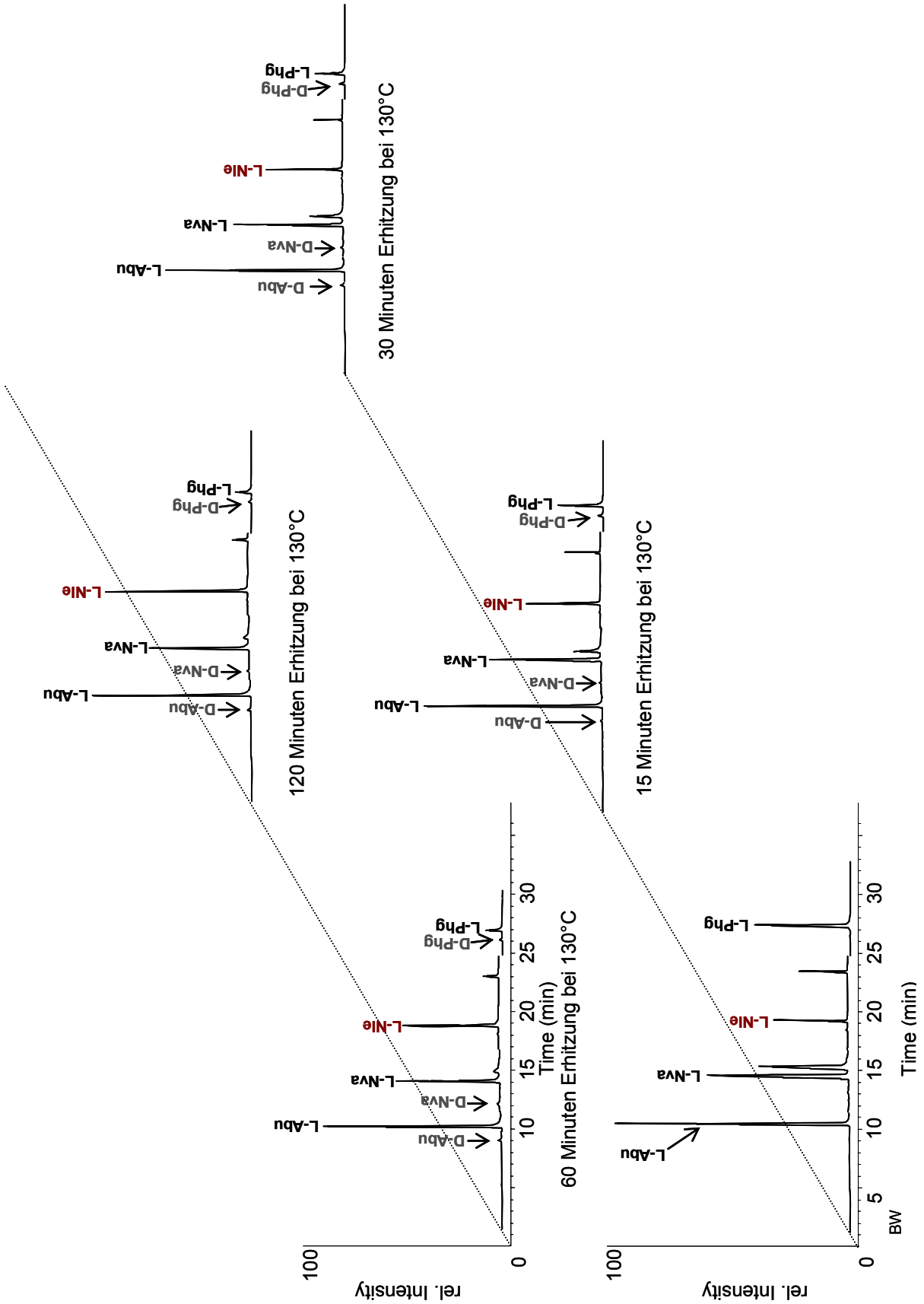


Abb. 3-23 GC-SIM-MS Chromatogramm der zeitabhängigen Racemisierung der nichtproteinogenen AS nach Zugabe der nichtproteinogenen AS zur Probenmatrix Honig während der Erhitzung über einen Zeitraum von 120 Minuten bei 130 °C; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7

Der Vergleich der Blindwerte der D-AS von A und B zeigte zudem, dass durch die Totalhydrolyse keine deutliche Zunahme der Racemisierung stattgefunden hat und somit die Zunahme der absoluten D-AS Gehalte bei Experiment B nicht durch die Totalhydrolyse induziert war. Insgesamt konnte sowohl für A als auch für B ein nahezu kontinuierlicher Anstieg der relativen Gehalte über den gesamten Erhitzungsverlauf von 120 min festgestellt werden.
Auch bei dieser Versuchsreihe wurde für die AS Phg mit 24,75 mg/100g ein sehr geringer L-AS-Gehalt in der Ausgangssubstanz (Blindwert) festgestellt.

C) Die Ergebnisse der Bestimmung der freien AS nach Erhitzung der zugesetzten AV sind in Tabelle 3-11 unter C dargestellt. Der höchste absolute Gehalt an D-AS wurde bei allen AS bereits nach 15 min Erhitzung erreicht. Insgesamt konnte für diese Versuchsanordnung nur ein sehr geringer Gehalt an freigesetzten AS, beispielsweise für L-Abu mit maximalen Werten bis zu 15,78 mg/100 g Honig, beobachtet werden. Weiterhin wurde für alle L-AS ein kontinuierlicher Abbau der detektierten AS über die gesamte Erhitzungsperiode von 15 bis 120 min festgestellt. Der Blindwert der AS Phg zeigte mit einem relativen Gehalt von 6,4 % bereits eine sehr hohe Racemisierung im Ausgangsmaterial. Des Weiteren wurden für Abu relative Gehalte der D-Enantiomere von 1,6 % bis zu 5,1 % detektiert. Verglichen mit den Ergebnissen nach Zugabe der proteinogenen AS konnte für D-Abu nur nach einer Erhitzungszeit von 120 min ein höherer relativer Gehalt des D-Enantiomers mit 5 % (Daten C) im Vergleich zu 2,6 % (Daten A) detektiert werden. Für Nva wurden relative Gehalte des D-Enantiomers von 1,8 % bis 5,5 % und für Phg Werte von 6,4 % bis 10,5 % detektiert, wohingegen das Racemisierungsverhalten von Phg bei dieser Versuchsreihe deutlich geringer war als bei der Bestimmung der freien AS nach Zugabe der AS in die Honigprobe. Insgesamt konnte auch bei dieser Versuchsreihe ein nahezu kontinuierlicher Anstieg der relativen Gehalte beobachtet werden.

D) Wie zu erwarten war, konnten für die Versuchsreihe D sowohl für die L-AS als auch für die meisten D-AS höhere Gehalte bestimmt werden, als im Vergleich zu Versuchsreihe C ohne vorangegangene Totalhydrolyse.

Weiterhin konnte ein kontinuierlicher Abbau bzw. eine Abnahme der absoluten L-AS-Gehalte im Verlauf der Erhitzung über 120 min festgestellt werden.
Die höchsten absoluten Gehalte an D-Enantiomeren der verwendeten AS wurden nach 30-minütiger Hitzeeinwirkung detektiert. Auch bei diesem Versuch stiegen die Werte zunächst bis zu einem Maximum an und sanken im weiteren Verlauf der Erhitzung wieder. Nach der Totalhydrolyse der Honigproben wurden für Abu relative D-Enantiomeren-Gehalte von 0,2 % bis 4,4 %, für Nva von 0,6 bis 5,7 % und für Phg 2,9 bis 16,8 % detektiert. Im Vergleich zur Analyse der freien AS (Daten C) konnte eine signifikante Änderung der detektierten Gehalte (insbesondere der L-AS) festgestellt werden. Die durchgeführte Totalhydrolyse führte zu einer vollständigen Freisetzung der in den AV gebundenen AS.

3.4.3 Qualitativer Nachweis der Bildung von nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen nach Zugabe von nichtproteinogenen AS in Honig und anschließender Erhitzung der Probenmatrix für 30, 60 und 120 Minuten bei 130 °C

Die nach Kapitel 2.8.2.1 erhitzten Honigproben wurden auf die Bildung von Amadori-Verbindungen analysiert. Die Extraktion der Amadori-Verbindungen erfolgte, wie in Kapitel 2.9.2.1 beschrieben, mittels Festphasenextraktion. Abbildung 3-24 zeigt beispielsweise das HPLC-ESI-MS Chromatogramm mit den entsprechenden protonierten Molekülionen $[M+H]^+$ der einzelnen Amadori-Verbindungen nach 120 minütiger Erhitzung bei 130 °C.

Nach Zugabe der nichtproteinogenen AS und anschließender Erhitzung konnte die Bildung der aus diesen AS hervorgehenden Amadori-Verbindungen Fru-Abu, Fru-Nva und Fru-Phg nach 30 min, 60 min und 120 min nachgewiesen werden. Abbildung 3-25 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung der Amadori-Verbindungen. Die detektierten Intensitäten der einzelnen Amadori-Verbindungen nahmen im zeitlichen Verlauf über 120 min zu. Bereits nach 30 min zeigte sich eine deutliche Bildung der Amadori-Verbindung Fru-Nva im Vergleich zu den Verbindungen

Fru-Abu und Fru-Phg. Im weiteren Verlauf der Erhitzung wurden dann auch die Amadori-Verbindungen Fru-Abu und Fru-Phg verstärkt gebildet, so dass nach 120-minütiger Erhitzung relativ gleiche Intensitäten aller Amadori-Verbindungen detektiert werden konnten.

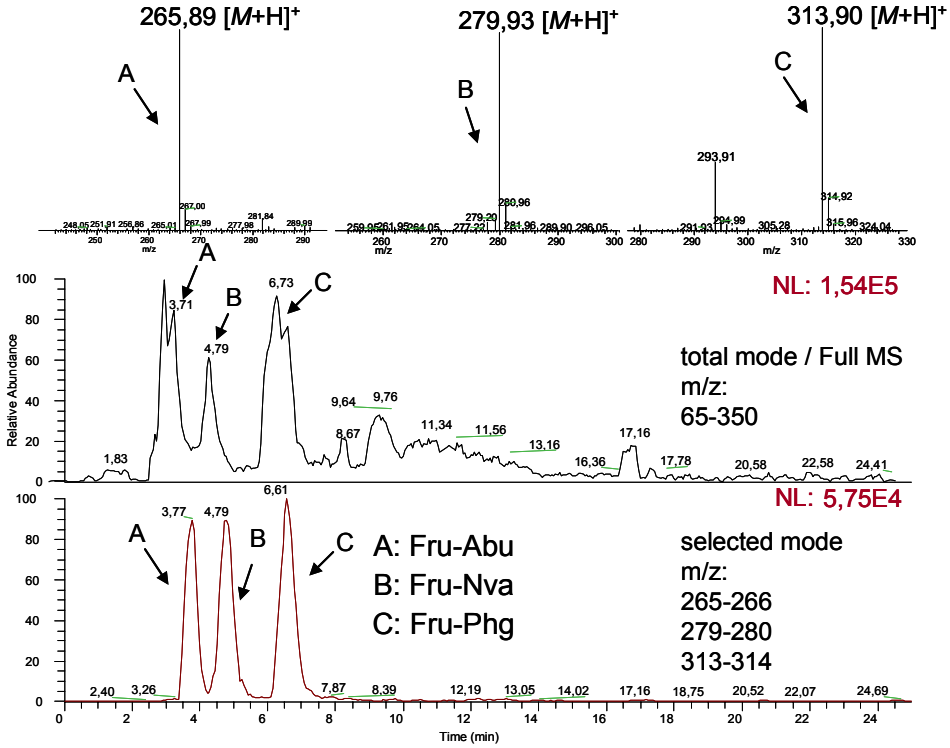


Abb. 3-24 **HPLC/TIC- und SIM-ESI-MS Chromatogramme mit den entsprechenden charakteristischen protonierten Molekülionen der detektierten AV nach Zugabe der nichtproteinogenen AS L-Abu, L-Nva und L-Phg in die Probenmatrix und anschließender Erhitzung bei 130 °C für 120 Minuten; Bedingungen siehe Kapitel 2.7**

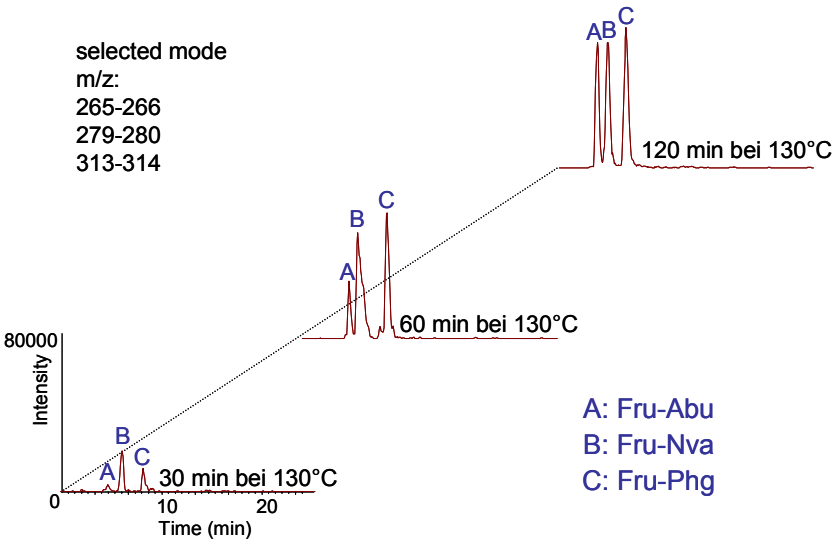


Abb. 3-25 **HPLC/SIM-ESI-MS Chromatogramme nach Zugabe der nichtproteinogenen AS L-Abu, L-Nva und L-Phg in die Probenmatrix und anschließender Erhitzung bei 130 °C für 30, 60 bzw. 120 Minuten; Bedingungen siehe Kapitel 2.7**

3.4.4 Diskussion

Die enantioselektive Analyse nach Hydrolyse mit 6 N HCl bei 100 °C für 18 h (Bestimmung der Blindwerte) der synthetisierten proteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala und Fru-L-Pro und der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg zeigte eine Freisetzung von ca. 98 % der L-AS und einen maximalen Anteil von 2 % der D-AS (vgl. Tabelle 3-10, Tabelle 3-11 und Abbildung 3-22). Diese Daten zeigen, dass sich die Konfiguration der eingesetzten L-AS während der Synthese nur minimal geändert hatte und die entstandenen Fructose-Aminosäuren nahezu alle in der L-Konfiguration vorlagen.

Die synthetisierten Standardsubstanzen zeigten somit keine signifikante Racemisierung nach der durchgeführten Synthese und Aufreinigung mittels Ionenaustauscher bzw. Säulenchromatographie. Verglichen mit den Ergebnissen ohne vorherige Totalhydrolyse führte auch die durchgeführte Totalhydrolyse nur geringfügig zu einem Anstieg der Racemisierung zwischen 0,1 und 0,8 %. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine säurekatalysierte Racemisierung der Amadori-Verbindungen bzw. der gebundenen und durch Totalhydrolyse freigesetzten AS nicht die Ursache für die in dieser Arbeit detektierten Enantiomerisierungsreaktionen war. Die Temperaturwahl von 130 °C entspricht ungefähr der Temperatur, die

beispielsweise beim Sterilisieren auf Lebensmittel einwirkt. Für die Erhitzungsversuche wurden nur L-Enantiomere eingesetzt, da zum einen fast nur diese Konfiguration in unbehandelten Lebensmitteln zu finden ist und zum anderen in Versuchen gezeigt wurde, dass eine Diskriminierung zwischen L- und D-AS nicht zu erwarten ist (FRIEBERTSHÄUSER et al. 2004; MAYER et al. 2006; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a; BOSSE et al. 2010). Die Ergebnisse der L-AS in dieser Arbeit sind somit auch für die D-Konfigurationen zu erwarten.

3.4.4.1 Racemisierung von AS in Folge der Erhitzungsversuche

Amadori-Verbindungen mit proteinogenen AS: In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Erhitzung von Lebensmitteln, die reich an reduzierenden Zucker und L-AS sind, zur Bildung von D-AS-Enantiomeren führen kann (ERBE und BRÜCKNER 2000a, 2000b; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005a, 2005b; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a, 2006b; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein Reaktionsmechanismus postuliert (vgl. Kapitel 1.3.1.3), dessen Grundlage die Freisetzung von D-AS als Folge des thermischen oder zeitabhängigen Abbaus von Amadori-Verbindungen bzw. Heyns-Verbindungen ist. Es wird angenommen, dass durch Enolisierung der Amadori-Verbindung die Bildung eines Carbanions der beteiligten AS als intermediäres Produkt begünstigt wird. Bei Reprotonierung desselben erfolgt eine partielle Racemisierung der AS, da der Angriff des Protons aufgrund des sp^2-hybridisierten, weitgehend planaren Zustandes des Atoms von beiden Seiten erfolgen kann (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a).

Um diesen Mechanismus zu erhärten und den thermischen Einfluss auf die Racemisierung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit standardisierte Erhitzungsversuche mit den synthetisierten Amadori-Verbindungen Fru-L-Ala und Fru-L-Pro durchgeführt.

Hierzu wurden (a) die reinen Amadori-Verbindungen totalhydrolysiert, (b) die Amadori-Verbindungen erhitzt und die freigesetzten AS-Enantiomere untersucht, (c)

die Amadori-Verbindungen erhitzt, totalhydrolysiert und die freigesetzten AS-Enantiomere analysiert.
Die freigesetzten AS wurden jeweils mittels Kationenaustauschchromatographie isoliert, anschließend derivatisiert und mittels enantioselektiver GC-MS analysiert.

Die Freisetzung von AS während der Erhitzung von Amadori-Verbindungen erfolgt vor allem bei der Bildung von 1- und 3-Desoxyosonen (vgl. Kapitel 1.2) im Zuge der ablaufenden Maillard-Reaktion. Die Totalhydrolysen wurden durchgeführt, um auch die an die Amadori-Verbindungen oder an deren Folgeprodukte (wie z. B. die 4-Desoxyosone) noch gebundenen AS zu erfassen (LEDL und SCHLEICHER 1990; YAYLAYAN und HUYGHUES-DESPOINTES 1994).

Im Vergleich zu den nicht erhitzten Ausgangsproben zeigten alle erhitzten Proben deutlich höhere Gehalte an D-Enantiomeren (vgl. Tabelle 3-10). Würde eine Racemisierung bereits in Vorstufen der Maillard-Reaktion oder vor der Bildung bzw. in dieser Arbeit, vor der Synthese der Amadori-Verbindungen stattfinden, wie es in einem Mechanismus von BRÜCKNER et al. 2002 beschrieben wird, so müssten die detektierten Werte an D-AS im nicht erhitzten Ausgangsmaterial (vgl. Tabelle 3-10; BW) wesentlich höher sein. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stehen in einem guten Einklang mit dem von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) beschriebenen Mechanismus und zeigen, dass eine partielle Racemisierung von AS erst nach dem Erhitzen und der Freisetzung der AS durch den Abbau der Amadori-Verbindungen im Verlaufe der Maillard-Reaktion stattfindet.

Der Racemisierungsgrad der proteinogenen AS Ala und Pro zeigte während der Erhitzungsperiode über 24 h bei 130 °C keine großen Schwankungen. Es konnte auch kein zeitabhängiger Anstieg in allen durchgeführten Versuchen beobachtet werden. Stattdessen stellte sich bereits nach kurzer Erhitzungszeit (ca. 1 h) ein gleichbleibender Racemisierungsgehalt ein (vgl. Abbildung 3-26).

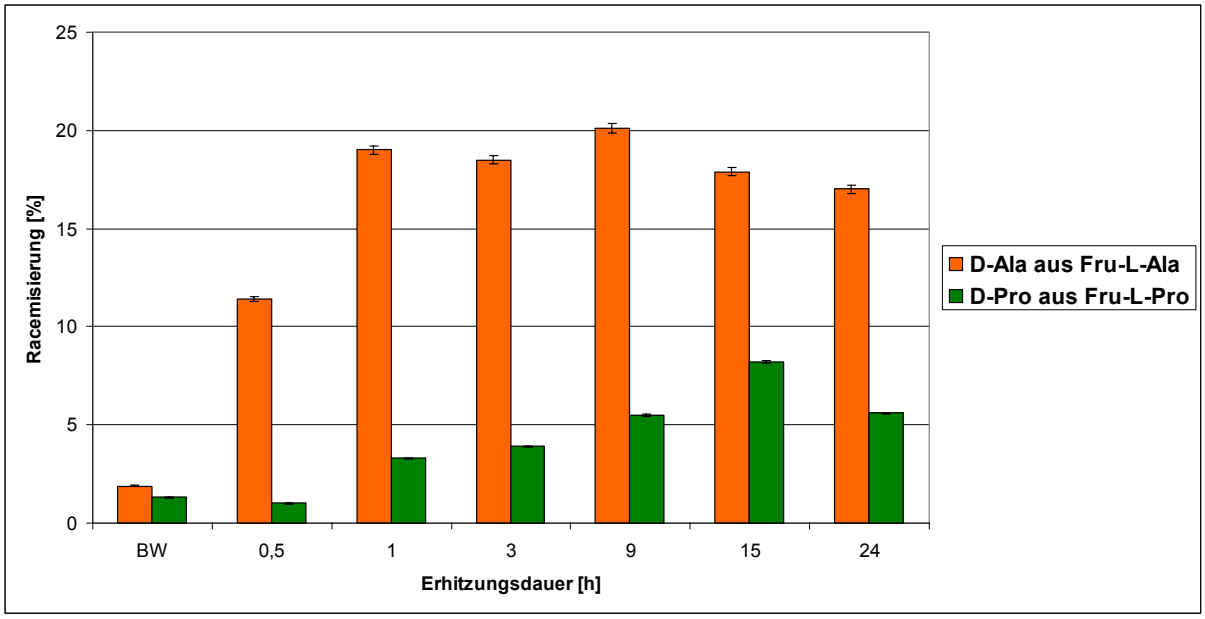


Abb. 3-26 **Zeitabhängige Racemisierung der AS aus Fru-L-Ala (orange) und Fru-L-Pro (grün) nach Erhitzung (130 °C), Totalhydrolyse und Aufarbeitung mittels Kationenaustauscher; BW: Blindwert**

Diese beobachtete Stagnation der relativen D-AS Gehalte führte zu der Annahme, dass aufgrund des äquimolaren Verhältnisses von AS zu reduzierendem Zucker (wird in Folgeprodukte ab- bzw. umgebaut) eine erneute Reaktion der freigesetzten AS mit einem Zuckermolekül ausgeschlossen wird und somit eine weitere Enantiomerisierung nicht stattfinden kann. Folglich änderte sich das detektierte Verhältnis D- zu L-AS über den Erhitzungszeitraum von 24 h nur geringfügig. Ein möglicher Grund könnte sein, dass gleiche Gehalte an L- bzw. D-Enantiomeren freigesetzt wurden bzw. gleiche Racemisierungsraten stattfanden und bereits freigesetzte AS im weiteren Verlauf der Erhitzung abgebaut oder in Folgeprodukte eingebaut wurden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass nach 1 h alle vorliegenden Amadori-Verbindungen bereits an Folgereaktionen beteiligt waren und die möglichen Racemisierungen bereits alle stattgefunden hatten. Die detektierten Änderungen der relativen Gehalte wurden dann nur noch durch den Abbau bzw. die Weiterreaktion der freigesetzten AS beeinflusst. Dies ist möglich aufgrund der Tatsache, dass am Ende der Maillard-Reaktion die AS irreversibel zu „Strecker-Aldehyden“, heterozyklischen Aroma-Komponenten oder zu nieder- bzw. auch zu hochmolekularen Verbindungen (z. B. Melanoidinen) weiter reagieren (HOFMANN und HEUBERGER 1999; HOFMANN und SCHIEBERLE 2000).

Tabelle 3-10 zeigt, dass der Grad der detektierten Racemisierung nach der Erhitzung bei 130 °C für Fru-L-Ala, sowohl nach der direkten Bestimmung der freien AS als auch mit vorangestellter Totalhydrolyse, im Vergleich zur Amadori-Verbindung Fru-L-Pro signifikant höher war. Pro ist eine sekundäre AS, bei der die Bildung eines sp^2-hybridisierten Carbanions unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen (vgl. Kapitel 2.8.1) offensichtlich durch die sekundäre Aminogruppe gehemmt wird. Die cyclische Seitenkette der AS Prolin führt zu einer sterischen Hinderung, resultierend in geringen elektronenziehenden Effekten, die eine Protonenabstraktion und eine anschließende Reprotonierung am *α*-C-Atom erschweren. Dies ist eine mögliche Erklärung, warum der Racemisierungsgrad der Amadori-Verbindung Fru-Pro sowohl in den hier beschriebenen Untersuchungen viel geringer war als der von Fru-Ala als auch in Versuchen von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006b) im Vergleich zur untersuchten Amadori-Verbindung Fru-Phe (vgl. Kapitel 3.3.3). Aufgrund der relativ großen Präsenz in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft wurde die AS Pro dennoch bewusst für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ausgewählt. Ein Beispiel stellt Honig dar, der ebenso reich an reduzierenden Zuckern ist und daneben relativ große Mengen (vgl. Tabelle 3-8) an verschiedenen AS enthält (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a). Auch die AS Ala wurde bewusst für die Synthese der Amadori-Verbindungen ausgewählt. Zum einen aufgrund des weitverbreitenden Vorkommens und zum anderen aufgrund diverser Nachweise des entsprechenden D-Enantiomers in Lebensmitteln.

COLEMAN und CHUNG (2002) verglichen den thermisch induzierten Abbau der ausgewählten Amadori-Verbindungen Fru-Valin (Fru-Val), Fru-Leucin (Fru-Leu), Fru-Asparagin (Fru-Asn) und Fru-Threonin (Fru-Thr). Sie stellten fest, dass die Reaktionsfähigkeit der ausgewählten Amadori-Verbindungen vom jeweiligen Substituenten, also der verwendeten AS, abhängig war. So besitzen die AS Asn und Thr mit einer Carbonyl- bzw. mit einer Hydroxylgruppe sehr reaktive Zentren mit elektronenziehenden Effekten. Dieser elektronenziehende Effekt bewirkt möglicherweise, dass die Protonenabstraktion und die anschließende Reprotonierung, die eine Racemisierung zur Folge haben können, erleichtert wird und somit diese AS einen höheren Racemisierungsgrad aufweisen. Die Seitenketten

der AS Val und Leu bestehen hingegen aus Alkylgruppen mit weniger induktiven Effekten bzw. elektronenschiebenden Effekten.

Auch WESTPHAL et al. (1988a, 1988b) detektierten freie AS nach der Erhitzung von Fru-AS. Es wurde postuliert, dass mit zunehmender Erhitzungsdauer die AS einem Abbau bzw. einem Einbau in heterozyklische oder polymere Strukturen unterliegen. Zudem zeigten die Autoren, dass je nach AS ein schnellerer bzw. langsamerer Abbau der Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit von Temperatur und/oder dem pH-Wert stattfindet.

Somit sind sowohl die Tendenz für eine mögliche Racemisierung als auch letztendlich der Racemisierungsgrad abhängig von sterischen Effekten, kontrolliert durch die jeweiligen Seitenketten der AS. PÄTZOLD und BRÜCKNER (2005a) erklären beispielsweise das Vorkommen von D-Ala in vielen Lebensmitteln mit dessen günstigem Aufbau. Neben geringer sterischer Behinderung zeigt Ala eine hinreichende Tendenz zur Bildung eines intermediären Carbanions mit anschließendem moderatem Abbau. Bezugnehmend auf den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Mechanismus wird gezeigt, dass der Nachweis des D-Enantiomers der AS Ala nicht unbedingt mit einem mikrobiellen Verderb der analysierten Lebensmittel (vgl. Kapitel 1.3) zusammenhängen muss und auch nicht unbedingt auf einer enzymatisch induzierten Racemisierung beruht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Erhitzung der synthetisierten Amadori-Verbindungen bei 130 °C eine Enantiomerisierung der eingesetzten L-AS zur Folge hatte. Zudem zeigen diese Ergebnisse, dass die Interpretation von relativen Gehalten sehr schwierig ist und eine Bestimmung der absoluten Gehalte für genauere Aussagen unabdingbar erscheint. Aus diesem Grund wurden für die Erhitzungsversuche der nichtproteinogenen AS sowohl die relativen als auch die absoluten Gehalte bestimmt.
In Folgeversuchen wurden sowohl die AS L-Abu, L-Nva und L-Phg als auch die synthetisierten Amadori-Verbindungen Fru-L-Abu, Fru-L-Nva und Fru-L-Phg in weiteren Erhitzungsversuchen in der Probenmatrix Honig erhitzt. Durch Verwendung der nichtproteinogenen AS sollte gezeigt werden, dass nur die durchgeführte

Erhitzung und die damit induzierte Maillard-Reaktion (u. a. bedingt durch den hohen Anteil an reduzierenden Zuckern im Honig) die Grundlage der Entstehung von D-AS war bzw. ist.

Nichtproteinogene Aminosäuren und synthetische Amadori-Verbindungen: Basierend auf der Reaktion von Glucose und Fructose mit AS hatten bereits BRÜCKNER et al. (2002) postuliert, dass D-AS aus den ersten stabilen Zwischenprodukten der Maillard-Reaktion (den Amadori- und Heyns-Verbindungen) über den beschriebenen sp^2-Hybridisierungsmechanismus entstehen können. Diese Verbindungen entstehen durch Reaktion von reduzierenden Zuckern mit AS. Honig ist sowohl reich an Glucose als auch an Fructose und enthält ebenso zahlreiche AS. Folglich ist eine Bildung von Amadori- und/oder Heyns-Verbindungen zu erwarten (JAKAS et al. 2008; KRAUSE et al. 2008) bzw. nachzuweisen (vgl. Kapitel 3.3.2). Bezugnehmend auf den postulierten Mechanismus (PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a) ist die Entstehung von D-AS über beide Verbindungen möglich. Dies wird u. a. durch Racemisierungsversuche von KIM und LEE (2008, 2009) mit Fructose und Glucose als Reaktionspartner verschiedener AS bestätigt (vgl. Kapitel 3.3.3). Bei beiden Zuckermolekülen konnte nach Erhitzungsversuchen eine Enantiomerisierung der eingesetzten AS beobachtet werden. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden u. a. von FRIEBERTSHÄUSER et al. (2004), JANKOWSKI et al. (2009) und BOSSE et al. (2010) Erhitzungsversuche von AS mit verschiedenen reduzierenden Zuckern durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen konnte eine Enantiomerisierung in Übereinstimmung mit dem postulierten Mechanismus festgestellt werden.

Durch Zugabe der nichtproteinogenen L-AS Abu, Nva und Phg zum Medium Honig sollte ausgeschlossen werden, dass die Ursache einer Enantiomerisierung bereits vor der Lagerung der fertigen Honige (evtl. auch durch den Einfluss der Bienen, z. B. durch Enzyme) verursacht wurde und somit eine Racemisierung nur durch die bei der Lagerung oder Erhitzung ablaufende Maillard-Reaktion induziert werden sollte.
Tabelle 3-11 zeigt anhand der Blindwerte (Daten A und B), dass die zugesetzten AS Abu und Nva (Sollwert: 50 mg/100g Honig) im Ausgangsmaterial für die Erhitzung mit Werten zwischen 47,89 mg/100g und 51,76 mg/100g Honig wieder nachgewiesen werden konnten. Die zugesetzte Menge der AS Phg konnte jedoch

mit Werten zwischen 24,75 mg/100g und 26,21 mg/100g Honig nicht bestätigt werden. Auch nach Zugabe der synthetisierten Amadori-Verbindungen zeigte sich ein ähnliches Bild. Nach Totalhydrolyse (Daten D) waren die AS Abu und Nva mit Werten zwischen 44,10 mg/100g und 51,59 mg/100g Honig gut wiederzufinden, während auch hier für die AS Phg mit einem Wert von 30,29 mg/100g Honig ein deutlich zu geringer Gehalt detektiert wurde. Auch der Gehalt sowohl der L- als auch der D-AS von Phg nahm während der Erhitzungsversuche sehr stark ab, besonders nach der durchgeführten Totalhydrolyse wurden nur noch sehr geringe Gehalte der eingesetzten L-AS detektiert. Dies erklärt, warum für Phg im Vergleich zu den AS Abu und Nva relativ hohe Racemisierungsraten detektiert wurden und zeigt zugleich, dass die Bestimmung der absoluten Gehalte für genaue Aussagen zur Racemisierung wichtig ist. Des Weiteren wird aber auch das gute Racemisierungsverhalten durch die Struktur der AS bestimmt. Phg besitzt ebenso wie die AS Phe einen Benzolring in der AS Seitenkette, der wiederum einen elektronenziehenden Effekt besitzt. Somit werden auch bei dieser AS möglicherweise eine Protonenabstraktion und eine anschließende Reprotonierung erleichtert. Die Ursachen für die geringe Wiederfindung (Daten BW) der eingesetzten Menge dieser AS könnten zum einen in der schlechten Löslichkeit dieser AS im Medium Honig und somit auch in einer schlechten Homogenität begründet sein und zum anderen durch eine große Empfindlichkeit gegenüber Folgereaktionen, die durch den Erhitzungsverlauf begünstigt werden. Auszuschließen ist hingegen ein möglicher Verlust während der Derivatisierung (vgl. Kapitel 2.9) aufgrund der Tatsache, dass für die eingesetzten Standardsubstanzen nach der Probenaufbereitung keine größeren Verluste detektiert wurden (vgl. Kapitel 2.11 und Tabelle A-7).

Auch die Ergebnisse dieser Erhitzungsversuche bekräftigen den vorgeschlagenen Mechanismus (PÄTZOLD et al. 2006a) zur Entstehung von D-AS im Zuge der ablaufenden Maillard-Reaktion, denn nahezu alle erhitzten Proben zeigten sowohl relativ als auch absolut höhere Racemisierungswerte nach der Erhitzung im Vergleich zu den unerhitzten Proben (vgl. Tabelle 3-11 und Abbildung 3-22).

Des Weiteren konnte bei diesen Experimenten eine zeitabhängige Zunahme der relativen Racemisierungsraten (vgl. Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23) über den Erhitzungszeitraum von 120 min beobachtet werden. Der nahezu kontinuierliche Anstieg der relativen Gehalte war darauf zurückzuführen, dass sich die absoluten Gehalte an bereits vorhandenen freien L- und D-AS während der Erhitzung abbauten, die D-AS aber kontinuierlich durch die Erhitzung weiter gebildet wurden. Somit änderte sich das Verhältnis L- zu D-Enantiomeren über den Erhitzungsverlauf. Die Schwankungen der detektierten absoluten Gehalte an D-Enantiomeren (vgl. Tabelle 3-11) zeigten, dass immer wieder neue D-AS gebildet wurden, während die bereits vorhandenen freien D-AS durch das Voranschreiten der Maillard-Reaktion irreversibel in Folgereaktionen einbezogen wurden. Ein kontinuierlicher Anstieg der D-AS Gehalte konnte somit nicht beobachtet werden. Diese Aussage wird auch dadurch bekräftigt, dass nach Zugabe der nichtproteinogenen AS (vgl. Tabelle 3-11; Daten A + B) höhere absolute Gehalte an L- und D-AS bestimmt wurden, als nach Zugabe der nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen. Die Begründung liegt möglicherweise darin, dass die zugesetzten Amadori-Verbindungen primär in Folgereaktionen einbezogen wurden, während die zugesetzten L-AS überwiegend mit den reduzierenden Zuckern des Honigs reagierten, resultierend in der Bildung von Amadori-Verbindungen (vgl. Abbildung 3-24 und 3-25). Im Gegensatz zu den Versuchen mit den proteinogenen AS lagen zudem im Probenmedium Honig die reduzierenden Zucker im Überschuss vor, so dass eine erneute Reaktion der freigesetzten AS möglich war und weitere partielle Enantiomerisierungen stattfinden konnten.

Zudem wurden im Ausgangsmaterial (Bestimmung BW) geringe Mengen an D-AS, besonders nach der durchgeführten Totalhydrolyse der synthetisierten Amadori-Verbindungen detektiert (vgl. Tabelle 3-11). Während der Synthese der Amadori-Verbindungen ist auch mit einem Zerfall bzw. einer Weiterreaktion der bereits entstandenen Verbindungen zu rechnen, so dass bei diesem Prozess bereits freie D-AS entstehen können, die mit den noch im Reaktionsmedium vorhandenen Glucose-Molekülen wieder zu Amadori-Verbindungen reagieren können. Dies zeigen auch Versuche, bei denen der Zuckerverbrauch im Zuge der Maillard-Reaktion

deutlich höher war als der AS-Verbrauch (LAMBERTS et al. 2008; KIM und LEE 2008).
Demzufolge war und ist es möglich bzw. sogar zu erwarten, dass geringe absolute und relative Gehalte an D-AS in mit L-AS synthetisierten Amadori-Verbindungen zu detektieren sind. Somit können die AS mehrfach über den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Mechanismus racemisiert werden, hingegen werden die Zucker im Zuge der Maillard-Reaktion abgebaut bzw. in Folgeprodukte umgewandelt (vgl. Kapitel 1.2).

Die Ergebnisse der Erhitzungsversuche der nichtproteinogenen AS und Amadori-Verbindungen zeigen deutlich, dass die ablaufende Maillard-Reaktion im Zuge der durchgeführten Erhitzung des Honigs eine Degradation sowohl der Amadori-Verbindungen als auch der L- und D-AS zur Folge hatte (vgl. Abbildung 3-23). Eine Diskriminierung zwischen der Degradation von L- und D-AS ist bisher in der Literatur nicht bekannt und kann auch nicht durch die in dieser Arbeit bestimmten Ergebnisse gezeigt werden. Zudem sollten bezugnehmend auf den schnellen Abbau der zugesetzten L-AS (vgl. Tabelle 3-11; Daten A) und folglich auch alle im Ausgangsmaterial (BW) bereits vorhandenen freien und an die Amadori-Verbindungen gebundenen D-AS im Laufe der Erhitzung in Folgereaktionen weiterreagieren. Nach jedem Erhitzungsexperiment konnten aber absolute Gehalte an D-AS detektiert werden, die in einigen Fällen zeitabhängig während der Erhitzung anstiegen. Diese detektierten D-AS konnten also nur nach der Bildung von Amadori-Verbindungen im Honig bzw. aus den zugesetzten synthetisierten Amadori-Verbindungen im Zuge der Erhitzung kontinuierlich entstanden sein. Auch diese Ergebnisse stehen in sehr guten Einvernehmen mit den in der Literatur bereits gezeigten Ergebnissen (BRÜCKNER et al. 2001; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006a, 2006b) und bekräftigen den postulierten Mechanismus.

In einigen Fällen, vor allem bei den Versuchen mit den proteinogenen AS, konnten nach der durchgeführten Totalhydrolyse höhere Racemisierungsraten im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Totalhydrolyse (vgl. Tabelle 3-10 und Tabelle 3-11) festgestellt werden (vgl. FRIEBERTSHÄUSER et al. 2004), obwohl der Anteil der freien L-AS nach der Totalhydrolyse deutlich höher sein sollte. Eine durch die

Totalhydrolyse verursachte, säurekatalysierte Racemisierung konnte durch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bereits ausgeschlossen werden (vgl. Kapitel 3.4.2). Die bei der Erhitzung der Ausgangsverbindungen entstehenden Folgeprodukte (wie z. B. die Desoxyosone) könnten jedoch anfällig für eine säurekatalysierte induzierte Racemisierung sein. Bei der Bildung der 4-Desoxyosone wird die AS nicht wie bei den Bildungen der 1- und 3-Desoxyosonen freigesetzt, sondern bleibt am Zuckerrest gebunden (vgl. Kapitel 1.2). Folglich könnte die detektierte Racemisierung beispielsweise durch Hydrolyse der 4-Desoxyosone und einer daraus resultierenden Freisetzung der gebunden AS hervorgerufen werden.
Der formulierte Racemisierungsmechanismus von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) beschränkt sich auf die Bildung von D-AS einhergehend mit der Bildung von 1- und 3-Desoxyosonen.

Eine Enantiomerisierung ist auch bei der Bildung der 4-Desoxyosone durchaus möglich, so dass bereits in den gebildeten 4-Desoxyosonen die AS in der D-Konfiguration vorliegen, die anschließend durch Totalhydrolyse freigesetzt werden. Sowohl die 1-Desoxyosone als auch die 4-Desoxyosone entstehen über die Bildung von 2,3-Endiolen, die durch Enolisierung der Amadori-Verbindungen entstehen. Durch eine Protonenabstraktion entsteht ein intermediäres Carbanion, das wiederum von beiden Seiten reprotoniert werden kann und somit eine partielle Racemisierung zur Folge haben kann. Anschließend erfolgt durch Wasserabspaltung die Bildung der 4-Desoxyosone, in denen die AS sowohl in der L- als auch in der D-Konfiguration vorliegen können. Der vorgeschlagene Mechanismus wird in Abbildung 3-27 gezeigt.

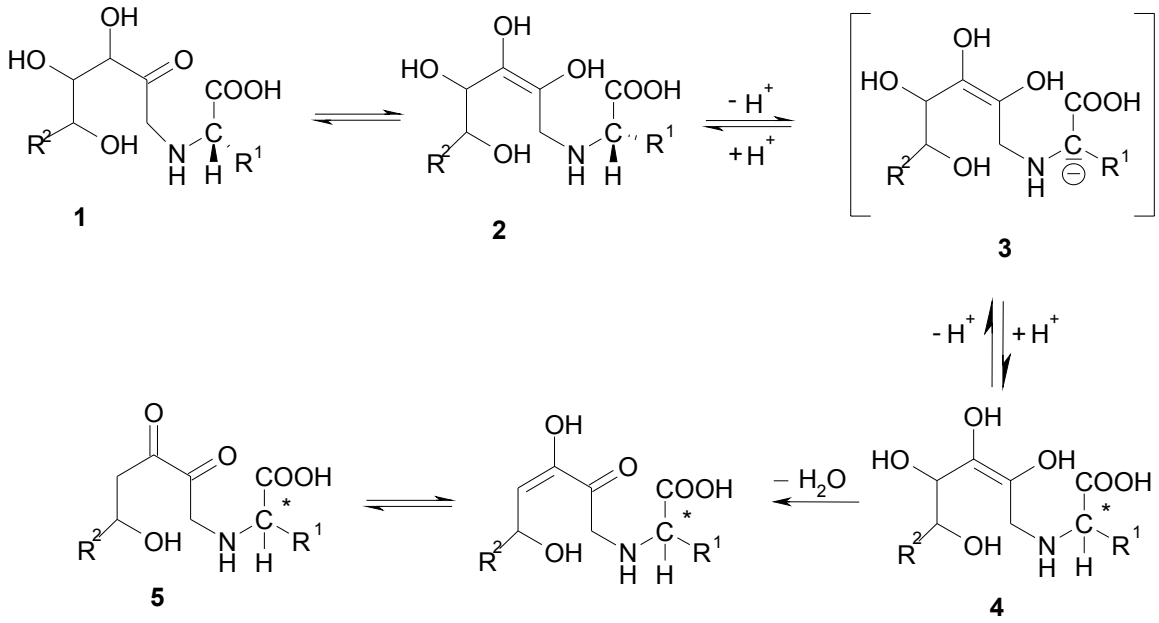


Abb. 3-27 **Postulierte Bildung von 4-Desoxyosonen aus Amadori-Verbindungen [1]. Durch Enolisierung entstehen aus [1] 2,3-Endiole [2], die durch Protonenabstraktion in intermediäre Carbanionen [3] überführt werden. Durch Reprotonierung bilden sich partiell racemisierte AS-Derivate [4]. Durch anschließende Wasserabspaltung entstehen 4-Desoxyosone [5]; R^1: AS-Seitenkette; R^2: -CH_2-OH-Zuckerrest, der Stern weist auf die racemische Aminosäure hin**

Eine weitere alternative Erklärung wäre eine Modifikation der Konfiguration der an die 4-Desoxyosonen gebundenen AS. Analog zur Bildung der 1- und 3-Desoxyosone aus den Amadori-Verbindungen könnte die Bildung eines Carbanions durch Deprotonierung entstehen, aus dem durch Reprotonierung partiell racemisierte AS-Derivate entstehen. Dieser Mechanismus wird in Abbildung 3-28 gezeigt. Die Freisetzung der gebundenen D- und L-AS erfolgt dann durch die Säurehydrolyse.

Würde keine Racemisierung der gebundenen AS vorliegen, so müssten die nach der durchgeführten Totalhydrolyse ermittelten relativen Gehalte der Racemisierungsraten, im Vergleich zu den während der Erhitzung freigesetzten AS, deutlich sinken, da insgesamt mehr freie L-AS vorliegen müssten. Die zum Teil nach der Totalhydrolyse detektierten höheren relativen Gehalte an D-AS können durch die beiden postulierten Mechanismen erklärt werden.

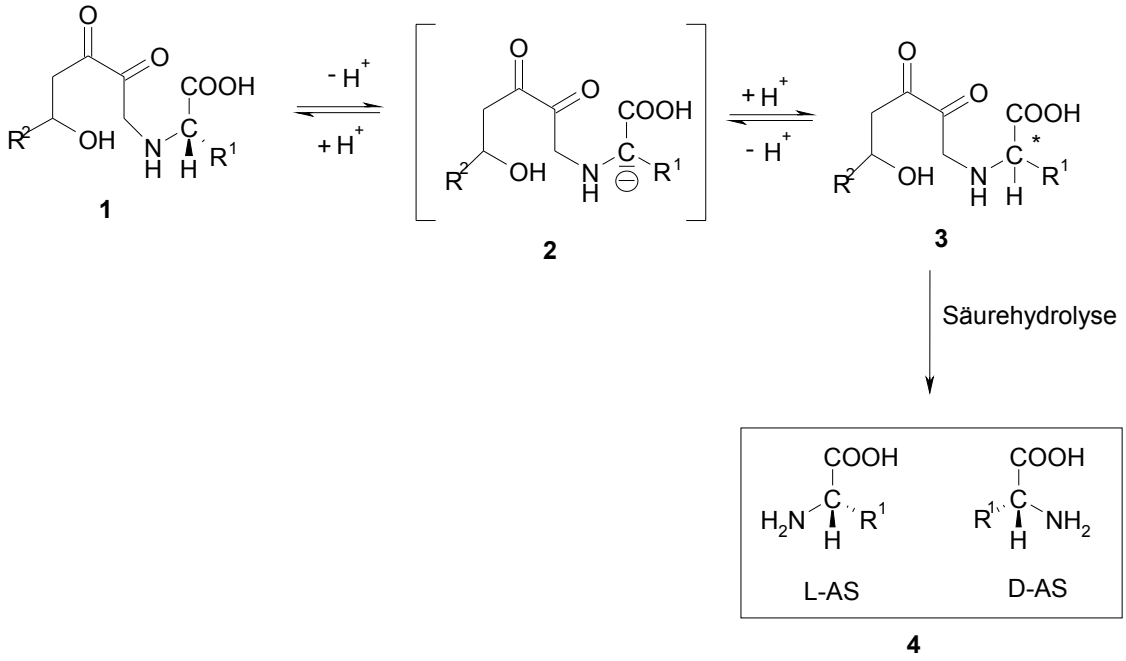


Abb. 3-28 **Postulierte Bildung von D-AS innerhalb von 4-Desoxyosonen [1] und deren anschließende Freisetzung durch Säurehydrolyse. Durch Protonenabstraktion entsteht ein Carbanion [2], aus dem durch Reprotonierung partiell racemisierte AS-Derivate [3] entstehen. Die Freisetzung der D- und L-AS [4] erfolgt durch Säurehydrolyse. R^1: AS-Seitenkette; R^2: $-CH_2OH$, der Stern weist auf die racemische Aminosäure hin**

Um dies zu beweisen, könnte versucht werden, die 4-Desoxyosone zu isolieren und die Konfiguration der gebundenen AS durch eine Strukturaufklärung mittels NMR bestimmt werden. Des Weiteren könnte durch eine Säurehydrolyse der isolierten 4-Desoxyosone gezeigt werden, ob diese eher einer säurekatalysierten Racemisierung unterliegen als die Amadori-Verbindungen.

3.4.4.2 Nachweis der Bildung von nichtproteinogenen AV in der Probenmatrix Honig nach Zugabe der nichtproteinogenen AS und anschließender Erhitzung

Die in dieser Arbeit mittels HPLC-ESI-MS detektierten Verbindungen im Honig werden bezugnehmend auf die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen (vgl. Kapitel 2.4), die entwickelte Methode zum Nachweis von Amadori-Verbindungen (vgl. Kapitel 3.2.2.5) und die bereits präsentierten Ergebnisse (vgl. Kapitel 3.3.2) als Amadori-Verbindungen definiert. Wohl wissend ist aber auch bei diesen Ergebnissen

nicht auszuschließen (vgl. Kapitel 3.3.3), dass es sich bei den detektierten Verbindungen auch um die gleichartigen Heyns-Verbindungen handeln kann. Da eine genaue Unterscheidung im MS Spektrum nur sehr unzulänglich möglich ist (vgl. FROLOV et al. 2006b), müssten die detektierten Verbinden korrekterweise als glykosilierte Verbindungen und nicht als Amadori- oder Heyns-Verbindungen bezeichnet werden. Die Entstehung von glykosilierten Verbindungen und die durch die Maillard-Reaktion ausgelöste Racemisierung sind wiederum abhängig von der Reaktivität der vorhandenen Zucker. So konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass Glucose reaktiver als Fructose ist (BUNN und HIGGINS 1981; RIZZI 2003; BOSSE et al. 2010). Auch diese Tatsache spricht dafür, dass die in dieser Arbeit detektierten Verbindungen überwiegend Amadori-Verbindungen sind.
Nichts desto trotz beeinflusst diese Feststellung das Ziel dieser Arbeit nicht, nämlich den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Mechanismus zu beweisen bzw. zu ergänzen, da dieser für beide Verbindungen (AV + HV) beschrieben wurde.

Nach der nach Kapitel 2.9.2 durchgeführten Probenaufbereitung konnten die Amadori-Verbindungen Fru-Abu, Fru-Nva und Fru-Phg in allen analysierten Proben detektiert werden (vgl. Abbildung 3-25). Auch eine zeitabhängige Zunahme der detektierten Peakflächen der Amadori-Verbindungen über den Erhitzungszeitraum von 120 min konnte gezeigt werden. Der Nachweis der durch die Maillard-Reaktion induzierten Entstehung von nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen nach Zugabe der entsprechenden nichtproteinogenen AS in einem Lebensmittel, das reich an reduzierenden Zuckern wie Glucose und Fructose ist, bekräftigt nochmals den präsentierten Mechanismus.

3.4.4.3 Ergänzungen zu den postulierten Mechanismen und möglichen Ursachen für die detektierten Racemisierungen

In der Literatur wird über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Maillard-Reaktion diskutiert. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Aldosen (besonders Glucose) reaktiver sind als Ketosen (vgl. Kapitel 1.4.1; BUNN und HIGGINS 1981; JING und KITTS 2002; RIZZI 2003; KWAK und LIM 2004; OLIVER et al. 2006; BOSSE et al. 2010). Wiederum zeigten andere Studien, dass die Ketose

Fructose sehr schnell mit AS reagiert. Begründet wurde dies durch einen höheren Anteil der reaktiveren, offenkettigen Form der Fructose (0,7 % bei 25 °C) im Vergleich zur Glucose (0,0026 % bei 20 °C) in wässriger Lösung (SUÁREZ et al. 1989; NARANJO et al. 1998; VAN BOEKEL 2001; JANKOWSKI et al. 2009). Die offenkettige Form des Zuckers ist ein begünstigender Faktor bei der Bildung von Amadori-Verbindungen. Versuche von RIZZI (2007) zeigten einen intensiveren Bräunungsgrad der Modellmischungen von Glycin mit Monosacchariden nach der Zugabe von Natriumtetraboraten zum Reaktionsgemisch, die die offenkettige Form der eingesetzten Zucker in wässriger Lösung erhöhten.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeiten können nur abhängig von den jeweiligen Reaktionsbedingungen sein. Beispielsweise ist die in Kapitel 1.4.3 beschriebene Mutarotation temperatur- und pH-Wert-abhängig. Mit steigendem pH-Wert und/oder steigender Temperatur erhöht sich der Anteil der offenkettigen Form der Zucker (YAYLAYAN et al. 1994; MARTINS et al. 2001). Die Fructose durchläuft aufgrund von Interkonversionen zu Furanoseanomeren eine komplexere Mutarotation im Vergleich zur Glucose. Diese komplexere Mutarotation bewirkt wiederum einen verlangsamten Ablauf des ersten Schrittes der Maillard-Reaktion (vgl. Kapitel 1.2) und führt damit auch zu einer geringeren Racemisierung (YAYLAYAN et al. 1993). Dies erklärt, warum bei höheren Temperaturen die Glucose reaktionsfähiger ist als die Fructose. Ein weiterer Unterschied könnte die terminale Aldehydgruppe der Aldosen sein. Diese ist im Vergleich zu den Ketosen weniger sterisch gehindert und erleichtert die Reaktion mit den AS (LAROQUE et al. 2008). Somit müssten sich unter gleichen Reaktionsbedingungen deutlich mehr Amadori-Verbindungen als Heyns-Verbindungen pro Zeiteinheit beim Ablaufen der Maillard-Reaktion bilden.
Auch die Seitenketten der AS beeinflussen sehr stark die Geschwindigkeit der Reaktion mit den reduzierenden Zuckern. In Versuchen von KWAK und LIM (2004) zeigten die eingesetzten basischen AS (z. B. Lysin) die größten Reaktionsfähigkeiten, die sauren zeigten eher eine geringe Reaktionsaffinität bezüglich der erfassten Bräunungsintensivität und dem detektierten Verbrauch der eingesetzten AS.

Auch das Konzentrationsverhältnis AS zu Zucker ist ein wichtiger Faktor. Durch den Vergleich verschiedener Studien zeigt sich, dass die detektierten Racemisierungen bei sehr hohen AS Konzentrationen höher sind als im Vergleich zu einem sehr hohen Überschuss an reduzierenden Zuckern (KIM und LEE 2008, 2009; BOSSE et al. 2010). Dies könnte auf eine Reaktion zweiter Ordnung hindeuten, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit der ablaufenden Maillard-Reaktion abhängig von der Konzentration der Reaktanden Zucker und AS ist. Auch der pH-Wert kann die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen. So können während der Maillard-Reaktion, bedingt durch die hohen Temperaturen, beispielsweise organische Säuren gebildet werden. Diese können zum Erniedrigen des pH-Wertes führen und damit die Reaktion verlangsamen (MARTINS und VAN BOEKEL 2005). Dies zeigen auch Racemisierungsversuche von KIM und LEE (2008) bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Autoren detektierten höhere relative Gehalte an racemisierten AS nach Erhitzung mit steigendem pH-Wert.

Weitere Ansatzpunkte, die in Bezug möglicher Racemisierungsmechanismen beachtet werden müssen, sind beispielsweise der Einsatz verschiedener Zucker mit unterschiedlicher Kettenlänge oder auch die Reaktion von Folgeprodukten der Maillard-Reaktion, z. B. von Glycerinaldehyden, mit noch vorhandenen freien oder wieder freigesetzten AS.

Fazit:

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass eine Racemisierung von AS im Zuge der Maillard-Reaktion unter Betrachtung verschiedener Wege und unter Berücksichtigung der Entstehung von Desoxyosonen, Amadori- und Heyns-Verbindungen möglich ist. Diese Aussage wird besonders durch die Tatsache bekräftigt, dass bereits nach kurzem thermischem Einfluss die Bildungen von Amadori-Verbindungen aus den entsprechenden AS mittels HPLC-ESI-MS nachzuweisen sind. Die in diesem Kapitel aufgeführten Versuche zeigen, dass die in thermisch behandelten Lebensmitteln detektierten D-AS über den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Mechanismus entstanden sein können. Viele Faktoren nehmen auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Maillard-Reaktion und somit auch auf die Racemisierungsraten großen Einfluss. Die Wichtigsten sind die

einzelnen Reaktanden (unterschiedliche AS und Zucker), deren Konzentration, der pH-Wert, die Temperatur und die Zusammensetzung des Mediums, in dem die Maillard-Reaktion abläuft. Dies macht die Maillard-Reaktion zu einer sehr komplexen, aber auch sehr interessanten Reaktion.

Der entscheidende, reaktionsbestimmende Schritt der Racemisierungen ist noch unklar. Er könnte zum einen durch den ersten Schritt der Maillard-Reaktion bedingt sein. Hierbei würde die Mutarotation der Zucker und somit der Anteil der offenkettigen Form der Zucker eine große Rolle übernehmen. Und zum anderen könnte er durch die Reaktion der Amadori-Verbindungen bzw. der glykosilierten Verbindungen zu den Enaminolen bedingt sein. Hierbei würden die Stabilität und Anfälligkeit gegenüber Folgereaktionen der einzelnen Verbindungen wiederum den Racemisierungsgrad beeinflussen.

Die Bestimmung und genaue Analyse von Zwischenprodukten (z. B. der Desoxyosone) der Maillard-Reaktion, vor allem deren stereochemischer Zusammensetzung, ist die Konsequenz der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse. Mit diesen Analysen könnten weitere oder noch genauere Aussagen bezüglich der Racemisierungsmöglichkeiten bzw. -mechanismen getroffen werden.

Die Komplexität der Maillard-Reaktion und die damit verbundenen verschiedenen Ansätze für mögliche Racemisierungsmechanismen bieten noch viel Spielraum für weitere Forschungen.

3.5 *Analyse des Spaltungsverhalten von nativen Peptaibolen und Modellpeptiden nach Trifluoroacetolyse mittels HPLC-ESI-CID-MS*

3.5.1 Trifluoroacetolyse von Homooligo-Aib-Peptiden

Die Sequenz der eingesetzten Modellpeptide und Peptaibole mit den bevorzugten Spaltungsstellen nach der durchgeführten Trifluoroacetolyse (vgl. Kapitel 2.10) werden in Abbildung 3-29 gezeigt.

Z-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu (1): Die nach Trifluoroacetolyse für diese Verbindung mittels HPLC detektierten und mittels TIC-MS analysierten Spaltungsprodukte werden in Tabelle 3-12 gezeigt.

Tab. 3-12 Detektierte Peptide (2 – 16), resultierend aus der Trifluoroacetolyse der Verbindung Z-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu (1) und Angabe der zur Charakterisierung bestimmten protonierten Molekülionen [*M*+H]$^+$; Bedingungen siehe Kapitel 2.10

	(a)	(b)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		[*M* + H]$^+$ *m/z*
1		0,5 h	Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	O*t*Bu	[1059]
2	0,5 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib		[1003]
3	0,5 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib			[918]
4	0,5 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib				[833]
5	0,5 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib					[748]
6	0,5 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib						[663]
7	0,5 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib							[578]
8	0,5 h	15 h		Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib		[869]
9	0,5 h	15 h		Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib			[784]
10	0,5 h			Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib				[699]
11	0,5 h			Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib					[614]
12	0,5 h			Aib	Aib	Aib	Aib	Aib	Aib						[529]
13	0,5 h			Aib	Aib	Aib	Aib	Aib							[444]
14	0,5 h			Aib	Aib	Aib	Aib								[359]
15	0,5 h			Aib	Aib	Aib									[274]
16	1 h		Z	Aib	Aib	Aib	Aib								[493]

(a) Detektiert nach x h; (b) Zerfall nach x h



Abb. 3-29 **Sequenz der Homooligo-Aib-Peptide und Peptaibole mit zeitabhängigen Spaltungsstellen nach Trifluoroacetolyse; Bedingungen siehe Kapitel 2.10**

Abbildung 3-30 zeigt beispielhaft anhand des Chromatogramms der Verbindung Z-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu die zur Identifizierung durchgeführte Strukturanalyse mittels HPLC-ESI-MS-CID. Mit allen weiteren Verbindungen wurde analog verfahren.

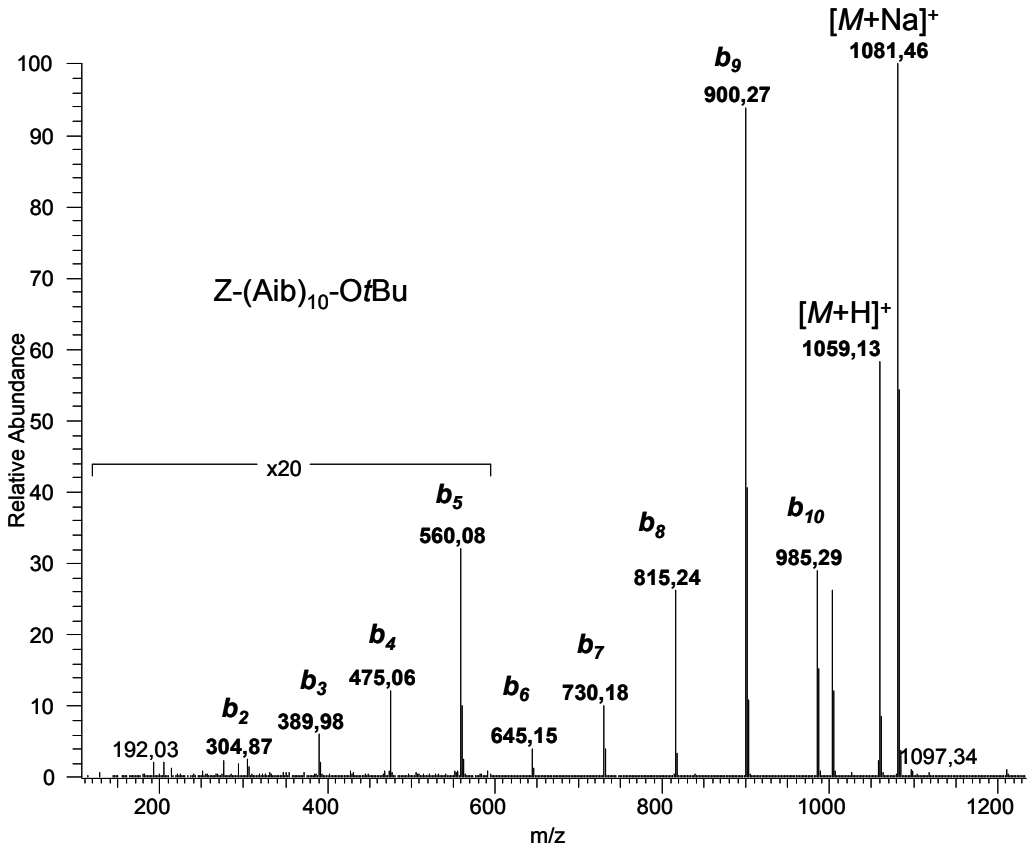


Abb. 3-30 **HPLC-ESI-MS-CID Massenspektrum der Verbindung Z-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu mit protonierter Molekülmasse *m/z* 1059,13 und den mittels CID-MS induzierten charakteristischen Fragmenten bei 20 % relativer „Collision-Energy"; Bedingungen siehe Kapitel 2.10; M: Molekülion, b$_x$: Fragmentionen**

Die Strukturanalyse bestätigte die Identität der Verbindung Z-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu und zeigte eine Serie von Acylium-Ionen *b$_2$-b$_{10}$* mit der für die einzelnen Aib-AS charakteristischen Massendifferenz von 85 Da (vgl. Abbildung 3-30).

Nach 0,5 h Trifluoroacetolyse konnte die Precusor-Verbindung **(1)**, bedingt durch eine schnelle und komplette Spaltung der *t*Bu-Gruppe, resultierend in der Bildung einer Z-(Aib)$_{10}$-OH **(2)** Verbindung nicht mehr nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3-12). Zudem wurde die Bildung von verschiedenen, individuellen Peptiden **(3–15)** mit zunehmenden Ionenintensititäten und Retentionszeiten detektiert. Mittels HPLC

konnten die Verbindungen **(2)** bis **(10)** sehr gut voneinander getrennt werden, während die Verbindungen **(11)** bis **(15)** coeluierten und nur durch ihre im MS Spektrum detektierten, charakteristischen Molekülionen (vgl. Tabelle 3-12) unterschieden werden konnten. Nach 1 h wurde die Verbindung Z-$(Aib)_4$-OH **(16)** nachgewiesen**,** die mit Verbindung **(8)** coeluierte. Die Peptide **(2)** bis **(7)** entsprechen einer Serie von Z-$(Aib)_{10\text{-}5}$-OH Peptiden und die Peptide **(8-10)** entsprechen den freien Peptiden H-$(Aib)_{10\text{-}8}$-OH. Die coeluierenden Peptide **(11)** bis **(15)** repräsentieren einen Mix aus H-$(Aib)_{7\text{-}3}$-OH.
Abbildung 3-31 zeigt, dass mit zunehmender Reaktionszeit die Intensität der Z-Decapeptid Säure **(2)** abnimmt und die Intensitäten der Peptide Z-$(Aib)_9$-OH **(3)** bis Z-$(Aib)_5$-OH **(7)** zunehmen. Nach 1 h konnte auch der Peak der Verbindung Z-$(Aib)_4$-OH (**16**) detektiert werden.
Diese Ergebnisse zeigten eine schrittweise Abspaltung der Aib-AS vom C-terminalen Ende. Zudem wurde nach 0,5 h Trifluoroacetolyse eine Serie von freien H-$(Aib)_{10\text{-}3}$-OH Peptiden **(8-15)** detektiert. Dies zeigte, dass auch die Z-Gruppe der entsprechenden Peptide abgespalten wurde. Aus den Peakintensitäten (Ion Abundances) lässt sich schließen, dass die Abspaltung der Z-Gruppe im Vergleich zu den Abspaltungen der C-terminalen Aib-AS langsamer ablief.

Z-$(Aib)_7$-O*t*Bu (27): Die Strukturanalyse des Precusor-Peptids zeigte, dass keine Verunreinigung vorlag. Analog zum Decapeptid Z-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu wurde auch bei diesem Peptid die *tertiäre* Butyl-Gruppe bereits nach 0,5 h Trifluoroacetolyse komplett abgespalten, resultierend in der Bildung der Verbindung Z-$(Aib)_7$-OH. Zudem konnten die Peptide Z-$(Aib)_6$-OH und Z-$(Aib)_5$-OH nachgewiesen werden. Nach 3 h wurde sowohl die Bildung der Verbindungen Z-$(Aib)_4$-OH und Z-$(Aib)_3$-OH nachgewiesen, als auch die Entstehung der Verbindung H-$(Aib)_7$-OH durch Abspaltung der Z-Gruppe. Ein Vergleich der Z-$(Aib)_7$-O*t*BU und Z-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu Ergebnisse zeigte, dass das Spaltungsverhalten bzw. die Spaltungsanfälligkeit der beiden Verbindungen sehr gut übereinstimmten.

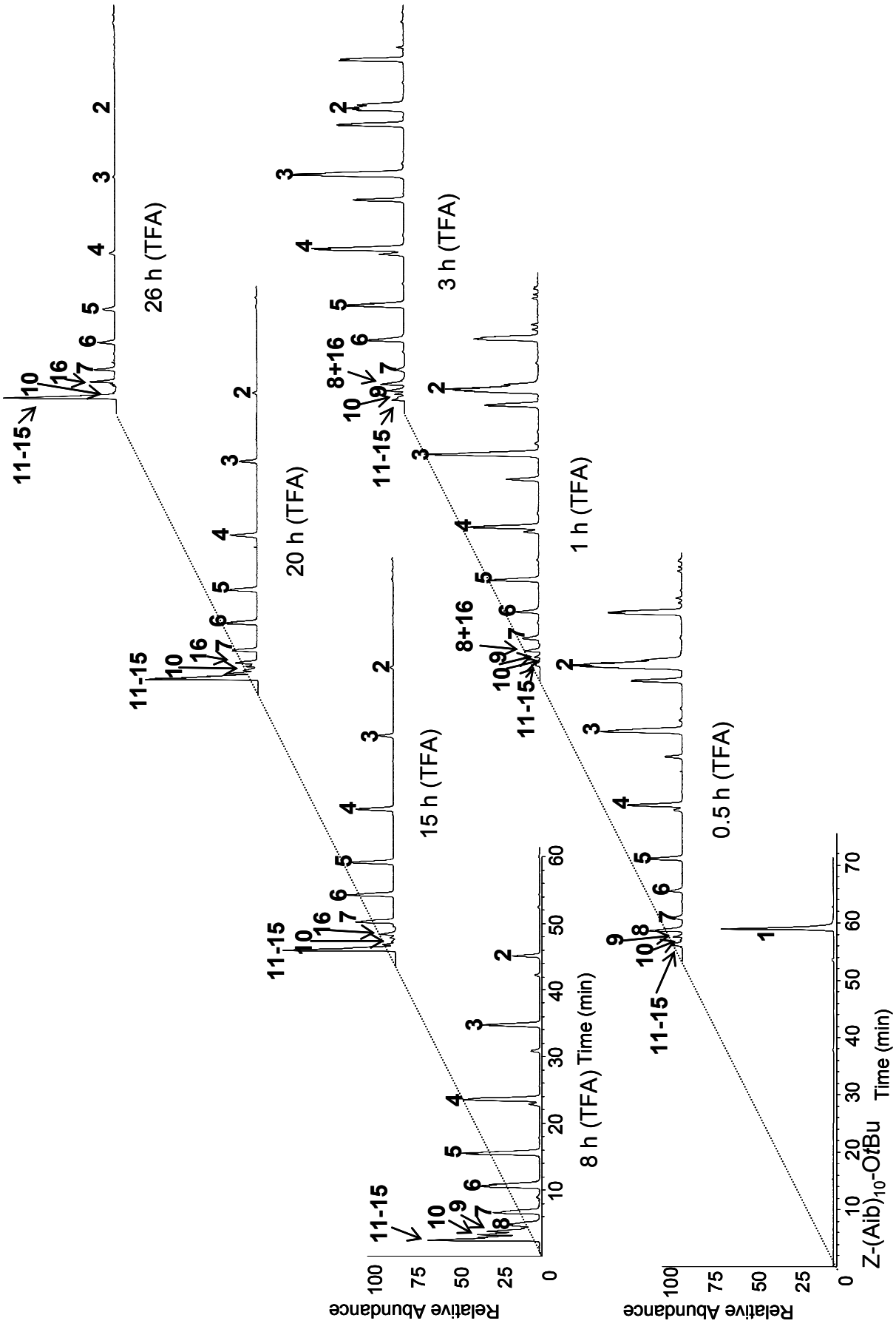


Abb. 3-31 HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramme der Spaltungsexperimente der Verbindung Z-(Aib)10-OfBu (1) und der daraus resultierenden Peptide 2-16 (vgl. Tabelle 3-12; Nummern der Peptide); Bedingungen siehe Kapitel 2.10

Ac-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu (26): Die Strukturanalyse zeigte einige Verunreinigungen für dieses Peptid, resultierend aus der Synthese. Dennoch wurde mittels des analysierten MS Spektrums das Molekülion mit der Masse *m/z* 967 $[M+H]^+$ als Precursor-Ion definiert und die Trifluoroacetolyse-Kinetik anhand dieses Peptides bestimmt (vgl. Abbildung 3-29).
Für diese Verbindung konnte nach 0,5 h die Bildung einer Serie von Ac-(Aib)$_{10\text{-}8}$-OH Peptiden detektiert werden. Nach 3 h wurden die Verbindungen Ac-(Aib)$_7$-OH und Ac-(Aib)$_6$-OH bestimmt und nach 8 h konnte die Bildung des Peptides Ac-(Aib)$_5$-OH nachgewiesen werden. Nach 15 h Trifluoroacetolyse konnte sowohl die Verbindung Ac-(Aib)$_{10}$-OH als auch die Verbindung Ac-(Aib)$_9$-OH nicht mehr detektiert werden. Im Vergleich zum Peptid *Z*-(Aib)$_{10}$-OH wurde keine Bildung von freien H-(Aib)$_{10}$-OH oder kleineren Homologen resultierend aus der Spaltung der Hauptverbindung Ac-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu detektiert, auch nicht nach 26 h Reaktionszeit. Dieses Ergebnis zeigte, dass der Ac-Aib-Terminus im Vergleich zum Z-Aib-Terminus gegenüber der durchgeführten Säurehydrolyse stabiler war (vgl. Abbildung 3-29).

3.5.2 Trifluoroacetolyse von Peptaibolen

Die Sequenz der verwendeten Peptaibole und die detektierten Spaltungsstellen nach Trifluoroacetolyse werden ebenfalls in Abbildung 3-29 gezeigt.

Trichotoxin (17): Abbildung 3-32 zeigt das HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramm der zeitabhängigen Trifluoroacetolyse dieser Verbindung **(17)** mit den entsprechenden „Pseudomolekularen-Ionen“ der resultierenden Fragmente, Tabelle 3-13 zeigt mit fortlaufender Nummerierung die detektierten Peptide mit den entsprechenden Sequenzen.
Die Strukturanalyse bestätigte mit einer detektierten Masse von *m/z* 1690 $[M+H]^+$ die Authentizität und Reinheit des synthetischen Octadecapeptides. Nach 0,5 h Trifluoroacetolyse nimmt die detektierte Intensität der Precrusor-Verbindung **(17)** ab und die Acetylpeptidsäuren **(20, 21, 22)** sowie der TFA-Ester des Prolylhexapeptides **(24)** können detektiert werden.

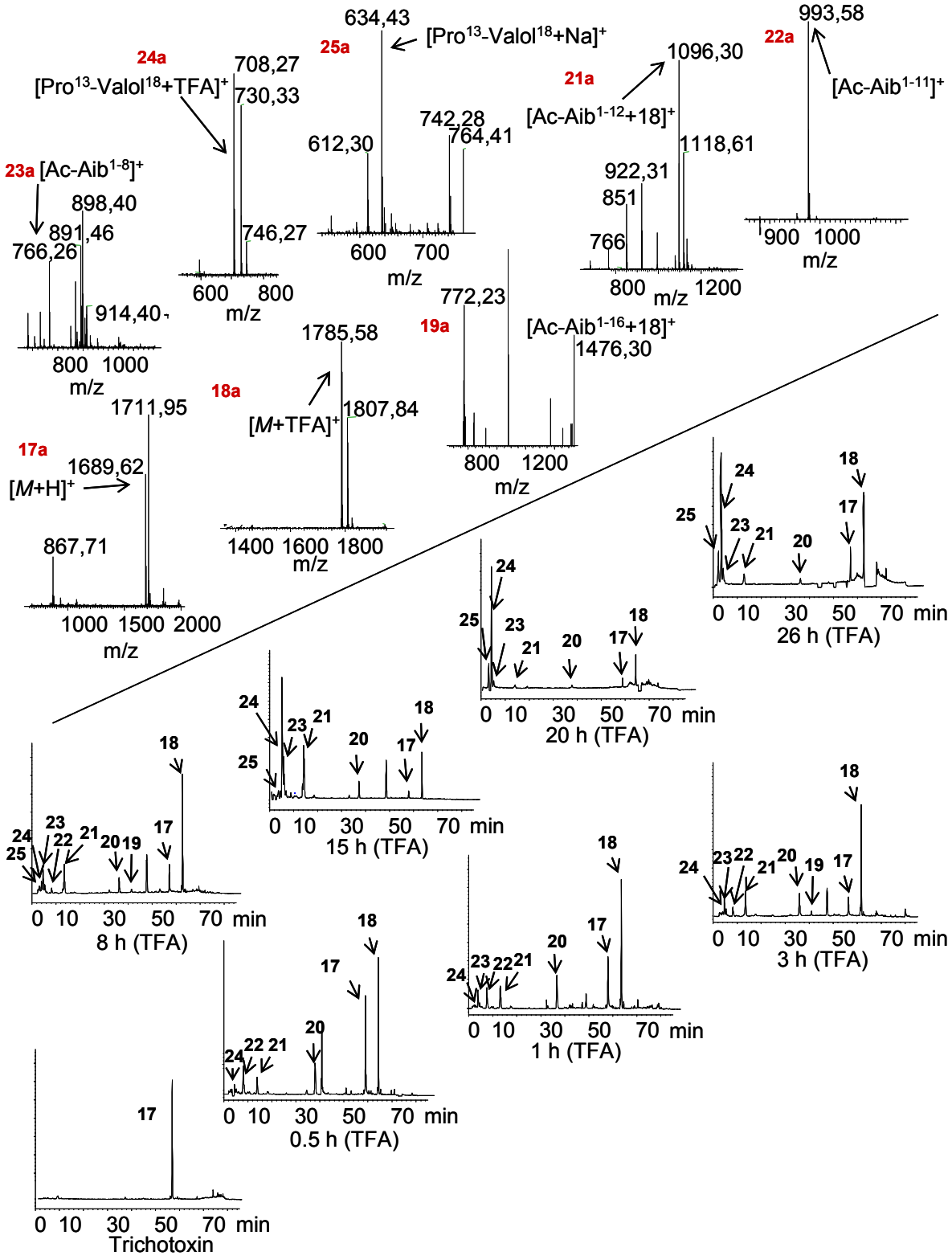


Abb. 3-32 **HPLC/TIC-ESI-MS Chromatogramme der Spaltungsexperimente der Verbindung Trichotoxin (17) und der daraus resultierenden Peptide 8-25 (unten) mit den entsprechenden charakteristischen Ionen 17a-25a (oben); Peptid 20 konnte nicht eindeutig zugeordnet werden (vgl. Tabelle 3-13; Nummern der Peptide); Bedingungen siehe Kapitel 2.10**

Tab. 3-13 Detektierte Peptide (20, 21, 23, 24, 25) und TFA-Ester (18, 22), resultierend aus der Trifluoroacetolyse der Verbindung Trichotoxin (17) und Angabe der zur Charakterisierung bestimmten protonierten Molekülionen $[M+H]^+$; Bedingungen siehe Kapitel 2.10

	(a)	(b)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		$[M + H]^+$ m/z
17			Ac	Aib	Gly	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Valol		[1690]
18	0.5 h		Ac	Aib	Gly	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Valol	TFA	[1786]
20	0.5 h																						
21	0.5 h		Ac	Aib	Gly	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala	Aib								[1078]
22	0.5 h	15 h	Ac	Aib	Gly	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala									[993]
24	0.5 h															Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Valol	TFA	[709]
23	1 h		Ac	Aib	Gly	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib												[766]
19	3 h	15 h	Ac	Aib	Gly	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ala	Ala	Aib	Pro	Leu	Aib	Aib				[1458]
25	8 h															Pro	Leu	Aib	Aib	Gln	Valol		[612]

(a) Detektiert nach x h; (b) Zerfall nach x h

Nach 1 h wurde das Peptid **(23)** und nach 3 h das Peptid **(19)** detektiert. Das freie Prolylhexapeptid **(25)** konnte nach 8 h Trifluoroacetolyse nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Sequenz von Trichotoxin (vgl. Tabelle 3-13) und der in Abbildung 3-32 gezeigten Übersicht der resultierenden Peptide zeigten, dass nach 0,5 h eine schnelle, aber nicht komplette Spaltung der Aib-Pro Bindungsstelle beobachtet werden konnte. Dies geht einher mit der Bildung eines N-terminalen Dodecapeptides Ac-Aib^{1}-Aib^{12}-OH **(21)**.

In besonderem Maße wurde sowohl die Bildung des Trifluoroacetyl-Ester **(18)** vom C-terminalen Valol des intakten Trichotoxin als auch des C-terminalen Prolylhexapeptides **(24)** beobachtet (vgl. *m/z* in Tabelle 3-13 und Abbildung 3-32).

Des Weiteren führte die Abspaltung des C-terminalen Aib^{12} der Acetyldodecapeptid-Säure **(21)** zur Bildung des Peptides Ac-Aib^{1}-Ala^{11}-OH **(22).** Anschließend wurde von dieser Verbindung das Tripeptid Aib^{9}-Ala^{10}-Ala^{11} nach 1 h abgespalten, resultierend in der Bildung des Acetyloctapeptids Ac-Aib^{1}-Aib^{8}-OH **(23)**. Nach 3 h Trifluoroacetolyse konnte die Abspaltung des C-terminalen Gln^{17}-Valol^{18} vom Trichtoxin **(17)** beobachtet werden, einhergehend mit der Bildung eines Acetylhexadecapeptidesäure Ac-Aib^{1}-Aib^{16}-OH **(19)**. Bemerkenswerterweise konnte auch nach 26 h Trifluoroacetolyse immer noch die intakte Ausgangssubstanz **(17)** nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der in der Literatur gezeigten präparativen Trifluoroacetolyse des nativen Trichotoxin sehr gut überein (BRÜCKNER et al. 1985).

Verbindung **(20)** konnte bereits nach 0,5 h detektiert werden und war auch nach 26 h immer noch nachweisbar. Eine eindeutige Identifizierung der Peptidsequenz dieser Verbindung konnte aber nicht erreicht werden.
Die acidolytische Abspaltung von Gln^{17}-$Valol^{18}$ vom C-terminalen Ende des synthetischen Peptides **(17)** *via* simultaner oder nachfolgender Bildung eines Pyroglutamatderivates wurde bereits in vielen Veröffentlichungen (KÖNIG et al. 1980; BRÜCKNER und JUNG 1982; JUNG et al. 1983) behandelt und wird deshalb in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

Paracelsin (28): Die Strukturanalyse der Precusor-Verbindung bestätigte die Identität der Verbindung (vgl. Abbildung 3-29). Eine Verunreinigung konnte nicht detektiert werden.
Nach 0,5 h Trifluoroacetolyse wurde sowohl eine Spaltung zwischen Aib^{13}-Pro^{14} beobachtet, resultierend in der Bildung einer Acetyltridecapeptid-Säure Ac-Aib^{1}-Aib^{13}-OH, als auch eine Abspaltung der C-terminalen Bindung H-Aib^{12}-Aib^{13}, einhergehend mit der Bildung des Peptides Ac-Aib^{1}-Gly^{11}-OH. Anschließend wurde von dieser Verbindung nach 8 h Säurehydrolyse das C-terminale Gly abgespalten, resultierend in der Bildung der Acetyldecapeptid-Säure Ac-Aib^{1}-Aib^{10}-OH. Nach 15 h Säurehydrolyse konnte kein intaktes Paracelsin mehr nachgewiesen werden.

Alamethicin (29): Auch diese Verbindung konnte mittels der durchgeführten Strukturanalyse eindeutig identifiziert und charakterisiert werden (vgl. Abbildung 3-29). Der bedeutendste Unterschied zwischen Paracelsin und Alamethicin ist die Aib-Pro-Bindung am Ac-Aib^{1}-Pro^{2}-Terminus von Alamethicin, die relativ säureempfindlich ist.
Nach 0,5 h Trifluoroacetolyse konnte sowohl die Bildung des TFA-Ester der Verbindung Alamethicin, als auch die Spaltung der Aib-Pro Bindung, resultierend in der Detektion der Verbindung H-Pro^{2}-$Pheol^{20}$ und deren TFA-Ester, detektiert werden. Zudem konnte das freie Dodecapeptid H-Pro^{2}-Aib^{13}-OH nachgewiesen werden. Das N-terminale Ac-Aib-OH konnte unter den in Kapitel 2.10 beschriebenen MS-Bedingungen bzw. Einstellungen nicht detektiert werden. Seine Entstehung wurde jedoch in der Literatur beschrieben (BRÜCKNER et al. 1985; KATZ et al. 1985). Nach 3 h nahm die Intensität des Fragmentes H-Pro^{2}-Aib^{13}-OH, einhergehend

mit einer schnelleren Spaltung der N-terminalen Ac-Aib^{1}-Pro^{2} Bindung im Vergleich zur Aib^{13}-Pro^{14}-Bindungsstelle, stark zu. Nach 8 h Säurehydrolyse konnte die intakte Ausgangsverbindung Alamethicin nicht mehr nachgewiesen werden. Auch diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den in der Literatur gezeigten Daten der isolierten Fragmente, resultierend aus der präparativen Trifluoroacetolyse des Alamethicin ähnlichen Peptaibols Suzukacillin (KATZ et al. 1985), überein.

Antiamoebin (30): Infolge der Mikroheterogenität, der Anwesenheit von zwei Hyp's in der Antiamoebin-Sequenz und dem C-terminalen Pheol-Rest war die Trennung der durch die Säurehydrolyse entstandenen Fragmente und die Interpretation des detektierten Massenspektrums im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Peptaibolen schwieriger.

Nach 0,5 h Trifluoroacetolyse wurde ein Mix von Mono-, Di-, und Tri-TFA-Estern, resultierend aus der Veresterung der beiden Hyp-Reste und des C-terminalen Pheol-Restes, detektiert. Zudem wurden auch die Bindungen Iva^{12}-Hyp^{13} und Aib^{14}-Pro^{15} bereits nach 0,5 h gespalten. Nach 1 h wurde die Bindung Aib^{9}-Hyp^{10} gespalten, einhergehend mit der Bildung der Sequenz Ac-Phe^{1}-Aib^{9}-OH. Zugleich wurde auch nach 1 h eine teilweise Spaltung der entstandenen Ac-Phe^{1}-Aib^{9}-OH Verbindung an den Bindungsstellen Iva^{5}(Aib^{5})-Gly^{6} beobachtet, resultierend in der Freisetzung der Peptidsequenzen Ac-Phe^{1}-Iva^{5}(Aib^{5})-OH (AS in Klammern zeigen die Variationsmöglichkeiten in der Peptidsequenz des verwendeten heterogenen Peptaibols, resultierend in der Detektion der entsprechenden homologen Fragmente). Nach 3 h wurde das C-terminale Aib^{9} aus der Sequenz Ac-Phe^{1}-Aib^{9}-OH abgespalten und folglich konnte die Verbindung Ac-Aib^{1}-Aib^{8}-OH detektiert werden. Nach 15 h konnte die Spaltung zwischen den Bindungsstellen Aib^{4}–Iva^{5}(Aib)^{5} und Aib^{3}-Aib^{4} beobachtet werden, resultierend in der Formation der Sequenzen Ac-Phe^{1}-Aib^{3}-OH und Ac-Phe^{1}-Aib^{4}-OH.

3.5.3 Diskussion

Für den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Mechanismus und die in dieser Arbeit formulierten Mechanismen der Enantiomerisierung von AS, (vgl. Kapitel 3.4.4) ist das Vorhandensein von freien AS von Bedeutung. AS die im Peptidverband oder Proteinverband vorliegen, können zwar mit Zuckermolekülen reagieren und auch Racemisieren, die gezeigten Mechanismen konzentrieren sich aber auf die Reaktion von freien AS mit reduzierenden Zuckern in Lebensmitteln. In der Lebensmittelverarbeitung werden die eingesetzten Rohstoffe oft verschiedenen Verarbeitungsmethoden unterzogen, bei denen die Proteine gespalten werden und die AS dann entweder in Oligopeptiden oder als freie AS im Lebensmittel vorliegen. Beispiele sind die Säurehydrolyse zur Herstellung von Würzsoßen oder enzymatische Proteinspaltungen im Zuge von Fermentationsprozessen (vgl. Kapitel 1.3). Für die formulierten Mechanismen ist es also wichtig zu wissen, welche Bindungsstellen im Peptidverband besonders anfällig sind und welche Mechanismen die Spaltungen bewirken. Die in diesem Kapitel durchgeführten Versuche zum Spaltungsverhalten von synthetischen Peptiden und nativen Polypeptiden der Gruppe der sogenannten ‚Peptaibole' sollen einen ersten Eindruck zur Klärung der chemischen Mechanismen der durch die Säurehydrolyse herbeigeführten Spaltungen beitragen. Ausgewählt wurden dieselben aufgrund der Tatsache, dass die synthetischen Peptide den Vorteil homologer AS-Sequenzen haben und somit die Möglichkeit bestand zu untersuchen, wie sich die Kettenlänge und die Position der einzelnen AS auf das Spaltungsverhalten auswirken. Des Weiteren mussten für diese Peptide keine subtilen sterischen oder elektronischen Effekte, bedingt durch die unterschiedlichen Seitenketten verschiedener proteinogener AS im Peptidverband, beachtet werden.

Die Peptaibole wurden verwendet, um das Spaltungsverhalten an Aib-Peptiden mit zusätzlichen proteinogenen AS zu analysieren. Der Vorteil bei den Peptaibolen lag zum einen darin, dass sie bereits in der Literatur sehr gut beschrieben wurden und somit bereits mehrere Daten über diese Verbindungen und deren Spaltungsverhalten vorlagen und zum anderen, dass sie in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und charakterisiert wurden und sofort eingesetzt werden konnten. Aufgrund der viel stärkeren H^+-Acidität im Vergleich zur Essigsäure, wurde wasserfreie

Trifluoressigsäure (fluoranaloge Essigsäure) als Hydrolyse-Reagenz verwendet. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf in Lebensmittel vorhandene Proteine oder Peptide soll später in weiteren Versuchen erfolgen.

3.5.3.1 Spaltungsstellen

In dieser Arbeit wurde sowohl eine schnelle Spaltung der Aib-Pro-Bindungsstelle, die Freisetzung von Aib und kleinen C-terminalen Peptiden (ausgehend von den C-Terminus-Fragmenten), als auch eine fortlaufende Spaltung der C-terminalen Aib AS der Z- oder Ac-geschützten oder freien homologen Aib-Peptiden beobachtet.

Eine schnelle Spaltung der Verbindung Aib-Pro mittels TFA oder HCl/AcOH wurde bereits in der Literatur von MAYR und JUNG (1980) für die Verbindung Ac-Aib-Pro-NH_2 beschrieben, die z. B. als Modellsubstanz für den N-Terminus des Peptaibols Alamethicin dient. Wird aber ein Mix aus TFA und DCM bei Raumtemperatur oder geringeren Temperaturen verwendet, so ist diese Verbindung stabiler. Dies wurde an der Sequenz Boc-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe gezeigt. Mittels einer 9,3 % Lösung in TFA/DCM 5:2 bei 22 °C wurde zwar die Boc-Gruppe innerhalb von 0,5 h gespalten, Prolylpeptide konnten aber mittels der durchgeführten DC nicht detektiert werden (MAYR und JUNG 1980).

Die Trifluoroacetolyse der Aib-Aaa (Aaa: proteinogene AS) Bindung wurde an den synthetischen Peptiden Ac-Aib-Ala-OH, Ac-Aib-Gly-OH, Ac-Ala-Aib-OMe und Ac-Ala-Aib-Ala-OMe untersucht (KÖNIG et al. 1980; BRÜCKNER und JUNG 1982; JUNG et al. 1983). Nach 3 h bei 37 °C waren bereits 50 % der Peptidbindungen von Ac-Aib-Ala-OH und Ac-Aib-Gly-OH gespalten, während für Ac-Ala-Aib-OMe erst nach 6 h Säurehydrolyse Spaltungen beobachtet werden konnten. Bemerkenswert ist, dass nur Spaltungen der Peptidbindungen erfasst wurden. Die Acetyl-Gruppe wurde nicht freigesetzt. Zudem konnte für das Tripeptid Ac-Ala-Aib-Ala-OMe auch nach 23 h Trifluoroacetolyse keine Spaltung beobachtet werden.

Basierend auf Versuchen mit dem Modellpeptid Ac-(NMe)Aib-Phe-OMe postulierten CREIGHTON et al. (1999) die Bildung eines Oxazolons über ein Zwischenprodukt,

einem Tetrahedral-Oxazolinolium-Ion, von dem die AS freigesetzt wird. Es wurde postuliert, dass das resultierende Ac-(NMe)AibOx-Kation schnell durch Spuren von H_2O, unter Freisetzung der Verbindung Ac-(NMe)Aib-OH, hydrolisiert wird.

OBRECHT und HEIMGARTNER (1987) zeigten, dass Dimethylamin-Hydrochlorid aus Peptiden der allgemeinen Struktur Acyl-$(Aib)_n$-NMe_2 (n = 1–3) unter Behandlung von HCl_g in Toluol freigesetzt wird. Die Bildung von intermediären Oxazolonen wurde durch Infrarot-Spektroskopie bzw. durch präparative Isolierung der entsprechenden Verbindungen bestätigt. Zudem zeigten die Autoren einen experimentellen Beweis für ein Equilibrium zwischen dem protonierten Oxazolon und dem intermediären Acylium-Ion oder dem Säurechlorid.

Die Modellpeptide Z-Aaa-Aib-NMe_2 (Aaa: Ile, Ala) können direkt durch Behandlung mit HCl_g/Toluol (5 – 8 min, 100 °C) in Oxazolone überführt werden. Die entsprechenden Dipeptide erhält man durch Behandlung mit 2 N HCl für 0,5 h bei Raumtemperatur. Die Bildung des intermediären Zwischenprodukts kann dabei durch den hohen Racemisierungsgrad der AS Ile und Ala, resultierend durch Tautomerievorgänge, abgeleitet werden.
Das Auftreten einer Racemisierung der in der Kette befindlichen chiralen AS-Reste infolge lang anhaltender (= zu langer) Aktivierung des C-terminalen Aib ist ein schon länger bekanntes Problem.

Die Behandlung von Ac-Aib-NEt_2 mit wasserfreier Trifluoressigsäure (10 % Lösung, 15 min bei 60 °C) führte zur kompletten Spaltung der Amid-Bindung, einhergehend mit der Freisetzung von $Et_2NH{\cdot}TFA$ und Ac-Aib-OH innerhalb der 15 min. Dies wurde mittels DC unter Verwendung von Referenzsubstanzen bewiesen. Zudem konnte keine Bildung eines Oxazolons nachgewiesen werden (*H*. *Brückner*, unveröffentlichte Daten). Wenn die Protonierung des Ac-O-Atoms der Verbindung Ac-Aib-NEt_2 durch TFA vorausgesetzt wird (unter der Bildung eines Oxonium-Ions), wie es von KLOTZ et al. (1964) für Ac-NHMe (N-Methylacetamid) beschrieben wurde, wäre ein intramolekularer nucleophiler Angriff auf das positive C-Atom der Carboxiamid-Gruppe eher unwahrscheinlich. Wasserfreies TFA stellt ein hoch polares, ionensolvatisierendes Lösungsmittel dar, in dem eine gleichzeitige Freisetzung von

protonierten Aminen und die Bildung eines Ionenpaares zwischen dem Carbonium-Kation und dem Trifluoroacetyl-Anion bevorzugt wird, resultierend in einem Gleichgewicht mit den entsprechenden kovalent gebundenen gemischten Anhydriden (vgl. Abbildung 3-33, Weg **A**)**.**

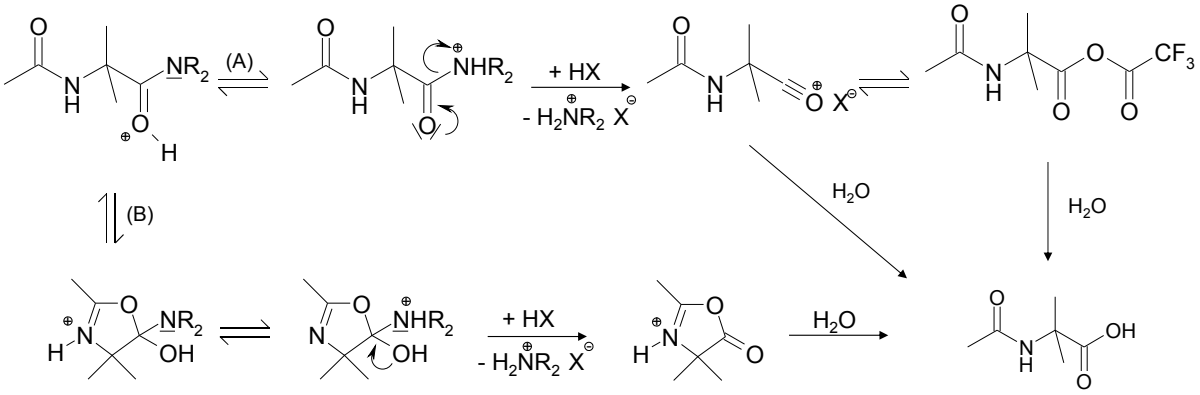


Abb. 3-33 Möglicher Spaltungsmechanismus nach Trifluoroacetolyse der Sequenz Ac-Aib-NEt_2 *via* intermediärer Bildung eines Ionen-Paares oder eines gemischten Anhydrides (Weg A) oder durch Bildung eines Oxazolons (Weg B). R=Et; HX=TFA; X^-=CF_3COO^-; Bedingungen siehe Kapitel 2.10

Diese Zwischenprodukte sind sehr reaktiv und reagieren sehr schnell mit geringen Mengen von H_2O. Dieser Mechanismus bezieht sich auf den von OBRECHT und HEIMGARTNER (1987) formulierten Mechanismus und zeigt, dass zumindest für Ac-Aib-NEt_2 durch Zyklisierung eines intermediären Carbonium/Acylium-Kations (vgl. Abbildung 3-33; Weg **A**) eine Bildung eines Oxazolons nicht nötig ist, diese aber auch nicht aus ausgeschlossen wird (vgl. Abbildung 3-33; Weg **B**). Dieser Mechanismus könnte ebenfalls zur Erklärung der schnellen N-terminalen Spaltung der Ac-Aib-Pro Bindung verwendet werden.

Dennoch muss beachtet werden, dass die am häufigsten in der Literatur präsentierten Studien bzw. Ergebnisse auf die Bildung eines intermediären Oxazolonium-Ions fokussieren.

3.5.3.2 Allgemeiner Spaltungsmechanismus

Bezugnehmend auf die oben genannten Ergebnisse wurde ein Spaltungsmechanismus formuliert, der auf einer leichten bzw. schnellen Bildung von

Oxazolonen und der Zerbrechlichkeit der in Aib-Peptiden gebildeten, protonierten Zwischenprodukte und deren Instabilität unter den durchgeführten Spaltungsbedingungen basiert (vgl. Kapitel 2.10).

Die für die Homooligo-Aib-Peptide gemachten Überlegungen wurden auf die Peptaibole und Modellpeptide übertragen und folglich wurde ein für diese Verbindungen gültiger bzw. erweiterter Mechanismus (vgl. Abbildung 3-34) formuliert.

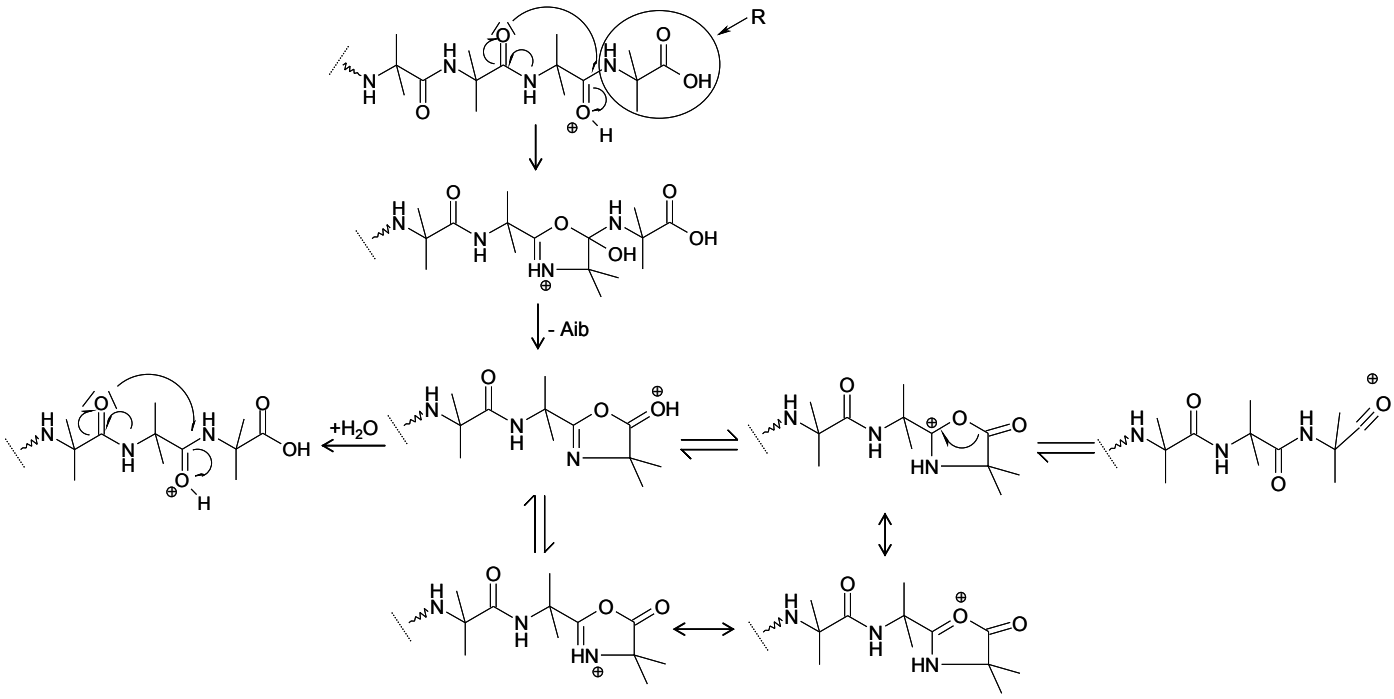


Abb. 3-34 **Vorgeschlagener Mechanismus der C-terminalen Spaltung von Homooligo-(Aib)$_n$-Peptiden *via* sich wiederholender intermediären Bildungen von Oxazolinolium/Oxazolinium- (Oxazolonium) Ionen nach Trifluoroacetolyse, resultierend in der Bildung von Homooligo-(Aib)$_{n-1}$-Peptiden (linke Seite) und entsprechende Bildung einer *b*-Serie von positiven Fragment-Ionen unter den eingestellten Bedingungen des ESI-MS (rechte Seite); eingekreister Rest R repräsentiert einen *α*-Aminoisobutyryl- oder Prolyl-Rest, oder ein disubstituiertes Amin; Bedingungen siehe Kapitel 2.10**

Bezugnehmend auf die folgende Diskussion repräsentiert der eingekreiste Rest **R** einen C-terminalen Aib-Rest. Die Erwägungen können auf Pro (Hyp, Pip) oder auf

disubstituierte Amide oder mit Einschränkungen auf Peptaibole mit Aib-Gly(Ala)-Bindungen erweitert werden.

3.5.3.3 Z- und Ac-$(Aib)_{10}$-O*t*Bu und Z-$(Aib)_7$-O*t*Bu

Durch Zugabe an TFA im Überschuss wurde die *tert*. *t*-Bu Gruppe der Peptide sehr schnell gespalten.

Der interne nucleophile Angriff des Carbonyl (C=O) O-Atoms der Carboxiamid-Gruppe der zweiten bis letzten Aib AS auf die Carboxy-Gruppe des letzten Aib-Restes wird höchstwahrscheinlich durch den "*gem*-dimethyl"- oder "*Thorpe-Ingold"*-Effekt (HEIMGARTNER 1991; TONIOLO et al. 2001; BACHRACH 2008) begünstigt. Dies führt zu einer schnellen Bildung eines instabilen tetrahedralen Oxazolinolium-Zwischenproduktes (MANNEKENS et al. 2003), welches durch einen Protonentransfer anschließend stabilisiert wird und das C-terminale Aib freisetzt. Die resultierenden Oxazolonium-Peptide können dann schnell durch Spuren von Wasser (die immer präsent sind, auch in wasserfrei gekennzeichnetem TFA) hydrolisiert werden.

Ausgehend von einer schnellen Freisetzung einer kompletten Serie der Peptide Z-$(Aib)_{9\text{-}4}$ aus der Verbindung Z-$(Aib)_{10}$-OH kann von einer wiederholten Spaltung der C-terminalen Aib AS ausgegangen werden. Die Serie endet mit der Bildung des Peptides Z-$(Aib)_4$-OH. Dies könnte durch die acidolytische Stabilität von Tri- und Tetrapeptiden, basierend auf ihrer besonderen stabilen sekundären Struktur, erklärt werden.

Zudem wird die postulierte Stabilität der kleineren Acylpeptide gegenüber der durchgeführten Trifluoroacetolyse auch durch die Freisetzung und Detektion der Verbindung Ac-Phe^1-Aib^2-Aib^3-OH nach 15 h Säurehydrolyse der Precusor-Verbindung Antiamoebin unterstützt bzw. bestätigt, auch aufgrund der Tatsache, dass dieses Tripeptid über den weiteren Verlauf der Trifluoroacetolyse stabil bleibt (vgl. Abbildung 3-29).

Bemerkenswert ist, dass vom C-terminalen Ende hergehend keine Oxazolone gebildet werden, sondern nur von den folgenden Aib´s, denn ausgehend von einem

C-terminalen Oxazolon würde das Precursor-Peptid durch Hydrolyse wieder hergestellt werden. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die C-terminale Carboxyl-Gruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit der Trifluoressigsäure ausbildet. Die daraus resultierenden Lösungsmittel-Cluster schirmen das C-Atom der Carboxy-Gruppe vor dem nucleophilen Angriff des Sauerstoffs der angrenzenden Carboximid-Gruppe ab. Dieser Effekt könnte ebenso die festgestellte Stabilität der Ac-Aib-OH Verbindung in TFA erklären.

Allerdings konnte die Bildung der Serie H-$(Aib)_{10\text{-}3}$-OH durch Spaltung der Z-Gruppe beobachtet werden. Diese Beobachtung widerspricht aber den Erfahrungen bzw. dem Kenntnisstand der „nicht-Aib-Chemie“: Die Z-Gruppe wird üblicherweise als orthogonaler Schutz in der Peptid Chemie eingesetzt und ist unter den angewendeten Bedingungen normalerweise stabil gegenüber TFA.

Es wird angenommen, dass die Freisetzung der Aib-Reste ausgehend vom N-Terminus der freien Peptide nicht stattfindet, weil der protonierte N-terminus den nucleophilen Angriff der entsprechenden Carboxiamid-Gruppe der Aib-AS abschwächt. Dieses Phänomen wird dessen elektronenziehender Eigenschaft zugeordnet.

Ausgehend von den Ergebnissen der Trifluoroacetolyse der Peptaibole und der daraus resultierenden Freisetzung von Di- und Tripeptiden (vgl. Abbildung 3-29) kann auch hier eine Bildung von Oxazolonen an bestimmten Positionen im Peptid-Rückgrat bezugnehmend auf den allgemein formulierten Mechanismus (vgl. Abbildungen 3-33 und 3-34) in Betracht gezogen werden. Der eingekreiste Rest R in Abbildung 3-34 repräsentiert in diesem Fall eine C-terminale Peptid-Sequenz.

Die Aussagen über die Homooligo-Aib-Peptide können auch auf die Peptidbindungen zwischen Aib und Pro oder Homologen erweitert bzw. bezogen werden. Die Spaltung der Amid-Bindung verläuft sehr schnell und kann an jeder Stelle der Polypeptidkette erfolgen.

3.5.3.4 Peptaibole

Die oben genannten Betrachtungen können auch auf die Verbindungen Alamethicin und Paracelsin übertragen werden. Im Fall von Alamethicin können die schnellen Spaltungen der Aib^{1}-Pro^{2} und Aib^{13}-Pro^{14} Bindungsstellen und die daraus resultierenden Freisetzungen der entsprechenden Fragmente mit dem gezeigten Mechanismus erklärt werden. Für Paracelsin wurde eine schnelle Spaltung der Bindung zwischen Aib^{13}-Pro^{14} beobachtet. Ausgehend vom resultierende Ac-Aib^{1}-Aib^{13}-OH wurde sowohl eine Freisetzung des Dipeptides H-Aib^{12}-Aib^{13}-OH, als auch des Tripeptides H-Gly^{11}-Aib^{12}-Aib^{13}-OH im weiteren Verlauf der Trifluoroacetolyse beobachtet. Auch hier konnte die Freisetzung von stabilen Tripeptiden und der nucleophile Angriff der sterisch gehinderten Aib AS auf das sterisch am geringsten gehinderte Gly beobachtet werden. Mit Ausnahme dieser AS sind die Sequenzen der Verbindungen Aib-Aaa-(Aib-Aaa)$_n$-Aib- (Aaa: proteinogene AS; mit Ausnahme von C-terminalen Aib-Gln-Xol Bindungen (KÖNIG et al. 1980; BRÜCKNER und JUNG 1982; JUNG et al. 1983; BRÜCKNER et al. 1985)) stabil gegenüber Trifluoroacetolysen.

Es kann angenommen werden, dass die für Paracelsin detektierte Freisetzung des C-terminalen Dipeptides Aib^{12}-Aib^{13} aus der Sequenz Ac-Aib^{1}-Aib^{13}-OH (resultierend aus der Abspaltung des C-terminalen Prolylheptapeptides; vgl. Abbildung 3-29) ebenfalls über die Bildung eines intermediären Oxazolons entsteht. Die Spaltung der Aib^{10}-Gly^{11} Bindung nach 8 h deutet auf eine eher moderate Säureempfindlichkeit dieser Bindung hin.
Das nach Trifluoroacetolyse gebildete Fragment Ac-Aib^{1}-Ala^{11}-OH aus der Precusor-Substanz Trichotoxin zeigte hingegen ein deutlich anderes Spaltungsverhalten. Bei diesem Peptaibol wurde das C-terminale Tripeptid Aib^{9}-Ala^{10}-Ala^{11} anstelle des C-terminalen Ala^{11} freigesetzt. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass am Ala-Rest im Gegensatz zum Aib Rest am *α*-C-Atom ein Wasserstoff-Atom gebunden ist und die Oxazolon-Bildung dadurch nicht begünstigt wird. Der intramolekulare Angriff des Carbonyls des Aib^{8} auf Aib^{9} könnte wiederum durch Bildung eines Oxazolons, resultierend in der Freisetzung des Tripeptides, erklärt werden. Die anschließend beobachtete Stabilität des Tripeptides stimmt hauptsächlich mit der Stabilität der bereits zuvor beschriebenen Modell-Sequenz Ac-Ala-Aib-Ala-OMe

überein. Die Verbindung Ac-Aib^{1}-Aib^{8}-OH verbleibt über den weiteren Trifluoroacetolyse-Verlauf stabil. Es könnte jedoch möglich sein, dass kleinere Fragmente entstanden sind, die aufgrund ihrer geringen Intensität aber nicht detektiert werden konnten.

Im Allgemeinen ist bekannt, dass die Spaltung von Aib-Peptiden langsamer abläuft, wenn ein Mix aus TFA und organischen Lösungsmitteln (beispielsweise DCM) verwendet wird. Dies erklärt sich sowohl durch eine Abnahme der Dissoziation als auch durch die Konzentration der TFA. Die Spaltungen laufen viel langsamer ab, wenn angesäuerte wässrige Lösungsmittel oder beispielsweise Wasser der TFA zugegeben wird, bedingt durch die geringere Befähigung zur Bildung von Oxazolonen in wässrigen Lösungen. Erhitzungen bei höheren Temperaturen für längere Zeit können allerdings die acidolytische Spaltung aktivieren. Es ist davon auszugehen, dass ein Wechsel des Oxazolon-Spaltung-Mechanismus zum üblichen säure-katalysierten Spaltungsmechanismus von Amid-Bindungen mit der Präferenz von disubstituierten Amiden einhergeht.

3.5.3.5 Übereinstimmung des Trifluoroacetolyse Spaltungsmodell und der massenspektrometrischen Fragmentierung

Die Überprüfung der Trifluoroacetolyse-Fragmente der Verbindung Z-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu (vgl. Tabelle 3-12) resultierend in einer Serie von Z-(Aib)$_{10\text{-}5}$-OH und die Ergebnisse der MS Analyse (vgl. Abbildung 3-30) des Decapeptides mit den Einstellungen Low-CID-MS (vgl. Kapitel 2.10) zeigten eine beachtliche Übereinstimmung zwischen der Bildung von Homooligo-Aib-Peptid-Fragmenten im protischen Lösungsmittel und der Gasphasendissoziation, denn die entsprechenden regulären (regelmäßigen) Serien der *b*-Ionen der entsprechenden Z-(Aib$_{10\text{-}2}$)$^{+}$ Acylium- (oder Oxonium/Oxazolonium-) Kationen konnten im „positiven Mode“ detektiert werden (vgl. Abbildungen 3-30 und 3-34). Analog wurden sowohl auch Serien vom b_2- bis hin zum b_{10}- Kation der Verbindung Ac-(Aib)$_{10}$-O*t*Bu als auch vom b_2 bis hin zum b_7 Kation der Verbindung Z-(Aib)$_7$-O*t*Bu, nachgewiesen.

Die detektierten Intensitäten (’Abundance’) der entsprechenden Acylium-Ionen sind ebenfalls in auffallender Übereinstimmung: Hohe Intensitäten wurden für Ionen, resultierend aus den Aib-Resten, detektiert. Diese werden bedingt durch die *geminalen* Dimethyl-Gruppen stabilisiert. Niedrige Intensitäten konnten für Acylium-Ionen resultierend aus proteinogenen AS beobachtet werden. Beispielsweise konnte für die partiale Sequenz –Aib^{9}-Ala^{10}-Aib^{11}-Aib^{12}-Pro^{13}- der Verbindung Trichotoxin A40/5 die größte Intensität für das resultierenden b_{12} Acylium-Ion festgestellt werden und für die b_9 und b_{11} Ionen, wurden im Vergleich zum b_{10} Ion größere Intensitäten festgestellt (JAWORSKI und BRÜCKNER 1999).
Die beobachtete moderate Säureempfindlichkeit der Bindungsstelle -Aib-Gly- kann ebenfalls im positiven MS-Ionisierungs-Modus der Verbindung Suzukacillin A4 festgestellt werden. Die MS/MS Analyse des b_{13} Fragments, resultierend aus der partialen Sequenz -Aib^{8}-Aaa^{9}-Aib^{10}-Gly^{11}-Aib^{12} zeigte die höchste Intensität für das b_{10} Ion. Für b_9 und besonders für b_{11} konnten niedrigere Intensitäten im Vergleich zu den b_8 und b_{12} Acylium-Ionen festgestellt werden (KRAUSE et al. 2006).

Die gezeigten Ergebnisse der Oligo-Aib-Peptide und Peptaibole und die präsentierten mechanistischen Aspekte stimmen sehr gut mit den von OBRECHT und HEIMGARTNER (1987) gezeigten Ergebnissen überein.

3.5.3.6 Konsequenzen der Spaltungsversuche auf die Racemisierung von AS

In der Lebensmittelindustrie führen manche Verarbeitungsmethoden zu einer Racemisierung der in Lebensmitteln vorhandenen AS. Der Grad der Racemisierung wird durch viele Faktoren beeinflusst. Einer der wichtigsten Parameter ist der pH-Wert. So konnten besonders in alkalibehandelten Lebensmitteln hohe Gehalte an D-Enantiomeren festgestellt werden. Die Ursache liegt hierbei in mehreren Racemisierungsmöglichkeiten begründet. Zum einen kann allein die Erhöhung des pH-Wertes über einen Carbanionenmechanismus eine Racemisierung zur Folge haben. Über die Bildung eines sp^2-hybridisierten planaren Übergangszustandes, an diesen wiederum ein Proton von beiden Seiten angelagert werden kann, kommt es zur Racemisierung (BADA 1972; BADA 1982; FRIEDMAN 1999). Für den im stark sauren Bereich vorhandenen Protonenüberschuss wurde ein protonenkatalysierter

Enolisierungsmechanismus als Racemisierungsmechanismus vorgeschlagen (FRANK et al. 1981).

Die Behandlung von Lebensmitteln mit starken Säuren wie z. B. HCl kann zur Aufspaltung der Proteine führen, resultierend in der Bildung von Peptiden (Beispiel Gelatine: LÜPKE und BRÜCKNER 1998; ERBE und BRÜCKNER 1999) oder sogar von freien AS (Beispiel Würzsoßen: THEIS et al. 2004). Aus der peptidchemischen Literatur ist bekannt, dass in Peptiden gebildete Oxazolone sowohl selbst leicht racemisieren als auch in benachbarten AS infolge von Tautomerie eine Racemisierung bewirken können. Dieser Effekt spielt bei der Säurebehandlung von Proteinen eine geringe Rolle, ist jedoch in den in dieser Arbeit untersuchten Modellpeptiden extrem ausgeprägt. Die vorgestellten Untersuchungen können deshalb die Grundlage zur Untersuchung und Erstellung verfeinerter Racemisierungsmechanismen, zum Beispiel bei der Säurebehandlung von Lebensmittelproteinen sein.

Die Spaltungsversuche zeigen, dass mehrere Racemisierungsmöglichkeiten in säurebehandelten Lebensmitteln zu berücksichtigen sind. Das Spaltungsverhalten von Proteinen wird sehr stark von den einzelnen AS beeinflusst. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Racemisierungsanfälligkeit von Proteinen durch die einzelnen AS beeinflusst wird.

4 Zusammenfassung

Zur Ergänzung der in unserer Arbeitsgruppe gezeigten Ergebnisse über das Vorkommen von D-AS in Lebensmitteln, besonders in fermentierten und erhitzten Lebensmitteln, wurden verschiedene im Handel erhältliche Kaffeeprodukte auf ihren Gehalt an D-AS mittels GC-MS analysiert. In allen Produkten konnten relative Gehalte (10,5 % bis 50,7 %) an verschiedenen D-AS (D-Ala, D-Ser, D-Leu, D-Asx, D-Phe, D-Glx, D-Orn) detektiert werden. Zusätzlich wurden die handelsüblichen Kaffeeprodukte mit einem besonderen Kaffeeprodukt namens Kopi-Luwak verglichen. Für dieses Produkt konnten die höchsten relativen Anteile an D-AS bestimmt werden. Das Besondere an diesem Kaffee ist, dass die Kaffeekirschen vor ihrer Verwendung von dem sogenannten Flecken-Musang (*Paradoxurus hermaphroditus;* einer Schleichkatzenart) verzehrt werden und somit „angeblich“ eine besondere Art der Fermentation durch die im Verdauungstrakt des Tieres angesiedelten Enzyme und Mikroorganismen stattfindet. Durch die verschiedenen technologischen Verarbeitungsprozesse der Kaffeebohnen ergeben sich mehrere Möglichkeiten zur Erklärung der D-AS-Gehalte. Es konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit detektierten D-AS der analysierten Kaffeeproben zum größten Teil während der Röstprozesse und somit im Zuge der Maillard-Reaktionen entstanden sind. Enzymatisch induzierte Racemisierungen während der Fermentation spielen bei der Bildung eher eine untergeordnete Rolle.

Zur Verifizierung und Ergänzung des in unserer Arbeitsgruppe formulierten Racemisierungsmechanismus im Zuge der Maillard-Reaktion wurden die proteinogenen Amadori-Verbindungen Fructose-L-Alanin, Fructose-L-Prolin, Fructose-L-Phenylalanin und die nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen Fructose-L-Norvalin, Fructose-L-Phenylglycin sowie Fructose-L-Aminobuttersäure nach etablierten Methoden synthetisiert. Die Aufreinigung der synthetisierten Verbindungen wurde in zwei Schritten mittels Ionenaustauschchromatographie und einer neu entwickelten Methode mittels Säulenchromatographie durchgeführt. Die Reinheit der aufgereinigten Substanzen wurde mittels NMR überprüft. Zur analytischen Trennung der Amadori-Verbindungen wurde eine HPLC-MS-Methode entwickelt, die es ermöglicht, sowohl die proteinogenen Amadori-Verbindungen als

auch die nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen jeweils in einem Lauf zu trennen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden verschiedene Honigproben auf ihren Gehalt an D-AS analysiert. Honig ist reich an reduzierenden Zuckern (Glucose und Fructose) und enthält einen hohen Anteil an freien AS. Folglich ist die Bildung von Amadori-Verbindungen, als auch die Bildung von Heyns-Verbindungen, in diesem Medium begünstigt. Der postulierte Racemisierungsmechanismus beschreibt die Bildung von D-AS über die genannten Verbindungen im Zuge der Maillard-Reaktion. Mittels etablierter GC-MS-Analysemethoden konnten in allen analysierten Honigproben verschiedene Gehalte an D-AS nachgewiesen werden. Zudem wurden mittels der neu entwickelten HPLC-MS-Methode die Amadori-Verbindungen Fructose-Alanin und Fructose-Phenylalanin detektiert. Dies spricht dafür, dass die Maillard-Reaktion schon bei physiologischen Temperaturen um ca. 37 °C im Bienenstock bzw. bei Lagerungstemperaturen um 20 °C abläuft. Auch hier wird durch die Reaktion der reduzierenden Zucker, insbesondere von Glucose und Fructose, mit den freien AS die Bildung von glykosilierten Verbindungen (Amadori-Verbindungen und/oder Heyns-Verbindungen) angenommen. Die Bildung derselben auch unter physiologischen Bedingungen ist begünstigt durch die Aufkonzentrierung des Nektars in den Bienenwaben und des dadurch bedingten niedrigen a_w-Wertes der Honige. Durch anschließende Folgereaktionen können die AS aus diesen Verbindungen wieder freigesetzt werden und eine Racemisierung über den von PÄTZOLD und BRÜCKNER (2006a) postulierten Racemisierungsmechanismus erscheint in diesem Zusammenhang als sehr wahrscheinlich.

In Erhitzungsversuchen mit synthetisierten Amadori-Verbindungen wurde der Entstehungsmechanismus im Zuge der Maillard-Reaktion analysiert. Zunächst wurden die proteinogenen Amadori-Verbindungen (aus den proteinogenen AS Ala und Pro synthetisiert) trocken bei 130 °C erhitzt. In einem weiteren Versuchsmodell wurden zum einen die nichtproteinogenen Aminosäuren (L-Abu, L-Phg und L-Nva) und zum anderen die aus diesen AS synthetisierten nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen bei 130 °C in einer Honigprobe unterschiedlich lang erhitzt. Die Analyse der freien AS erfolgte direkt mittels Kationenaustauscher und GC-MS. Zur

Analyse der freien und gebundenen AS wurde eine Totalhydrolyse durchgeführt. In allen Proben konnte eine Entstehung von D-AS nachgewiesen werden. In einigen Proben wurden nach der durchgeführten Totalhydrolyse höhere Gehalte an D-AS detektiert als nach Analyse der freien AS. Eine chemisch-physikalisch induzierte Racemisierung konnte mittels Bestimmung von Blindwerten ausgeschlossen werden bzw. auf ein Minimum reduziert werden. Zudem konnte in dieser Arbeit die Entstehung von nichtproteinogenen Amadori-Verbindungen im Medium Honig nach Zugabe der entsprechenden nichtproteinogenen AS (L-Abu, L-Nva und L-Phg) zum Honig und anschließender Erhitzung mittels HPLC-ESI-MS nachgewiesen werden.
Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die detektierten Racemisierungen hauptsächlich über den in unserer Arbeitsgruppe formulierten Racemisierungsmechanismus ablaufen. Dieser Mechanismus beschreibt eine Enantiomerisierung von AS durch Folgereaktionen der während der Maillard-Reaktion entstehenden Amadori- oder Heyns-Verbindungen. Durch Enolisierung dieser glykosilierten Verbindungen wird die Bildung eines intermediären Carbanions begünstigt. Im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion bilden sich durch Reprotonierung (partiell) racemisierte AS-Derivate, aus denen die AS im weiteren Verlauf (unter Bildung von Desoxyosonen) wieder freigesetzt werden. Der formulierte Mechanismus beschränkt sich jedoch auf die Bildung von D-AS einhergehend mit der Bildung von 1- und 3-Desoxyosonen im Zuge der Maillard-Reaktion. Durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse wurde der formulierte Mechanismus ergänzt. Zum einen ist eine Enantiomerisierung auch bei der Bildung der 4-Desoxyosone vorstellbar, so dass bereits in diesen Verbindungen die AS in der D-Konfiguration vorliegen können. Die Freisetzung der gebundenen AS muss bei diesen Verbindungen mittels Totalhydrolyse erfolgen. Zum anderen ist eine Modifikation der 4-Desoxyosone analog der Bildung der 1- bzw. 3-Desoxyosone denkbar. Durch Deprotonierung entsteht ein intermediäres Carbanion, aus dem durch Reprotonierung partiell racemisierte AS-Derivate entstehen. Die Freisetzung der AS erfolgt ebenfalls durch Säurehydrolyse.
Die Ergebnisse zeigen, dass eine Racemisierung von AS im Zuge der Maillard-Reaktion unter Beachtung der verschieden Racemisierungsmechanismen möglich ist und dass ein eindeutiger Zusammenhanghang zwischen der Detektion von D-AS und Amadori- bzw. Heyns-Verbindungen besteht.

Die formulierten Racemisierungsmechanismen beschränken sich auf das Vorhandensein von freien AS, die mit reduzierenden Zuckern reagieren können. In der Lebensmittelverarbeitung werden zur Spaltung der Proteine die eingesetzten Rohstoffe oftmals einer Säurebehandlung (zum Beispiel bei der Herstellung verschiedener Würzsoßen) unterzogen. Aus diesem Grund wurden mittels Spaltungsversuchen mit synthetischen *homo*-Aib-Peptiden und nativen Aib-haltigen Peptiden (sogenannte Peptaibole) erste Modellversuche zur Spaltungsanfälligkeit verschiedener Bindungsstellen im Peptidverband durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Peptidsequenzen bzw. einzelne Bindungsstellen besonders anfällig gegenüber Säurehydrolysen sind. Diese Ergebnisse führten zur Formulierung von zwei möglichen Spaltungsmechanismen. Zum einen wurde ein Mechanismus nach Trifluoroacetolyse *via* intermediärer Bildung eines Ionenpaares oder eines gemischten Anhydrides oder durch Bildung eines Oxazolons formuliert. Und zum anderen wurde ein Mechanismus der C-terminalen Spaltung von Homooligo-$(Aib)_n$-Peptiden *via* sich wiederholender intermediärer Bildungen von Oxazolinolium/Oxazolinium- (Oxazolonium) Ionen nach Trifluoroacetolyse formuliert.
Da die intermediär gebildeten Oxazolone sowohl selbst epimerisieren, als auch eine Epimerisierung der benachbarten Aminosäuren im Peptidverband bewirken können, kann der diesbezüglich geschilderte Mechanismus zur Erklärung der Epimerisierung von Aminosäuren in säurebehandelten, proteinhaltigen Lebensmitteln dienen.
Diese Ergebnisse sollen in Folgeversuchen auf in Lebensmitteln vorhandene Proteine übertragen werden.

5 Literatur

ABE H, PARK JN, FUKUMOTO Y, FUJITA E, TANAKA T, WASHIO T, OTSUKA S, SHIMIZU T, WATANABE K (1999) Occurrence of D-Amino Acids in Fish Sauces and Other Fermented Fish Products. *Fisheries Science* **65**: 637-641

ABRAMS A, LOWY PH, BORSOOK H (1955) Preparation of 1-Amino-deoxy-2-ketohexoses from Aldohexoses and α-Amino Acids. *Journal of the American Chemical Society* **77**: 4794-4796

AHMED N (2005) Advanced glycation endproducts - role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **67**: 3-21

AHMED N, THORNALLEY PJ (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **9***:* 233-245

ALI HSM, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2006) Determination of L- and D-amino acids in smokeless tobacco products and tobacco. *Food Chemistry* **99**: 803-812

ALI HSM, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2010) Gas chromatographic determination of amino acid enantiomers in bottled and aged wines. *Amino Acids* **38**: 951–958

ALTENA JH, VAN DEN OUWELAND GAM, TEUNS CJ, SING BT (1981) Analysis of the 220-MHz, P.M.R. spectra of some products of the AMADORI and HEYNS Rearrangements. *Carbohydrate Research* **92**: 37-49

ANET EFLJ, REYNOLDS TM (1956) Reactions between Amino-Acids, Organic Acids and Sugars in Freeze-dried Apricots. *Nature* **177**: 1082-1083

ANGRICK M, REWICKI D (1980) Die Maillard-Reaktion. *Chemie in unserer Zeit* **14**: 149-157

AJANDOUZ EH, PUIGSERVER A (1999) Nonenzymatic Browning Reaction of Essential Amino Acids: Effect of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 1786-1793

BACHRACH SM (2008) The *gem*-Dimethyl Effect Revisited. *The Journal of Organic Chemistry* **73**: 2466-2468

BADA JL (1972) Kinetics of Racemization of Amino Acids as a function of pH. *Journal of the American Chemical Society* **94**: 1371-1373

BADA JL (1982) Racemisation of Amino Acids in Nature. *Interdisciplinary Science Reviews* **7**: 30-46

BADA JL (1984) *In Vivo* Racemisation in Mammalian Proteins. *Methods in Enzymology* **106**: 98-115

BADA JL, SCHROEDER RA (1975) Amino Acid Racemization Reactions and their Geochemical Implications. *Naturwissenschaften* **62**: 71-79

BAEK IG (1999) Analytik von Aminosäuren und biogenen Aminen in fermentierten Lebensmitteln mittels HPLC und GC. *Dissertation,* Justus-Liebig Universität Gießen

BALTES W (1993) Maillardreaktion in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **47**: 9-14

BALTES W (2007) Lebensmittelchemie. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

BAPTISTA JAB, CARVALHO RCB (2004) Indirect determination of Amadori compounds in milk-based products by HPLC/ELSD/UV as an index of protein deterioration. *Food Research International* **37**: 739-747

BASTA G, SCHMIDT AM, DE CATERINA R (2004) Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research* **63**: 582-592

BEKSAN E, SCHIEBERLE P, ROBERT F, BLANK I, FAY LB, SCHLICHTHERLE-CERNY H, HOFMANN T (2003) Synthesis and Sensory Characterization of Novel Umami-Tasting Glutamate Glycoconjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51***:* 5428-5436

BELITZ HD, GROSCH W, SCHIEBERLE P (2008) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

BELL LN (1997) Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Food Chemistry* **59**: 143-147

BHUSHAN R, BRÜCKNER H (2004) Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: A review. *Amino Acids* **27**: 231-247

BLANK I, DEVAUD S, MATTHEY-DORET W, ROBERT F (2003) Formation of Odorants in Maillard Model Systems Based on L-Proline as Affected by pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51***:* 3643-3650

BOCK K und THOGERSEN H (1982) Nuclear magnetic resonance spectroscopy in the study of mono- and oligosaccharides. *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **13**: 1-57

BONIGLIA C, CARRATÙ B, SANZINI E (2002) Enantiomer separation of D-L branched amino acids by Capillary Electrophoresis in sport nutritional supplements. *Journal of Food Science* **67**: 1352-1355

BORSOOK H, ABRAMS A, LOWY PH (1955) Fructose-amino acids in liver: stimuli of amino acid incorporation in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **215**: 111-124

BOSSE A, BRÜCKNER H, PÄTZOLD R (2010) Erhitzungsbedingte Racemisierung von Aminosäuren mit verschiedenen reduzierenden Zuckern. *Lebensmittelchemie* **64**: 1-2

BRANDS CMJ und VAN BOEKEL MAJS (2001) Reactions of Monosaccharides during Heating of Sugar-Casein Systems: Building of a Reaction Network Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4667-4675

BRÜCKNER H, JUNG G (1982) Synthesis of L-Prolyl-leucyl-α-aminoisobutyryl-α-amino-isobutyryl-glutamyl-valinol and Proof of Identity with the Isolated C-Terminal Fragment of Trichotoxin A-40. *Liebigs Annalen der Chemie* **1982**: 1677-1699

BRÜCKNER H, HAUSCH M (1989a) Detection of free D-Amino Acids in Food by Chiral Phase Capillary Gas Chromatography. *Chromatographia* **12**: 680-684

BRÜCKNER H, HAUSCH M (1989b) Gas Chromatographic Detection of D-Amino Acids as Common Constituents of Fermented Foods. *Chromatographia* **28**: 487-492

BRÜCKNER H, HAUSCH M (1990a) D-Amino acids as ubiquitous constituents in fermented foods. In: LUBEC G, ROSENTHAL GA (Editors.) Amino Acids. Chemistry, Biology and Medicine. Escom Verlag, Leiden: 1172-1182

BRÜCKNER H, HAUSCH M (1990b) D-amino acids in dairy products: Detection, origin and nutritional aspects. I. Milk, fermented milk, fresh cheese and acid curd cheese. *Milchwissenschaft* **45**: 357-360

BRÜCKNER H, WESTHAUSER T (1994) Chromatographic Determination of D-Amino Acids as Native Constituents of Vegetables and Fruits. *Chromatographia* **39**: 419-426

BRÜCKNER H, WESTHAUSER T (2003) Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino Acids* **24**: 43-55

BRÜCKNER H, KÖNIG WA, AYDIN M, JUNG G (1985) Trichotoxin A40. Purification by counter - current distribution and sequencing of isolated fragments *Biochimica et Biophysica Acta* **827**: 51

BRÜCKNER H, JAEK P, LANGER M, GODEL H (1992) Liquid chromatographic determination of D-amino acids in cheese and cow milk. Implication of 43 starter cultures, amino acid racemases, and rumen microorganisms on formation, and nutritional considerations. *Amino Acids* **2**: 271-287

BRÜCKNER H, BECKER D, LÜPKE M (1993) Chirality of Amino Acids of Microorganisms Used in Food Biotechnology. *Chirality* **5**: 385-392

BRÜCKNER H, JUSTUS J, KIRSCHBAUM J (2001) Saccharide induced racemization of amino acids in the course of the Maillard reaction. *Amino Acids* **21**: 429-433

BRÜCKNER H, KIRSCHBAUM J, PÄTZOLD R (2002) A new racemization mechanism for amino acids. In: BENEDETTI E, PEDONE C (Editors.) Proceedings of the 27th European peptide Symposium Edizioni Ziino, Napoli, Italy: 54-55

BRÜCKNER H, KIRSCHBAUM J, PÄTZOLD R (2003) A new racemization route for amino acids. 6th German Peptide Symposium, Berlin: 160

BUNN HF, HIGGINS PJ (1981) Reaction of Monosaccharides with Proteins: Possible Evolutionary Significance. *Science* **213**: 222-224

CALABRESE M, STANCHER B (1999) A study of the proline isomerisation in typical Italian wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 1357-1360

CALIGIANI A, CIRLINI M, PALLA G, RAVAGLIA R, ARLORIO M (2007) GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin. *Chirality* **19**: 329-334

CARDELLE-COBAS A, MORENO FJ, CORZO N, OLANO A, VILLAMIEL M (2005) Assessment of Initial Stages of Maillard Reaction in Dehydrated Onion and Garlic Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 9078-9082

CARLAVILLA D, MORENO-ARRIBAS MV, FANALI S,CIFUENTES A (2006) Chiral MEKC-LIF of amino acids in foods: Analysis of vinegars. *Electrophoresis* **27**: 2551-2557

CASADO FJ, SÁNCHEZ AH, REJANO L, MONTAŇO A (2007) D-Amino Acid Formation in Sterilized Alkali-Treated Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 3503-3507

CASAL S, OLIVEIRA MB, FERREIRA MA (2000) Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their *N*(*O*,*S*)- ethoxycarbonyl heptafluorobutyl ester derivatives. *Journal of Chromatography A* **866**: 221-230

CASAL S, ALVES MR, MENDES E, OLIVEIRA MBPP, FERREIRA MA (2003) Discrimination between Arabica and Robusta coffee species on the basis of their amino acid enantiomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 6495-6501

CASAL S, MENDES E, OLIVEIRA MBPP, FERREIRA MA (2005) Roast effects on coffee amino acid enantiomers. *Food chemistry* **89**: 333-340

CINER-DORUK M, EICHNER K (1979) Bildung und Stabilität von Amadori-Verbindungen in wasserarmen Lebensmitteln. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **168**: 9-20

COLEMAN WM, CHUNG HL (2002) Pyrolysis GC-MS analysis of Amadori compounds derived from selected amino acids and glucose. *Journal of Analytical and Applied* Pyr*olysis* **62**: 215-223

CREIGHTON CJ, ROMOFF TT, BU JH, GOODMAN M (1999) Mechanistic studies of an unusual amide bond scission. *Journal of the American Chemistry Society* ***121***: 6786-6791

DAVIDEK T, CLETY N, AUBIN S, BLANK I (2002) Degradation of the Amadori Compound N-(1-Doxy-D-fructos-1-yl)-glycine in Aqueous Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 5472-5479

DAVIDEK T, CLETY N, DEVAUD S, ROBERT F, BLANK I (2003) Simultaneous Quantitative Analysis of Maillard Reaction Precursors and Products by High-Performance Anion Exchange Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 7259-7265

DAVIDEK T, KRAEHENBUEHL K, DEVAUD S, ROBERT F, BLANK I (2005) Analysis of Amadori Compounds by High-Performance Cation Exchange Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **77**: 140-147

DAVIES AMC (1975) Amino acid analysis of honeys from eleven countries. *Journal of Apicultural Research* **14**: 29-39

DEIFEL A (1989) Die Chemie des Honigs. *Chemie in unserer Zeit* **23/1**: 25-33

DEL CASTILLO MD, CORZO N, OLANO A (1999) Early stages of Maillard Reaction in Dehydrated Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4388-4390

DELFS J, JUSTUS J, KIRSCHBAUM J, BRÜCKNER H (2002) Fructoseinduzierte Racemisierung von basischen Aminosäuren. *Lebensmittelchemie* **56**: 107-108

DESAI MJ, ARMSTRONG DW (2004) Analysis of native amino acid and peptide enantiomers by high-performance liquidchromathography / atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **39**: 177-187

EBBERS EJ, ARIAANS GJA, HOUBIERS JPM, BRUGGINK A, ZWANENBURG B (1997) Controlled Racemization of Optically Active Organic Compounds: Prospects for Asymmetric Transformation. *Tetrahedron* **53**: 9417-9476

EICHNER K, CINER-DORUK M (1979) Bildung und Stabilität von Amadori - Verbindungen in wasserarmen Lebensmitteln. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -Forschung* **168**: 9-20

EICHNER K, REUTTER M, WITTMANN R (1990) Detection of Maillard Reaction Intermediates by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) an Gas Chromatography. In: FINOT PA, AESCHBSCHER HU, HURRELL RF, LIARDON R (Editors) The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin: 63-77

ELMADFA I, LEITZMANN C (2004) Ernährung des Menschen. 4.Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart

ERBE T (1999) Die Quantifizierung von Aminosäurenisomeren in Lebensmitteln mittels chiraler Gaschromatographie-Massenspektrometrie im Hinblick auf die Relevanz und die Entstehungsmechanismen von D-Aminosäuren. *Dissertation*, Justus-Liebig Universität Gießen

ERBE T, BRÜCKNER H (1998) Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **207**: 400-409

ERBE T, BRÜCKNER H (1999) Microwave treatment of dietary gelatin does not generate *cis*-4-hydroxy-L-proline, an inhibitor of collagen biosynthesis. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **208**: 424-428

ERBE T, BRÜCKNER H (2000a) Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *Journal of Chromatography A* **881**: 81-91

ERBE T, BRÜCKNER H (2000b) Studies on the optical isomerization of dietary amino acids in vinegar and aqueous acetic acid. *European Food Research and Technology* **211**: 6-12

FERRARI E, GRANDI R, LAZZARI S, SALADINI M (2007) NMR study on Pt(II) interaction with Amadori compounds. *Inorganica Chimica Acta* **360**: 3119-3122

FISHER GH (2007) Biologically active D-amino acids. *Amino Acids* **32**: 1

FISHER LM, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986a) Energetics of proline racemase: Racemization of unlabeled proline in the unsaturated, saturated, and oversaturated regimes. *Biochemistry* **25**: 2529-2537

FISHER LM, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986b) Energetics of proline racemase: Tracer perturbation experiments using [^{14}C]Proline that measure the interconversion rate of two forms of free enzyme. *Biochemistry* **25**: 2538-2542

FISHER LM, BELASCO JG, BRUICE TW, ALBERY WJ, KNOWLES JR (1986c) Energetics of proline racemase: Transition-state fractionation factors for the two protons involved in the catalytic steps. *Biochemistry* **25**: 2543-2551

FRANK H, NICHOLSON G, BAYER E (1977) Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase. *Journal of Chromatographic Science* **15**: 174-176

FRANK H, WOIWODE W, NICHOLSON G, BAYER E (1981) Determination of the Rate of Acidic Catalyzed Racemization of Protein Amino Acids. *Liebigs Annalen der Chemie* **3**: 354-365

FRANZKE C (1996) Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 3. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg

FRIEBERTSHÄUSER N, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2004) Untersuchungen zur Stereochemie von Aminosäuren in Amadoriverbindungen. *Lebensmittelchemie* **58**: 121-164

FRIEDMAN M (1999) Chemistry, Nutrition, and Microbiology of D-Amino Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3457-3479

FRIEDMAN M, LIARDON R (1985) Racemization Kinetics of Amino Acid Residues in Alkali-Treated Soybean Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**: 666-672

FROLOV A, HOFFMANN R (2008) Separation of Amadori peptides from their unmodified analogs by ion-pairing RP-HPLC with heptafluorobutyric acid as ion-pair reagent. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **392**: 1209-1214

FROLOV A, SINGER D, HOFFMANN R (2006a) Site-specific synthesis of Amadori-modified peptides on solid phase. *Journal of Peptide Science* **12**: 389-395

FROLOV A, HOFFMANN P, HOFFMANN R (2006b) Fragmentation behavior of glycated peptides derived from D-glucose, D-fructose and D-ribose in tandem mass spectrometry. *Journal* of *Mass Spectrometry* **41**: 1459-1469

GALLO KA, TANNER ME, KNOWLES JR (1993) Mechanism of the reaction catalyzed by glutamate racemase. *Biochemistry* **32**: 3991-3997

GANDOLFI I, PALLA G, DELPRATO L, DE NISCO F, MARCHELLI R, SALVADORI C (1992) D-Amino Acids in Milk as Related to Heat Treatments and Bacterial Activity. *Journal of Food Science* **57**: 377-379

GANDOLFI I, PALLA G, MARCHELLI R, DOSSENA A, PUELLI S, SALVADORI C (1994) D-Alanine in Fruit Juice: A Molekular Marker of Bacterial Activity, Heat Treatments and Shelf-Life. *Journal of Food Science* **59**: 152-154

GARLOFF H, LANGE H, VIANI R (1996) Kaffee. In: HEISS R (Editor) Lebensmitteltechnologie. Biotechnologie, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung. 5 Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

GE SJ, LEE TC (1996) Effective HPLC Method for the Determination of Aromatic Amadori Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**: 1053-1057

GOBETTI M, SIMONETTI MS, ROSSI J, COSSIGNANI L, CORSETTI A, DAMIANI P (1994) Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *Journal of Food Science* **59**: 881-884

GÖKMEN und PALAZOĞLU (2008) Acrylamide Formation in Foods during Thermal Processing with a Focus on Frying. *Food and Bioprocess Technology* **1**: 35-42

GUERRA-HERNANDEZ E, CORZO N (1996) Furosine determination in baby cereals by ion-pair reversed phase liquid chromatography. *Cereal Chemistry* **73**: 729-731

GUERRA-HERNANDEZ E, CORZO N, GARCÍA-VILLANOVA B (1999) Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *Journal of Cereal Science* **29**: 171-176

HASHIBA H (1978a) Isolation and Identification of Amadori Compounds from Miso, White Wine and Saké. *Agricultural and biological chemistry* **42**: 1727-1731

HASHIBA H (1978b) Isolation and Identification of Amadori Compounds from Soy Sauce. *Agricultural and biological chemistry* **42**: 763-768

HAO Z, LU C, XIAO B, WENG N, PARKER B, KNAPP M, HO C (2007) Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *Journal of Chromatography A* **1147**: 165-171

HAU J, DEVAUD S, BLANK I (2004) Detection of Amadori compounds by capillary electrophoresis coupled to tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **25**: 2077-2083

HEIMGARTNER H (1991) 3-Amino-2H-Azirines. Synthons for α,α-Disubstituted α-Amino Acids in Heterocycle and Peptide Synthesis [New Analytical Methods (43)]. *Angewandte Chemie International Edition English* **30**: 238-264

HEINZLER M, EICHNER K (1991a) Verhalten von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. 1. Bildung und Abbau von Amadori-Verbindungen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **192**: 24-29

HEINZLER M, EICHNER K (1991b) Verhalten von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. 2. Bildung von Aromastoffen unter Röstbedingungen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **192**: 445-450

HENLE T (2003) Ages in food: Do they play a role in uraemia?. *Kidney International* **63**: 145-147

HEYNS K, MÜLLER G, PAULSEN H (1967) Quantitative Untersuchungen der Reaktion von Hexosen mit Aminosäuren. *Liebigs Annalen der Chemie* **703**: 202-214

HOFMANN T, HEUBERGER S (1999) The contribution of coloured Maillard reaction products to the total colour of browned glucose/L-alanine solutions and studies on their formation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **208**: 17-26

HOFMANN T, SCHIEBERLE P (2000) Formation of Aroma-Active Strecker-Aldehydes by a Direct Oxidative Degradation of Amadori Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 4301-4305

"HONIGVERORDNUNG vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92), zuletzt geändert durch Artikel 9 der Verordnung vom 8. August 2007 (BGBl. I S. 1816)", Zuletzt geändert durch Art. 9 V v. 8.8.2007 I 1816

HOPKINS DW, O`DOWD RW, SHIEL RS (1997) Comparison of D- and L-amino acid metabolism in soils with differing microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 23-29

HUYGHUES-DESPOINTES A, YAYLAYAN VA (1994) A multidetector HPLC system for the analysis of Amadori and other Maillard reaction intermediates. *Food chemistry* **51**: 109-117

HURELL RF (1982) Maillard Reaction in Flavour. In: MORTON ID, MACLEOD AJ: Food Flavours. Volume 3, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York: 399-437

ILISZ I, BERKECZ R, PÉTER A (2009) Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1216**: 1845-1860

IMAI K, FUKUSHIRNA T, SANTA T, HOMMA H, HAMASE K, SAKAI K, KATO M (1996) Analytical Chemistry and Biochemistry of D-Amino Acids. *Biomedical Chromatography* **10**: 303-312

JAKAS A, KATIĆ A, BIONDA N, HORVAT S (2008) Glycation of a lysine-containing tetrapeptide by D-glucose and D-fructose-influence of different reaction conditions on the formation of Amadori/Heyns products. *Carbohydrate Research* **343**: 2475-2480

JANKOWSKI N, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2009) Racemisierungsverhalten von Alanin in der Maillard-Reaktion mit verschiedenen Kohlenhydraten. *Lebensmittelchemie* **63**: 18-19

JAWORSKI A, BRÜCKNER H (1999) Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **862**: 179-189

JING H, KITTS DD (2002) Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products. *Food and Chemical Toxicology* **40:** 1007-1015

JOHANSEN MB, KIEMER L, BRUNAK S (2006) Analysis and prediction of mammalian protein glycation. *Glycobiology **16***: 844-853

JOO K, PARK C, JEONG H, LEE SJ, CHANG IS (2008) Simultaneous determination of two Amadori compounds in Korean red ginseng (*Panax ginseng*) extracts and rat plasma by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography B* **865**: 159-166

JUNG G, BRÜCKNER H, BOSCH R, WINTER W, SCHAAL H, STRÄHLE J (1983) Ac-L-Ala-Aib-L-Ala-OMe: X-Ray Analysis of a Distorted β-Bend and Magnetic Nonequivalence of Aib-Methyl Groups. *Liebigs Annalen der Chemie* **1983**: 1096-1106

KATZ E, AYDIN M, LUCHT N, KÖNIG WA, OOKA T, JUNG G (1985) Sequence and Conformation of Suzukacillin A. *Liebigs Annalen der Chemie* **1985**: 1041-1062

KELLERMANN J (2006) Aminosäureanalyse. In: LOTTSPEICH F, ENGELS JW (Editors) Bioanalytik. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2009, München

KIM J, LEE Y (2008) Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction. *Food Chemistry* **108**: 582-592

KIM J, LEE Y (2009) Enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino-acid enantiomers and the formation of melanoidins as a result of the Maillard reaction. *Amino Acids* **36**: 465-474

KIRSCHBAUM J, JUSTUS J, ERBE T, BRÜCKNER H (2000) Racemisierung von Aminosäuren durch Vorstufen der Maillard-Reaktion. *Deutscher Lebensmittel-chemikertag Stuttgart-Hohenheim*

KLEINKAUF H (1980) Die Biosynthese von Antibiotica-Peptiden. *Chemie in unserer Zeit* **14**: 105-114

KLOTZ IM, RUSSO SF, HANLON S, STAKE MA (1964) Protonation of Amides in a Helix-Breaking Solvent. *Journal of the American Chemistry Society* **86**: 4774-4778

KÖHLER W, SCHACHTEL G, VOLESKE P (2007) Biostatistik - Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler, 4. aktualisierte und erweiterte Auflage, Springer Verlag, Berlin

KÖNIG WA, KROHN H, GREINER M, BRÜCKNER H, JUNG G (1980) Complementary Application of EI/CI Mass Spectrometry in Peptide Sequence Analysis. In: QUAYLE A, HEYDEN & SON (Editors) Advances in Mass Spectrometry. Volume 8, Heyden & Son Verlag, 1980, London: 1109-1115

KRAUSE C, KIRSCHBAUM J, JUNG G, BRÜCKNER H (2006) Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin A from the mold *Trichoderma viride. Journal of Peptide Science* **12**: 321-327

KRAUSE R, KNOLL K, HENLE T (2003) Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *European Food Research and Technology* **216**: 277-283

KRAUSE R, SCHLEGEL K, SCHWARZER E, HENLE T (2008) Formation of Peptide-Bound Heyns Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 2522-2527

KULLMAN JP, CHEN X, ARMSTRONG DW (1999) Evaluation of the Enantiomeric Composition of Amino Acids in Tobacco. *Chirality* **11**: 669-673

KWAK EJ, LIM SI (2004) The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. *Amino Acids* **27**: 85-90

LAMBERTS L, ROMBOUTS I, DELCOUR JA (2008) Study of nonenzymic browning in α-amino acid and γ-aminobutyric acid/sugar model systems. *Food Chemistry* **111**: 738-744

LAPOLLA A, TRALDI P, FEDELE D (2005) Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical Biochemistry* **38**: 103-115

LAROQUE D, INISAN C, BERGER C, VOULAND É, DUFOSSÉ L, GUÉRARD F (2008) Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry* **111**: 1032-1042

LEDL F (1988) Zuckerabbau beim Erhitzen von Lebensmitteln / Sugar degradation in heated foodstuffs. *Ernährung/Nutrition* **12**: 375-379

LEDL F, SCHLEICHER E (1990) Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angewandte Chemie* **102**: 597-626

LEE AT, CERAMI A (1990) Nonenzymatic Reaction of Reducing Sugars with DNA. In: FINOT PA, AESCHENBACHER HU, HURRELL RF, LIARDON R (Editors) The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology. Advances in Life Science. Birkenhäuser-Verlag, Basel, Boston, Berlin, 1990: 415-423

LIARDON R, HURRELL RF (1983) Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **31**: 432-437

LIARDON R, LEDERMANN S, OTT U (1981) Determination of D-Amino Acids by Deuterium Labelling and Selected Ion Monitoring. *Journal of Chromatography* **203**: 385-395

LIPP J (1990) Nachweis und Herkunft von Abscisinsäure und Prolin in Honig. *Apidologie* **21**: 249-259

LÖFFLER G, PETRIDES PE, HEINRICH PC (2007) Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

LOPÉZ MG, GRUENWEDEL DW (1991) Synthesis of aromatic Amadori compounds. *Carbohydrate Research* **212**: 37-45

LÜPKE M, BRÜCKNER H (1998) Gas chromatographic evaluation of amino acid epimerisation in the course of gelatin manufacturing and processing. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **206**: 323-328

MAN EH, BADA JL (1987) Dietary D-amino Acids. *Annual Review of Nutrition* **7**: 209-225

MANNEKENS E, CRISMA M, VAN CAUWENBERGHE S, TOURWE D (2003) Synthesis of 1-(*m*-Hydroxybenzyl)-Substituted 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic Acid Derivatives as Opioid Peptide Mimetics - Unexpected Amide

Bond Cleavages under Mild Conditions. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**: 3300-3307

MARCHELLI R, PALLA G, DOSSENA A, GALAVERNA G, CORRADINI R, CLEMENTI S (1997) D-Amino acids: molekular markers of aging and authenticity for Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheese. *Sci Tecn. Latt.-Casearia* **48**: 21-32

MARCHELLI R, GALAVERNA G, DOSSENA A, PALLA G, BOBBIO A, SANTAGUIDA S, GROZEVA K, CORRADINI R, SFORZA S (2007) D-amino acids in food. In: R. KONNO R, BRÜCKNER H, D'ANIELLO A, FISHER G, FUJII N, HOMMA H (Editors) D-amino acids - New frontiers in amino acid and peptide research. Nova Science Publishers, New York, USA: 299-315

MARCONE MF (2004) Composition and properties of Indonesian palm civet coffee (Kopi Luwak) and Ethiopian civet coffee. *Food Research International* **37**: 901-912

MARTINS SIFS, JONGEN WMF, VAN BOEKEL MAJS (2001) A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* **11**: 364-373

MARTINS SIFS, VAN BOEKEL MAJS (2005) A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chemistry* **90**: 257-269

MASLO R (2006) Maillard-Reaktionsprodukte in Lebensmitteln: Mögliche gesundheitliche Bedeutung. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* ***2***: 125-134

MAYER C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2006) Enantiomerisierung von Prolin in der Amadoriverbindung Fruktose-Prolin. *Lebensmittelchemie* **60**: 156-157

MAYR W, JUNG G (1980) Darstellung, Charakterisierung und Konformationsbestimmung eines Undekapeptidhydrazids der N-terminalen Alamethicin-Sequenz. *Liebigs Annalen der Chemie* **1980**: 1489-1506

MILLS FD, BAKER G, HODGE JE (1969) Amadori's as nonvolatile flavor precursors in processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **4**: 723-727

MIYAZAWA T, IBUSUKI D, YAMASHITA S, NAKAGAWA K (2008) Analysis of Amadori-glycated Phosphatidylethanolamine in the Plasma of Healthy Subjects and Diabetic Patients by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1126**: 291-294

MOLL N, GROSS B (1981) Isolation and purification of Amadori compounds by semi-preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **206**: 186-192

MOLL N, GROSS B, VINH T, MOLL M (1982) A fully automated High-Performance Liquid Chromatographic procedure for isolation and purification of amadori compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**: 782-786

MOLNÁR-PERL I, PINTER-SZAKÁCS M, WITTMANN R, REUTTER M, EICHNER K (1986) Optimum yield of pyridosine and furosine originating from Maillard reactions monitored by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography* **361**: 311-320

MONNIER VM, SELL DR, DAI Z, NEMET I, COLLARD F, ZHANG J (2008) The Role of the Amadori Product in the Complications of Diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1126**: 81-88

MORTIMER CE, MÜLLER U (2007) Chemie. 9. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

MOSSINE VV, GLINSKY GV, FEATHER MS (1994) The preparation and characterization of some Amadori compounds (1-amino-1-deoxy-D-fructose derivatives) derived from a series of alipathic ω-amino acids. *Carbohydrate Research* **262**: 257-270

MOTRAM DS, WEDZICHA BL, DODSON AT (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **419**: 448-449

MÜNCH G, THOME J, FOLEY P, SCHINZEL R, RIEDERER P (1997) Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* **23**: 134

NARANJO GB, MALEC LS, VIGO MS (1998) Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chemistry* **62**: 309-313

NEHRING UP (1991) D-Aminosäuren in Röstkaffee. *Dissertation*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig

NEHRING UP, MAIER HG (1992) Indirect determination of the degree of roast in coffee. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **195**: 39-42

NEUBERGER A (1948) Stereochemistry of amino acids. In: ANSON ML, EDSALL JT (Editors) Advances in Protein Chemistry. Volume 4, Academic Press, New York

OBERPARLEITER S, ZIEGLEDER G (1997) Amadori-Verbindungen als Aromavorstufen in Kakao. *Nahrung* **41**: 142-145

OBRECHT D, HEIMGARTNER H (1987) 3-(Dimethylamino)-2,2-dimethyl-2H-azirin als α-Aminoisobuttersäure(Aib)-Äquivalent: Cyclische Depsipeptide durch direkte Amid-Cyclisierung. *Helvetica Chimica Acta* **70**: 329-338

OLIVER CM, MELTON LD, STANLEY RA (2006) Glycation of caseinate by fructose and fructo-oligosaccharides during controlled heat treatment in the "dry" state. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 722-731

PALLA G, MARCHELLI R, DOSSENA A, CASNATI G (1989) Occurrence of D-amino acids in food. *Journal of Chromatography* **475**: 45-53

PAPPA-LOUISI A, NIKITAS P, AGRAFIOTOU P, PAPAGEORGIOU A (2007) Optimization of separation and detection of 6-aminoquinolyl derivatives of amino acids by using reversed-phase liquid chromatography with on line UV, fluorescence and electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta* **593**: 92-97

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2002) Chirale Analytik von Aminosäuren in Honigen und pflanzlichen Sirupen. *Lebensmittelchemie* **56**: 106-107

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2003) Detektion und Genese von D-Aminosäuren in Honigen und Pflanzensirupen. *Proceeding of the German Nutrition Society* **5**: 25

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2004) Mechanistische Aspekte und Konsequenzen der Bildung von D-Aminosäuren im Verlaufe der Maillardreaktion. *Lebensmittel-chemie* **58**: 100

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2005a) Mass Spectrometic Detection and Formation of D-Amino Acids in Processed Plant Saps, Syrups, and Fruit Juice Concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 9722-9729

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2005b) Studies on the racemization (epimerization) of amino acids and peptides in the course of the Maillard Reaction. In: FLEGEL M, FRIDKIN M, GILON C, SLANINOVÁ J (Editors) Peptides 2004, Proceedings of the 3rd International and 28th European Peptide Symposium, Kenes International, Geneva, Switzerland: 997-998

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2006a) Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as results of the Maillard reaction. *European Food Research and Technology* **223**: 347-354

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2006b) Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occuring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. *Amino Acids* **31**: 63-72

PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2009) Gas chromatographic determination of D-amino acids in food and beverages. In: KONNO R, BRÜCKNER H, D'ANIELLO A, FISHER GH, FUJII N, HOMMA H (Editors) D-Amino Acids: Practical Methods and Protocols. Volume 1, Nova Science Publishers, New York: 337-352 (ISBN 978-1-60471-376-9)

PÄTZOLD R, KIRSCHBAUM J, WINTER A, WELLER F, BAEK IG, BRÜCKNER H (2002) Chromatographische Bestimmung der Enantiomeren von Aminosäuren in Speisewürzen. *Lebensmittelchemie* **56**: 31-32

PÄTZOLD R, NIETO-RODRIGUEZ A, BRÜCKNER H (2003) Chiral Gas Chromatographic Analysis of Amino Acids in Fortified Wines. *Chromatographia Supplement* **57**: 207-212

PÄTZOLD R, FRIEBERTSHÄUSER N, BRÜCKNER H (2005) Amadori-Verbindungen sind wahrscheinliche Ausgangsmaterialien für Aminosäure-isomere in Lebensmitteln. *Proceedings of the German Nutrition Society* **7**: 84

PAWLOWSKA M, ARMSTRONG AW (1994) Evaluation of enantiomeric purity of selected amino acids in honey. *Chirality* **6**: 270-276

PORTERO-OTIN M, BELLMUNT MJ, REQUENA JR, PAMPLONA R (2003) Protein modification by advanced Maillard adducts can be modulated by dietary polyunsaturated fatty acids. *Biochemical Society* **31**: 1403-1405

PRESTON RL (1987) Occurrence of D-amino acids in higher organisms: a survey. *Physiological* **87B**: 55-62

RADA-MENDOZA M, OLANO A, VILLAMIEL M (2002) Furosine as indicator of Maillard reaction in jams and fruit-based infant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 4141-4145

RADA-MENDOZA M, GARCÍA-BAÑOS JL, VILLAMIEL M, OLANO A (2004) Study on nonenzymatic browning in cookies, crackers and breakfast cereals by maltulose and furosine determination. *Journal of Cereal Science* **39**: 167-173

RAHBAR S (2005) The Discovery of Glycated Hemoglobin: A Major Event in the Study of Nonenzymatic Chemistry in Biological Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1043**: 9-19

RAMÍREZ-JIMÉNEZ A, GARCÍA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNÁNDEZ E (2001) Effect of toasting time on browning of sliced bread. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 513-518

RAMONAITYTE DT, KERŠIENE M, ADAMS A, TEHRANI KA, DE KIMPE N (2009) The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system. *Food Research International* **42**: 331-336

REINAUER H, NIEDERAU CM (1984) Glykosylierte Hämoglobine - Bildung und Beseitigung der Aldiminform. *Journal of Laboratory Medicine* **8**: 68-73

REUTTER M, EICHNER K (1989) Trennung und Bestimmung von Amadori-Verbindungen mittels HPLC und Nachsäulenreaktion. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **188**: 28-35

REYNOLDS TM (1965) Chemistry of Nonenzymatic Browning II. In: CHINCHESTER CO, MRAK EM, STEWART GF (Editors) Avanced in Food Chemistry. Volume 14, Academic Press, New York & London: 167-283

RICHTER G (2003) Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York: 41-70

RIZZI GP (2003) Electrochemical Study of the Maillard Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 1728-1731

RIZZI GP (2007) On the Effect of Tetraborate Ions in the Generation of Colored Products in Thermally Processed Glycine-Carbohydrate Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 2016-2019

RÖPER H, RÖPER S, HEYNS K, MEYER B (1983) N.M.R. spectroscopy of N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-amino acids (“fructose-amino acids”) *Carbohydrate Research* **116**: 183-195

RUBIO-BARROSO S, SANTOS-DEIGADO MJ, MARTIN-OLIVAR C, POLO-DIEZ LM (2006) Indirect Chiral HPLC determination and Fluorimetric detection of D-amino acids in milk and oyster samples. *Journal of Dairy Science* **89**: 82-89

SANZ ML, DEL CASTILLO MD, CORZO N, OLANO A (2000) Presence of 2-furoylmethyl derivatives in hydrolysates of processed tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 468-471

SANZ M, CASTILLO M, CORZO N, OLANO A (2001) Formation of Amadori Compounds in Dehydrated Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 5228-5231

SATO T, SHIMOGAITO N, WU X, KIKUCHI S, YAMAGISHI S, TAKEUCHI M (2006) Toxic Advanced Glycation End Products (TAGE) Theory in Alzheimer's Disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*® **21**: 197-208

SCHALKWIJK CG, STEHOUWER CDA, VAN HINSBERGH VWM (2004) Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes / Metabolism Research and Reviews* **20**: 369-382

SCHELLENBERGER A (1989) Funktionsmechanismen von Cofaktoren. In: SCHELLENBERGER A (Editor) Enzymkatalyse. Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme. Springer Verlag, Berlin: 229-233

SCHLEICHER E (1991) Die Bedeutung der Maillard-Reaktion in der menschlichen Physiologie. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **30**: 18-28

SCHLICHTHERLE-CERNY H, AFFOLTER M, CERNY C (2003) Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis. *Analytical Chemistry* **75**: 2349-2354

SCHRÄDER I, EICHNER K (1996) Veränderungen von Inhaltsstoffen bei der Verarbeitung von Tomaten. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **202**: 474 - 480

SGARBIERI VC, AMAYA J, TANAKA M, CHICHESTER CO (1973) Nutritional Consequences of the Maillard Reaction. Amino Acid Availability from Fructose-leucine and Fructose-tryptophan in the Rat. *The Journal of Nutrition* **103**: 657-663

SHAPIRA R, WILKINSON KD, SHAPIRA G (1988) Neuric plaque amyloid in Alzheimer´s disease is highly racemized. *Journal of Neurochemistry* **50**: 69-74

SIMÓ C, BARBAS C, CIFUENTES A (2002) Sensitive Micellar Electrokinetic Chromatography-Laser-Induced Fluorescence Method to analyze chiral amino acids in orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 5288-5293

SIMÓ C, MARTIN-ALVAREZ PJ, BARBAS C, CIFUENTES A (2004) Application of stepwise discriminant analysis to classify commercialo orange juices using Chiral Micellar Electrokinetic Chromatography-Laser-Induced Fluorescence data of amino acids. *Electrophoresis* **25**: 2885-2891

SIMÓ C, RIZZI A, BARBAS C, CIFUENTES A (2005) Chiral Capillary Electrophoresis-Mass spectrometry of amino acids in foods. *Electrophoresis* **26**: 1432-1441

SIRI N, LACROIX M, GARRIGUES JC, POINSOT V, COUDERC F (2006) HPLC-fluorescence detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines labelled with naphthalene- 2,3- dicarboxyaldehyde. *Electrophoresis* **27:** 4446-4455

STADLER RH, BLANK I, VARGA N, ROBERT F, HAU J, GUY P, ROBERT MC, RIEDIKER S (2002) Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **419**: 449-450

STAEMPFLI AA, BLANK I, FUMEAUX R, FAY LB (1994) Study in the Decomposition of the Amadori Compound N-(1-Deoxy-D-fructose-1-yl)-glycine in Model Systems: Quantification by Fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* **23**: 642-646

STAHL E (1967) Dünnschichtchromatographie. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

STEFANOWICZ P, KAPCZYŃSKA K, KLUCZYK A, SZEWCZUK Z (2007) A new procedure for the synthesis of peptide-derived Amadori products on a solid support. *Tetrahedron Letters* **48**: 967-969

STEINBERG SM, MASTERS PM, BADA JL (1984) The racemization of free and peptide-bound serine and aspartic acid at 100°C as a function of pH: implications for *in vivo* racemization. *Bioorganical Chemistry* **12**: 349-355

STEINHÄUSER U, OESTREICH-JANZEN S, BALTES W (1999) Die Röstkaffee-Extraktion zur Herstellung von löslichem Kaffee im Modelversuch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **95** (7): 257-262

STITT AW (2005) The Maillard Reaction in Eye Diseases. *Annals of the New York Academy of Science* **1043**: 582-597

STREITWIESER A, HEATHCOCK CH (1986) Organische Chemie. 1. korrigierter Nachdruck, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

SUÁREZ G, RAJARAM R, ORONSKY AL, GAWINOWICZ MA (1989) Nonenzymatic Glycation of Bovine Serum Albumin by Fructose (Fructation). Comparison with the Maillard Reaction initiated by Glucose. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 3674-3679

SUJI G, SIVAKAMI S (2004) Glucose, glycation and aging. *Biogerontology* ***5***: 365-373

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2004) Nachweis von Dipeptiden in Würzsoßen mittels GC-SIM-MS. *Lebensmittelchemie* **58**: 107-108

THEIS C, DEGENKOLB T, BRÜCKNER H (2008) Studies on the Selective Trifluoroacetolytic Scission of Native Peptaibols and Model Pepttides Using HPLC and ESI-CID-MS. *Chemistry and Biodiversity* **5**: 2337-2355

THIS H (2002) Molekulare Gastronomie. *Angewandte Chemie* **114**: 87-92

TONIOLO C, BRÜCKNER H (2009) Peptaibiotics - Fungal Peptides containing α-Dialkyl α-Amino Acids. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurüch und VCH-Wiley, Weinheim, Germany

TONIOLO C, CRISMA M, FORMAGGIO F, PEGGION C (2001) Control of peptide conformation by the Thorpe-Ingold effect (C$_\alpha$-tetrasubstitution). *Biopolymers* **60**: 396-414

VAN BOEKEL MAM (1991) The role of glycation in aging and diabetes mellitus. *Molecular Biology Reports* **15**: 57-64

VAN BOEKEL MAJS (1998) Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* **62**: 403-414

VAN BOEKEL MAJS (2001) Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung/Food* **45**: 150-159

VETTER W, SCHURIG V (1997) Enantioselective determination of chiral organochlorine compounds in biota by gas chromatography on modified cyclodextrins. *Journal of Chromatography A* **774**: 143-175

VOLLHARDT KPC, SCHORE NE (2000) Organische Chemie. 3. Auflage, Wiley-VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, Basel, Cambridge, New York

VOSS K, GALENSA R (2000) Determination of L- and D-amino acids in foodstuffs by coupling of high-performance liquid chromatography with enzyme reactors. *Amino Acids* **18**: 339-352

WALTON DJ, McPHERSON JD (1987) Analysis of Glycates Amino Acids by High-Performance Liquid Chromatography of Phenylthiocarbamyl Derivates. *Analytical Biochemistry* **164**: 547-553

WALTON DJ, McPHERSON JD, HVIDT T, SZAREK WA (1987) Synthetic routes to N-(1-deoxy-d-fructos-1-yl)amino acids by way of reductive amination of hexos-2-uloses. *Carbohydrate Research* **167**: 123-130

WAN H, BLOMBERG LG (2000) Chiral separation of amino acids and peptides by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **875**: 43-88

WANG J, LU Y, LIU B, HE H (2008) Electrospray positive ionization tandem mass spectrometry of Amadori compounds. *Journal of Mass Spectrometry* **43**: 262-264

WATERVAL JCM, LINGEMAN H, BULT A, UNDERBERG WJM (2000) Derivatization trends in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**: 4029-4045

WAUTIER JL, GUILLAUSSEAU PJ (2001) Advanced Glycation End Products, Their Receptors And Diabetic Angiopathy. *Diabetes* & *Metabolism* **27**: 535-542

WESTPHAL G, KROH L, FÖLLMER U (1988a) Untersuchungen zur Maillard-Reaktion. 16. Mitteilung Zur Reaktivität von Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit vom Reaktionsmilieu. *Die Nahrung* **32**: 117-120

WESTPHAL G, ÖRSI F, KROH L (1988b) Untersuchungen zur Maillard-Reaktion.15. Mitteilung. Derivatographische Untersuchungen an Systemen D-Glucose/Glycin, Alanin, Phenylalanin und den entsprechenden Amadori-Produkten. *Die Nahrung* **32**: 109-116

WETTENGEL R, PÖRSCHMANN J, HERZSCHUH R, MEHLHORN G, KLICHE R, LIEBETRAU L (1987) Beiträge zur gaschromatographischen Bestimmung von D-Aminosäuren in Einzellerproteinen (SCP). *Die Nahrung* **31**: 39-46

WIENAND W (2002) Ein künstlicher Rezeptor für das Dipeptid D-Alanin-D-Alanin: Konzeption, Synthese und physikalisch-organische Charakterisierung. *Inaugural-Dissertation,* Universität Köln

WIPF P, HEIMGARTNER H (1987) Selektive Amidspaltung bei Peptiden mit α,α-disubstituierten α-Aminosäuren. *Helvetica Chimica Acta* **70**: 354-368

WITTMANN R, EICHNER K (1989) Nachweis von Maillard-Produkten in Malzen, Bieren und Braucouleuren. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **188**: 212-220

YAMAGISHI S, NAKAMURA K, IMAIZUMI T (2005) Advanced Glycation End Products (AGEs) and Diabetic Vascular Complications. *Current Diabetes Reviews* **1**: 93-105

YAYLAYAN VA (2003) Recent Advances in the Chemistry of Strecker Degradation and Amadori Rearrangement: Implications to Aroma and Color Formation. *Food Science and Technology Research* **9**: 1-6

YAYLAYAN VA, HUYGHUES-DESPOINTES A (1994) Chemistry of Amadori Rearrangement Products: Analysis, Synthesis, Kinetics, Reactions and Spectroscopic Properties. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **34**: 321-369

YAYLAYAN VA, ISMAIL AA, MANDEVILLE S (1993) Quantitative determination of the effect of pH and temperature on the keto form of D-fructose by FT IR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **248**: 355-360

YAYLAYAN VA, ISMAIL AA, HUYGHUES-DESPOINTES A (1994) Investigation of the Acyclic Forms of Reducing Sugars and Amadori Products by FTIR Spectroscopy. In: LABUZA TP, REINECCIUS GA, MONNIER V, O'BRIAN J, BAYNES J (Editors) Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 69-74

ZAGON J, DEHNE LI, BÖGL KW (1994) D-Amino Acids in Organism and Food. *Nutrition Research* **14**: 445-463

ZEECK A, EICK S, KRONE B, SCHRÖDER K (2005) Chemie für Mediziner. 6. Auflage, Urban und Fischer Verlag München

6 Anhang

Tab. A-1 D-AS in unbehandelten und verarbeiteten Lebensmitteln (Basen-, Säure- und/oder Hitzeeinwirkung)

Lebensmittel	Quelle
Backwaren: Brot, Kräcker, Laugengebäck, Teig, Tortillas, Weizenmehl	MAN und BADA 1987; GOBETTI et al. 1994; FRIEDMAN 1999
Eier	FRIEDMAN 1999
Fleisch- und Fischprodukte: Hackfleisch (roh), Hamburger, Huhn (roh), Hühnersuppe, Rindfleisch (roh), Rindfleischsuppe, Schinken, Schinkenspeck	LIARDON und HURREL 1983; MAN und BADA 1987; PRESTON 1987; PALLA et al. 1989; FRIEDMAN 1999
Früchte und Gemüse: Ananas, Apfel, Grapefruit, Karotte, Knoblauch, Kohl, Mango, Orange, Oliven, Papaya, Tomate, Traube, Wassermelone, Zitrone	FRIEDMAN 1999; BRÜCKNER und WESTHAUSER 2003; CASADO et al. 2007
Gelatine	LÜPKE und BRÜCKNER 1998
Gewürze: Geschmacksverstärker, Pfeffer, Senf	FRIEDMAN 1999
Honige und Sirupe: Agavendicksaft, Ahornsirup, Apfelsaftkonzentrat, eingedickter Palmensaft, Granatapfelsirup, Pekmez, verschiedene Honige,	FRIEDMAN 1999; VOSS und GALENSA 2000; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2002; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2003; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2005a
Kakao, Kaffee und Tee	BRÜCKNER und HAUSCH 1989a; PALLA et al. 1989; ZAGON et al. 1994; FRIEDMAN 1999 KULLMAN et al. 1999; CASAL et al. 2003; CASAL et al. 2005; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2006b; CALIGIANI 2007; PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009
Milch	PALLA et al. 1989; GANDOLFI et al. 1992; FRIEDMAN 1999; MARCHELLI et al. 2007
Säfte: Aprikose, Birne, Brombeere, Erdbeere, Johannisbeere, Karotte, Kirsche, Nekatarine, Orange, Pfirsich, Preiselbeere, Rote Beete Stachelbeere, Tomate (Paste, Püree, Ketchup)	BRÜCKNER und WESTHAUSER 1994; GANDOLFI et al. 1994; ZAGON et al. 1994; FRIEDMAN 1999; SIMÓ et al. 2002; SIMÓ et al. 2004; SIMÓ et al. 2005
Trockenfrüchte	PÄTZOLD und BRÜCKNER 2009

Tab. A-2 D-AS in fermentierten Lebensmitteln

Lebensmittel	Quelle
Alkoholische Getränke: Bier, Saké, Sherry, Wein, Weizenbier	ZAGON et al. 1994; BAEK 1999; CALABRESE und STANCHER 1999; FRIEDMAN 1999; ERBE und BRÜCKNER 2000a; VOSS und GALENSA 2000; PÄTZOLD et al. 2003; ALI et al. 2010
Essig	BRÜCKNER und HAUSCH 1989a; ERBE und BRÜCKNER 1998; FRIEDMAN 1999; ERBE und BRÜCKNER 2000b; CARLAVILLA et al. 2006
Gemüse: Kohl (sauer eingelegt), Sojabohnen, Sauerkraut, Schwarze Bohnen	BRÜCKNER und HAUSCH 1989b; ZAGON et al. 1994; FRIEDMAN 1999
Milchprodukte: Buttermilch, Joghurt, Käse, Kefir, Yakult	MAN und BADA 1987; BRÜCKNER und HAUSCH 1989a, 1989b; BRÜCKNER und HAUSCH 1990a, 1990b; PALLA et al. 1989; BRÜCKNER et al. 1992; ZAGON et al. 1994; MARCHELLI et al. 1997; FRIEDMAN 1999; MARCHELLI et al. 2007
Soßen und Speisewürze: Fischsoßen, Pepperonipasten, Sojasoßen	BRÜCKNER und HAUSCH 1989a; ABE et al. 1999; BAEK 1999; FRIEDMAN 1999; PÄTZOLD et al. 2002
Tabak und Tabakerzeugnisse	ALI et al. 2006; KULLMANN 1999

Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Verhältnis (v/v/v)	Trennung von Ala & Fru-Ala	Trennung von Pro & Fru-Pro	Trennung von Phe & Fru-Phe
1-Butanol/Aceton/bidestilliertes H_2O				
	2/7/2	-	---	++
	3/6/3	-	---	-
	4/4/3	-	---	-
	2/6/4	-	---	-
	40/10/10	-	---	-
	6/1/0	--	---	--
	5/1/1	--	---	--
1-Butanol/Aceton/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	3/3/7/2	+	---	+
	3/3/5/4	+	---	+
	3/3/4/5	+	---	+
	35/35/7/23	+	---	+
1-Butanol/Ameisensäure/bidestilliertes H_2O				
	75/15/10	+++	---	+++
1-Butanol/Dichlormethan/bidestilliertes H_2O				
	2/7/2	--	--	--
1-Butanol/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	80/20/20	-	+++	+++
	40/10/10	-	-	-
	40/5/15	-	-	-
	30/5/20	-	-	-
	40/5/10	-	-	-
	30/5/25	-	-	-
	40/5/20	-	++	-

--- keine Aussage möglich -- läuft nicht - keine Trennung

+ Antrennung ++ Trennung +++ gute Trennung

Fortsetzung Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Verhältnis (v/v/v)	Trennung von Ala & Fru-Ala	Trennung von Pro & Fru-Pro	Trennung von Phe & Fru-Phe
1-Butanol/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	40/5/30	-	-	-
	40/20/10	-	-	-
	50/5/30	-	-	-
	50/10/40	++	-	++
1-Butanol/Methanol/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	40/20/10/10	+	---	+
	20/40/20/20	-	---	-
	10/40/5/5	-	---	-
	40/20/20/20	+	---	+
	40/10/5/5	++	---	++
	40/10/20/10	++	---	++
	40/20/10/20	-	---	-
	40/30/10/10	-	---	-
	30/30/10/10	-	---	-
	40/20/20/10	++	---	+++
	40/15/20/10	++	---	+++
1-Butanol/Methanol/25%ige NH_3-Lösung/bidestilliertes H_2O				
	8/7/2/3	++	---	++
1-Propanol				
	100	--	---	--
1-Propanol/Aceton/bidestilliertes H_2O				
	2/7/2	-	---	++
1-Propanol/bidestilliertes H_2O				
	70/30	-	--	+

--- keine Aussage möglich -- läuft nicht - keine Trennung

+ Antrennung ++ Trennung +++ gute Trennung

Fortsetzung Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Verhältnis (v/v/v)	Trennung von Ala & Fru-Ala	Trennung von Pro & Fru-Pro	Trennung von Phe & Fru-Phe
1-Propanol/bidestilliertes H_2O/25%ige NH_3-Lösung				
	70/30/10	+	---	+
	70/50/20	+	---	+
1-Propanol/Methanol/bidestilliertes H_2O				
	80/20/20	-	---	+
1-Propanol/8,8%ige NH_3-Lösung				
	80/20	++	---	---
	70/30	++	---	---
	85/15	-	---	---
1-Propanol/25%NH_3-Lösung				
	60/40	-	---	---
Aceton				
	100	--	---	---
Aceton/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	40/10/10	-	---	-
Aceton/Ethanol/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	50/32/10/8	+	---	---
Aceton/Methanol				
	50/50	---	---	---
Chloroform/Ethanol/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	50/32/10/8	-	+++	+++
	50/28/8/14	-	+++	+++
	30/28/18/14	-	+++	+++
	25/28/20/17	-	+++	+++
Chloroform/Methanol/17%ige NH_3-Lösung				
	40/40/20	-	+	+

--- keine Aussage möglich -- läuft nicht - keine Trennung

+ Antrennung ++ Trennung +++ gute Trennung

Fortsetzung Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Verhältnis (v/v/v)	Trennung von Ala & Fru-Ala	Trennung von Pro & Fru-Pro	Trennung von Phe & Fru-Phe
Dichlormethan (Methylenchlorid)				
	100	--	---	--
Essigsäureethylester				
	100	--	--	--
Essigsäureethylester/Aceton/bidestilliertes H_2O				
	40/50/10	-	---	-
Essigsäureethylester/Ameisensäure/bidestilliertes H_2O				
	60/20/20	++	---	++
Essigsäureethylester/bidestilliertes H_2O				
	50/50	-	-	-
	90/10	-	-	-
	80/20	-	-	-
	60/40	-	+	+
Essigsäureethylester/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	40/10/10	---	---	+++
	40/10/20	---	---	---
	60/10/20	---	---	---
96%iger Ethanol/bidestilliertes H_2O				
	70/30	+	---	---
Ethanol/Eisessig/bidestilliertes H_2O				
	60/10/30	+	---	+
96%iger Ethanol/25%ige NH_3-Lösung				
	60/40	++	---	---
	55/45	++	---	---
	70/30	++	---	---

--- keine Aussage möglich -- läuft nicht - keine Trennung

+ Antrennung ++ Trennung +++ gute Trennung

Fortsetzung Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Verhältnis (v/v/v)	Trennung von Ala & Fru-Ala	Trennung von Pro & Fru-Pro	Trennung von Phe & Fru-Phe
Isopropanol				
	100	--	--	--
Methanol				
	100	--	+++	+++
Methanol/1-Butanol/bidestilliertes H_2O				
	7/2/2	-	---	-
	5/2/2	-	---	-
	7/2/1	-	---	-
Methanol/1-Butanol/bidestilliertes H_2O				
	2/3/1	-	---	-
Methanol/1-Propanol/bidestilliertes H_2O				
	40/30/30	-	---	-
	25/25/50	-	---	-
Methanol/Aceton/bidestilliertes H_2O				
	20/70/10	-	+	+
	70/25/5	-	++	+
	35/60/5	-	++	+
	40/35/25	-	+++	-
	50/40/10	-	+++	-
	17/12/1	-	-	++
	10/10/2	-	+++	++
	12/10/1	-	++	++
	80/18/2	-	-	-
	70/20/10	-	-	-
	60/30/10	-	-	-
	40/45/5	-	-	-
	30/60/10	-	-	+

--- keine Aussage möglich -- läuft nicht - keine Trennung

+ Antrennung ++ Trennung +++ gute Trennung

Fortsetzung Tab. A-3 Übersicht der Trennergebnisse der getesteten Laufmittel bei der Dünnschichtchromatographie

Laufmittel	Verhältnis (v/v/v)	Trennung von Ala & Fru-Ala	Trennung von Pro & Fru-Pro	Trennung von Phe & Fru-Phe
Methanol/Aceton/bidestilliertes H_2O				
	20/70/10	-	-	-
	10/80/65	-	-	-
	20/65/15	-	-	+
Methanol/bidestilliertes H_2O				
	50/50	-	++	++

--- keine Aussage möglich -- läuft nicht - keine Trennung

+ Antrennung ++ Trennung +++ gute Trennung

Tab. A-4 Responsefaktoren (TFAA und 1-Propanol; Trennung auf Chirasil®-L-Val) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (f_R) und relative Standardabweichung (STABW) der proteinogenen AS

AS	A	B	C	D	E	f_R	STABW in [%]
L-Ala	0,76	0,67	0,80	0,71	0,67	**0,72**	**8,32**
L-Val	0,37	0,31	0,39	0,36	0,31	**0,35**	**10,80**
L-Thr	1,42	1,29	1,49	1,44	1,36	**1,40**	**5,44**
Gly	1,42	1,31	1,48	1,43	1,35	**1,40**	**4,87**
L-Ile	0,25	0,21	0,27	0,25	0,23	**0,24**	**9,67**
L-Pro	1,00	1,02	1,01	1,03	1,02	**1,02**	**1,31**
L-Ser	0,94	0,76	0,93	1,03	0,82	**0,90**	**11,82**
L-Leu	1,01	1,00	1,03	1,00	1,01	**1,01**	**1,41**
L-Nle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**1,00**	**0,00**
Gaba	0,99	1,01	0,95	1,03	1,01	**1,00**	**3,07**
L-Asx	1,68	1,60	1,58	1,69	1,53	**1,62**	**4,22**
L-Met	0,73	0,71	0,70	0,74	0,68	**0,71**	**3,72**
L-Phe	2,47	2,34	2,30	2,49	2,19	**2,36**	**5,27**
L-Glx	1,24	1,31	1,24	1,23	1,15	**1,24**	**4,66**
L-Tyr	0,65	0,65	0,63	0,72	0,51	**0,63**	**12,31**
L-Orn	0,98	1,07	0,97	1,12	0,78	**0,98**	**13,26**
L-Lys	1,18	1,28	1,16	1,36	0,83	**1,16**	**17,36**

Tab. A-5 Responsefaktoren (TFAA und 2-Propanol; Trennung auf Chirasil®-L-Val) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (f_R) und relative Standardabweichung (STABW) der proteinogenen AS

AS	A	B	C	D	E	f_R	STABW in [%]
L-Ala	1,22	1,21	1,05	1,10	1,01	**1,12**	**8,46**
L-Val	0,41	0,39	0,35	0,33	0,34	**0,36**	**9,87**
L-Thr	1,01	1,02	0,89	0,95	0,93	**0,96**	**5,74**
Gly	0,79	0,84	0,66	0,74	0,68	**0,74**	**10,21**
L-Ile	0,27	0,20	0,24	0,24	0,24	**0,24**	**10,10**
L-Pro	0,95	0,94	1,00	0,81	0,92	**0,92**	**7,76**
L-Ser	0,77	0,76	0,79	0,71	0,68	**0,74**	**6,40**
L-Leu	0,81	0,77	0,67	0,84	0,83	**0,80**	**4,54**
L-Nle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**1,00**	**0,00**
Gaba	0,57	0,54	0,57	0,52	0,58	**0,55**	**4,18**
L-Asx	0,60	0,63	0,59	0,60	0,58	**0,60**	**3,33**
L-Met	0,18	0,37	0,35	0,31	0,31	**0,33**	**7,96**
L-Phe	1,43	1,48	1,48	1,39	1,38	**1,43**	**3,15**
L-Glx	0,76	0,84	0,77	0,84	0,77	**0,80**	**5,25**
L-Tyr	0,19	0,17	0,22	0,19	0,31	**0,19**	**12,58**
L-Orn	0,99	1,09	1,01	0,99	0,94	**1,01**	**5,47**
L-Lys	0,81	0,88	0,84	0,80	0,79	**0,82**	**4,11**

Tab. A-6 **Responsefaktoren (TFAA und Methanol; Trennung auf FS-LIPODEX® E) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (f_R) und relative Standardabweichung (STABW) der proteinogenen AS**

AS	A	B	C	D	E	f_R	STABW in [%]
L-Ala	1,09	1,05	1,11	1,11	1,10	**1,09**	**2,39**
L-Val	0,84	0,80	0,83	0,82	0,83	**0,82**	**1,98**
L-Ile	0,67	0,66	0,68	0,68	0,68	**0,67**	**1,09**
L-Leu	0,93	0,92	0,92	0,93	0,94	**0,93**	**1,02**
Gly	1,65	1,59	1,73	1,74	1,72	**1,68**	**3,79**
L-Nle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**1,00**	**0,00**
L-Thr	0,41	0,46	0,44	0,43	0,47	**0,44**	**5,84**
L-Ser	0,09	0,13	0,11	0,10	0,13	**0,11**	**14,31**
L-Pro	0,86	0,86	0,86	0,83	0,85	**0,85**	**1,30**
L-Asp	1,10	1,12	1,12	1,06	1,10	**1,10**	**2,41**
GABA	0,90	0,91	0,90	0,89	0,87	**0,90**	**1,78**
L-Met	0,37	0,33	0,31	0,30	0,31	**0,32**	**8,54**
L-Glu	1,32	1,37	1,27	1,25	1,26	**1,29**	**3,78**
L-Phe	6,35	6,58	6,14	6,07	6,27	**6,28**	**3,19**
L-Orn	1,31	1,35	1,18	1,18	1,28	**1,26**	**6,27**
L-Lys	1,47	1,58	1,38	1,35	1,51	**1,46**	**6,51**

Tab. A-7 **Responsefaktoren (TFAA und 2-Propanol; Trennung auf Chirasil®-L-Val) der Einzelläufe (A – E), gemittelte Responsefaktoren (f_R) und relative Standardabweichung (STABW) der nichtproteinogenen AS**

AS	A	B	C	D	E	f_R	STABW in [%]
L-Abu	0,58	0,51	0,52	0,59	0,53	**0,55**	**6,67**
L-Nva	0,64	0,65	0,64	0,68	0,65	**0,36**	**2,71**
L-Nle	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	**1,00**	**0,00**
L-Phg	0,80	0,80	0,80	0,75	0,79	**0,79**	**2,92**

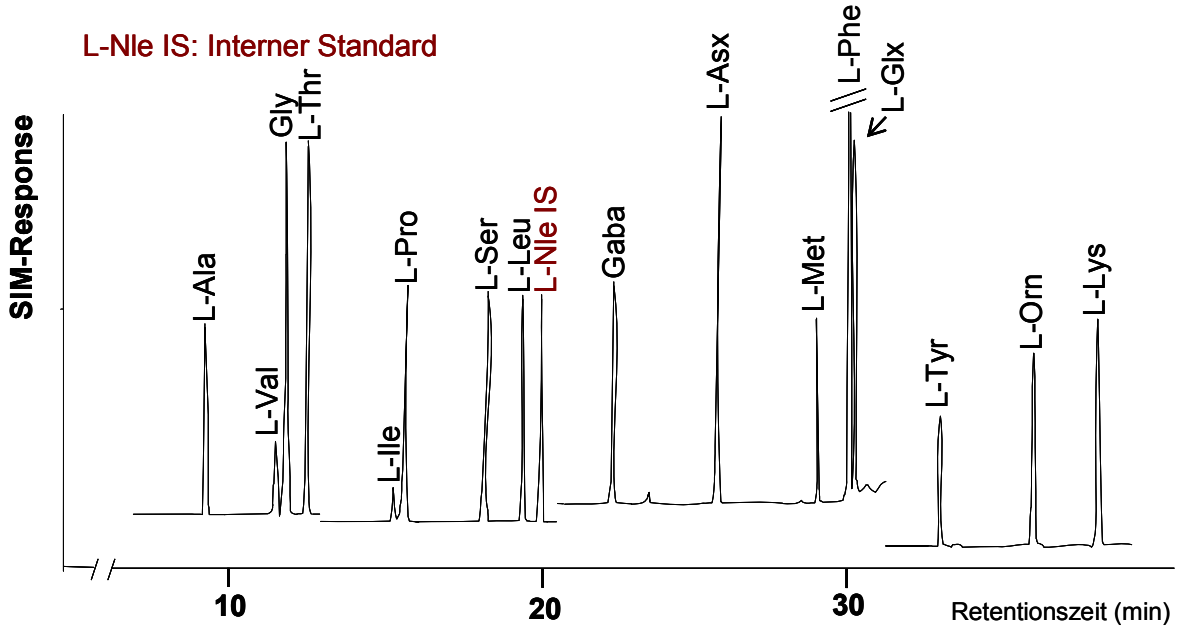


Abb. A-1 **GC-SIM-MS eines äquimolaren L-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.1) derivatisiert mit TFAA und 1-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

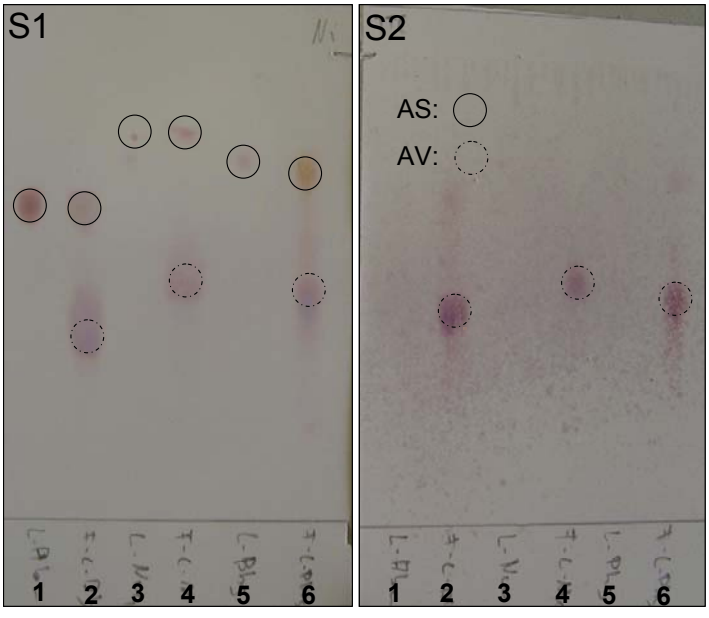


Abb. A-2 **Dünnschichtchromatographie der nichtproteinogenen AS Abu, Nva und Phg und aus diesen synthetisierten Amadori-Verbindungen; AS: Aminosäuren; AV: Amadori-Verbindungen; S1: Ninhydrin, S2: TZB; 1: L-Abu; 2: Fru-L-Abu; 3: L-Nva; 4: Fru-L-Nva; 5: L-Phg; 6: Fru-L-Phg; Bedingungen siehe Kapitel 2.6.2.1**

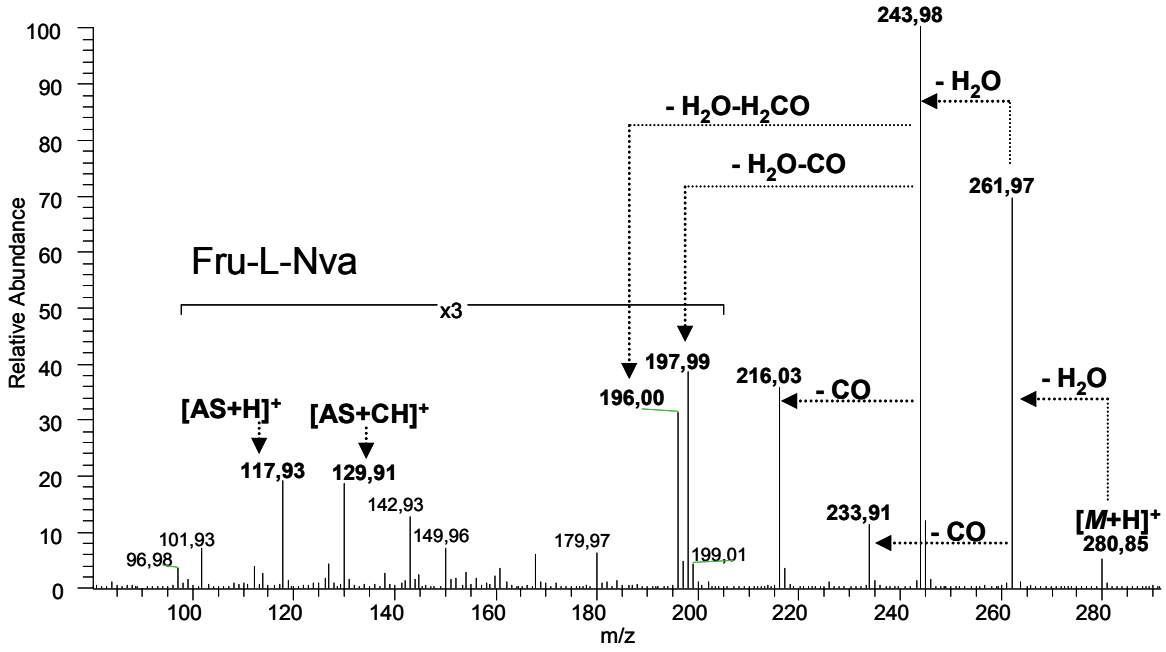


Abb- A-3 **HPLC-ESI-MS-CID Massenspektrum der synthetisierten Verbindung Fru-L-Nva mit protonierter Molekülmasse *m/z* 280,85 und den mittels CID-MS induzierten, charakteristischen Fragmenten bei 20 % relativer „Collision-Energy“; Bedingungen siehe Kapitel 2.7.2; M: Molekülion, AS: Aminosäure**

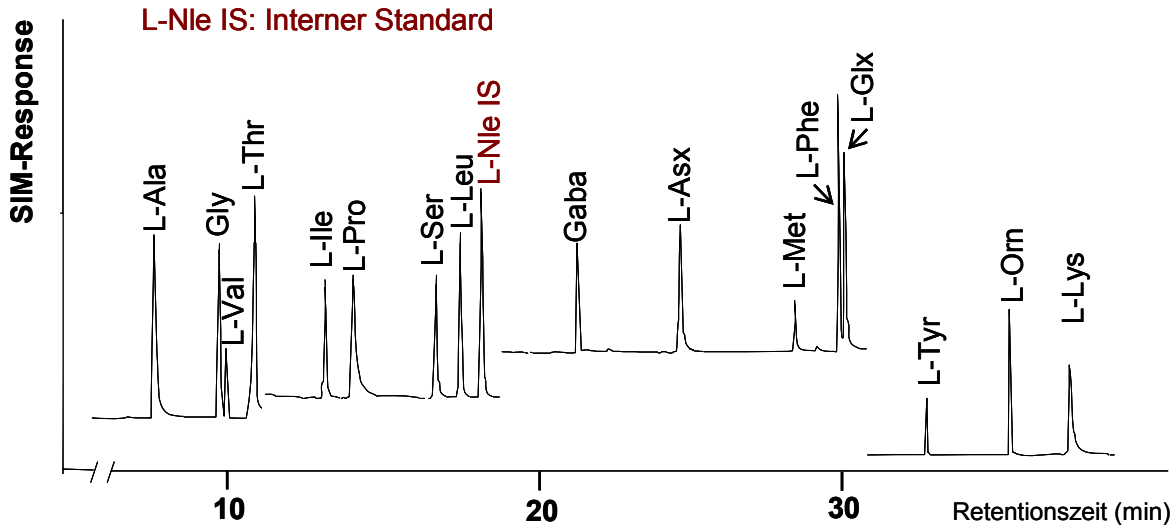


Abb. A-4 **GC-SIM-MS eines äquimolaren L-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.1) derivatisiert mit TFAA und 2-Propanol (Trennung auf Chirasil®-L-Val); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6**

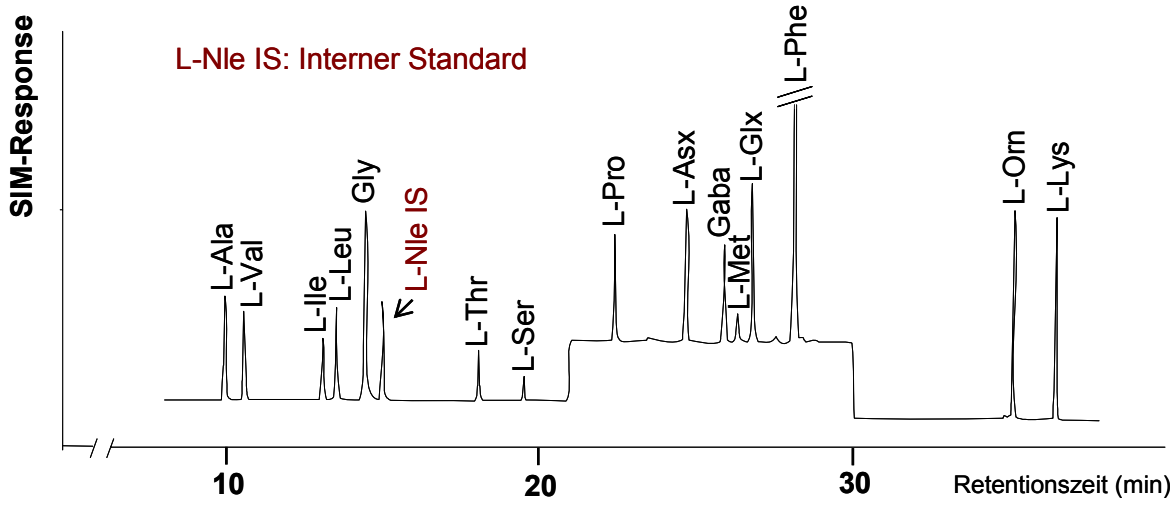


Abb. A-5 **GC-SIM-MS eines äquimolaren L-Standards (vgl. Kapitel 2.5.3.1) derivatisiert mit TFAA und Methanol (Trennung auf FS-LIPODEX® E); Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.7**

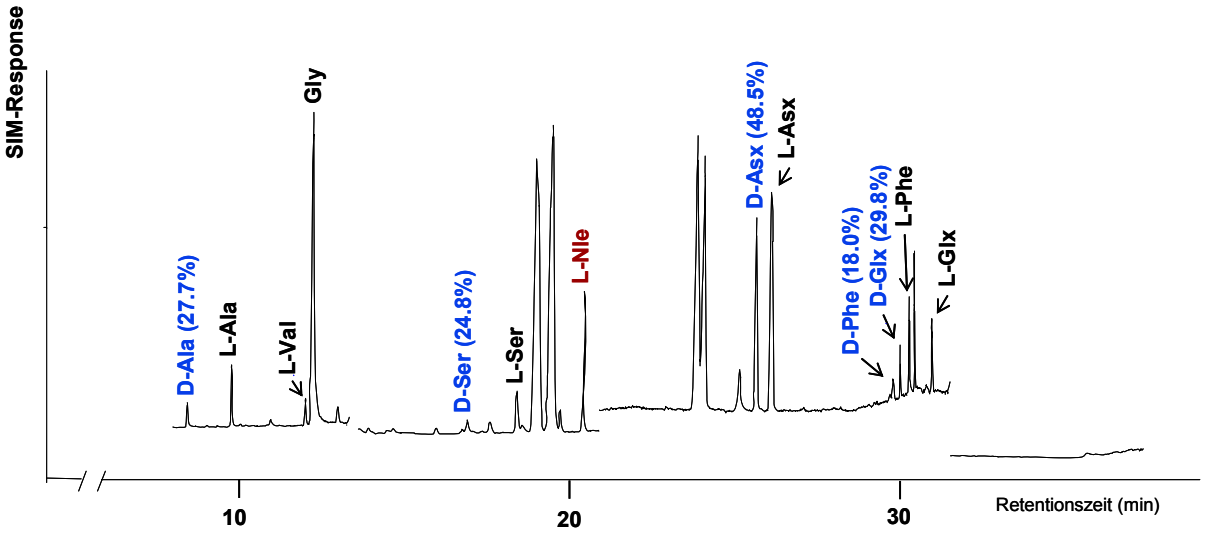


Abb. A-6 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 1 (*Nescafé Gold)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

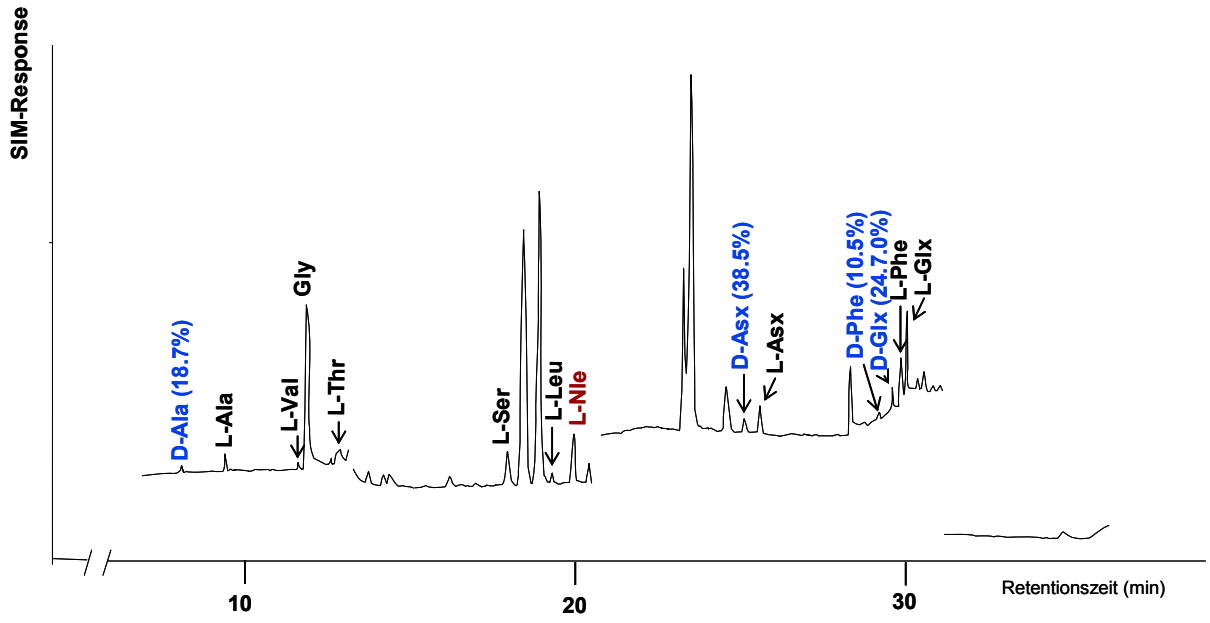


Abb. A-7 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 2 (*Mocca Fix Gold)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

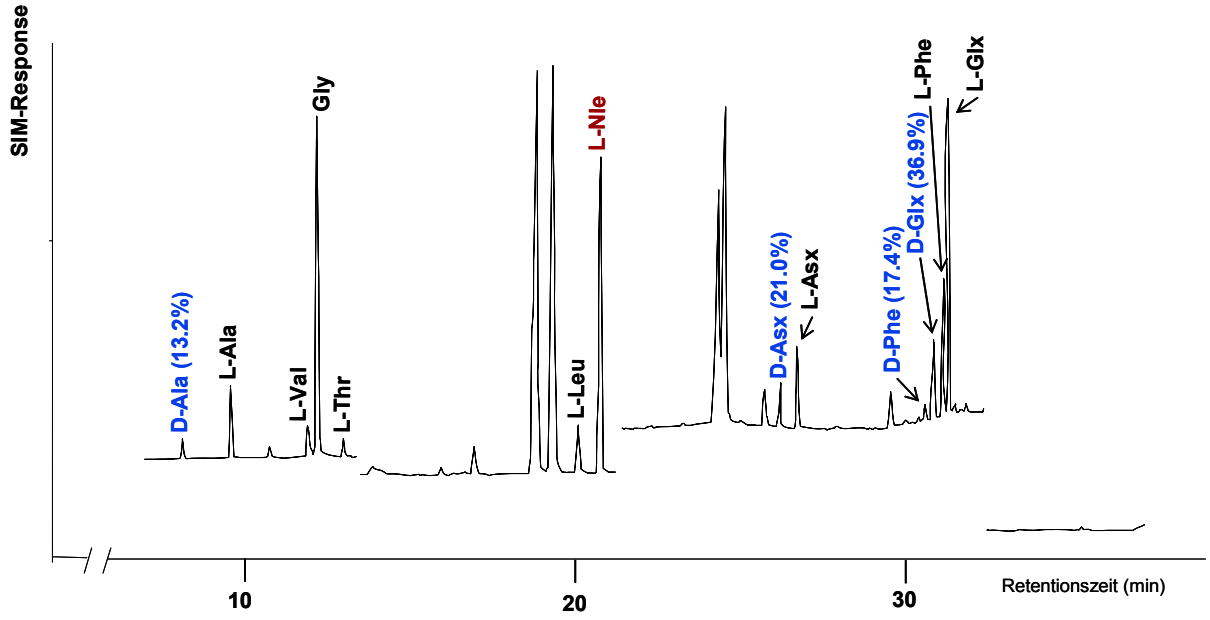


Abb. A-8 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 3 (*Rondo Melange)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

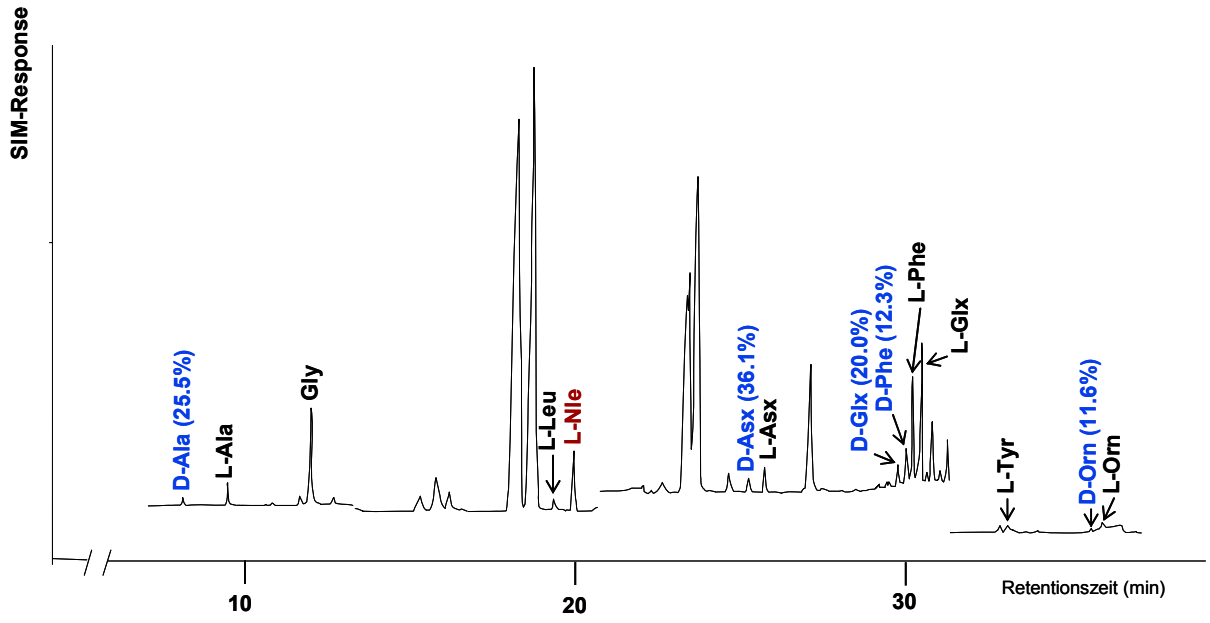


Abb. A-9 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 4 (*Nescafé Classic)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

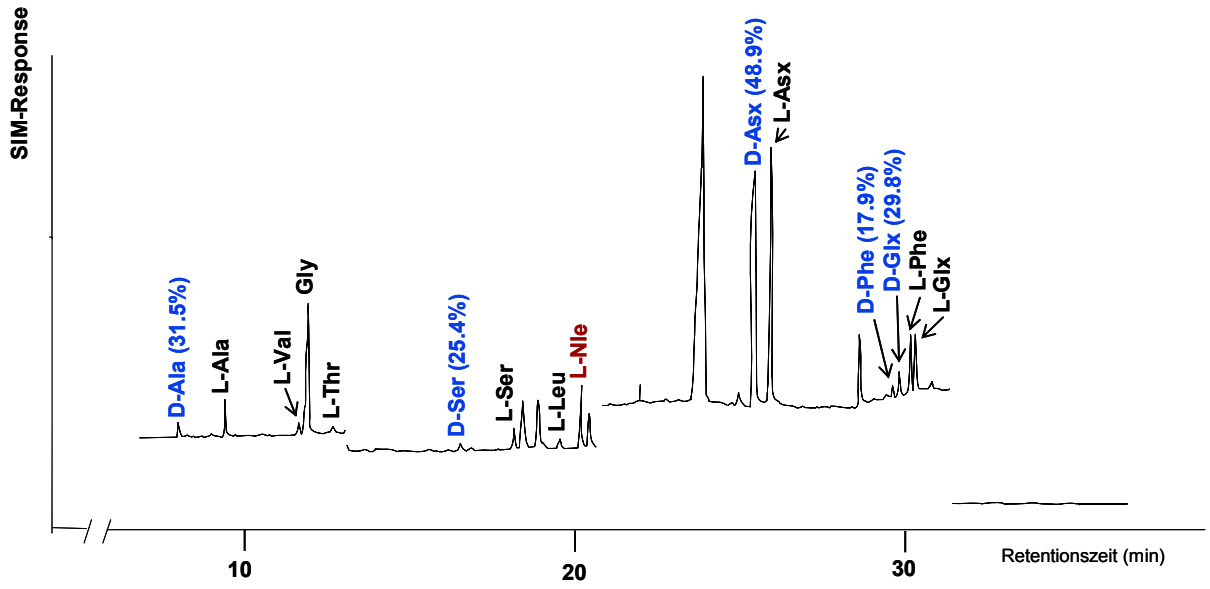


Abb. A-10 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 5 (*Granarom Finest Quality Caffee)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

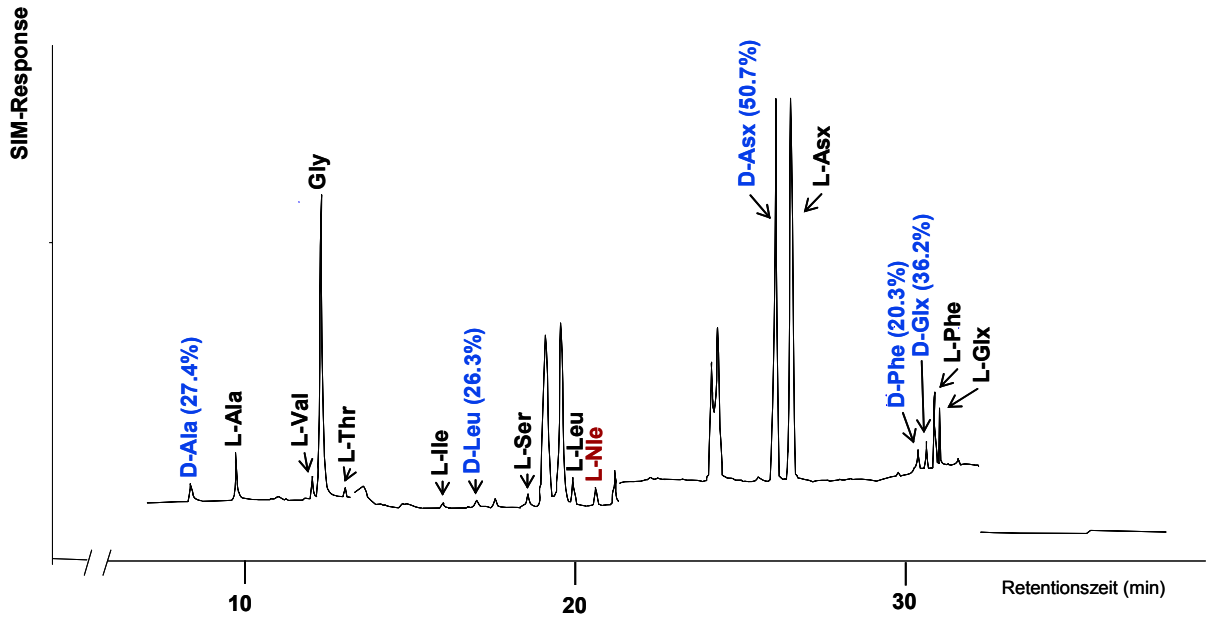


Abb. A-11 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Kaffeeprobe Nr. 6 (*Café Gold Bellarom)*; TFAA/1-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.5**

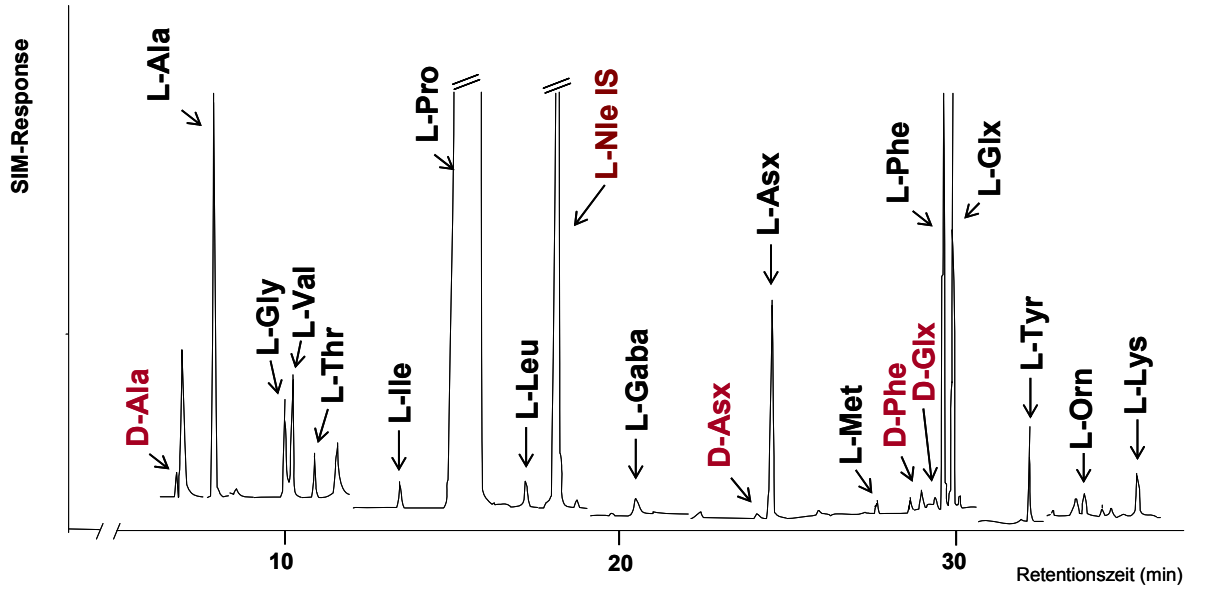


Abb. A-12 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH1 (*Kastanien Honig*); TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6**

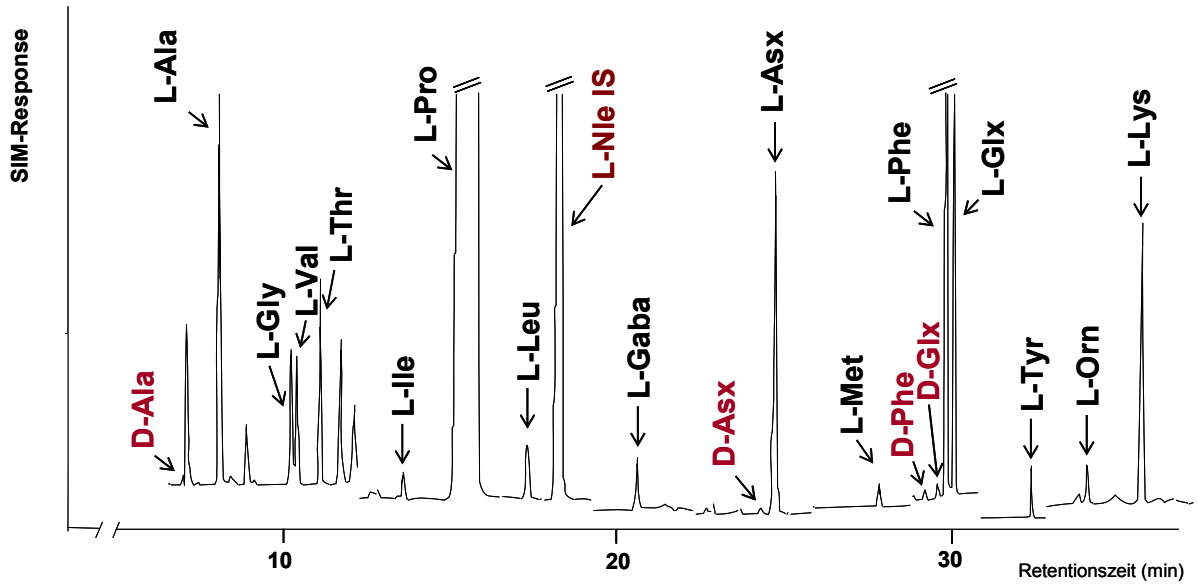


Abb. A-13 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH2 (*Akazienhonig);* TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6**

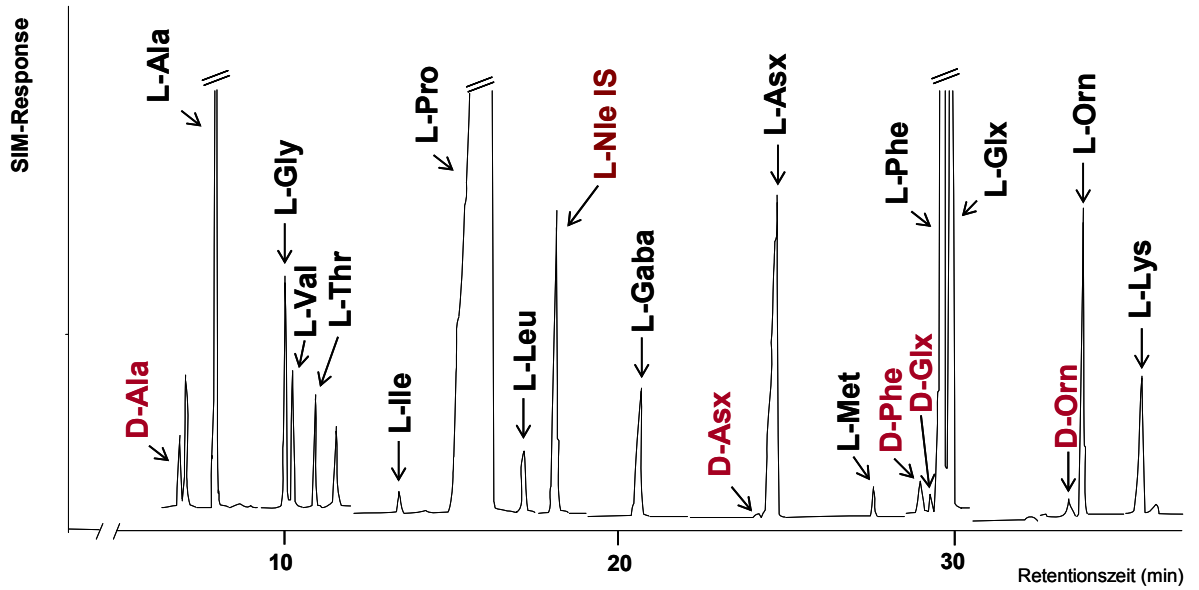


Abb. A-14 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH3 (*Waldhonig);* TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.1.6**

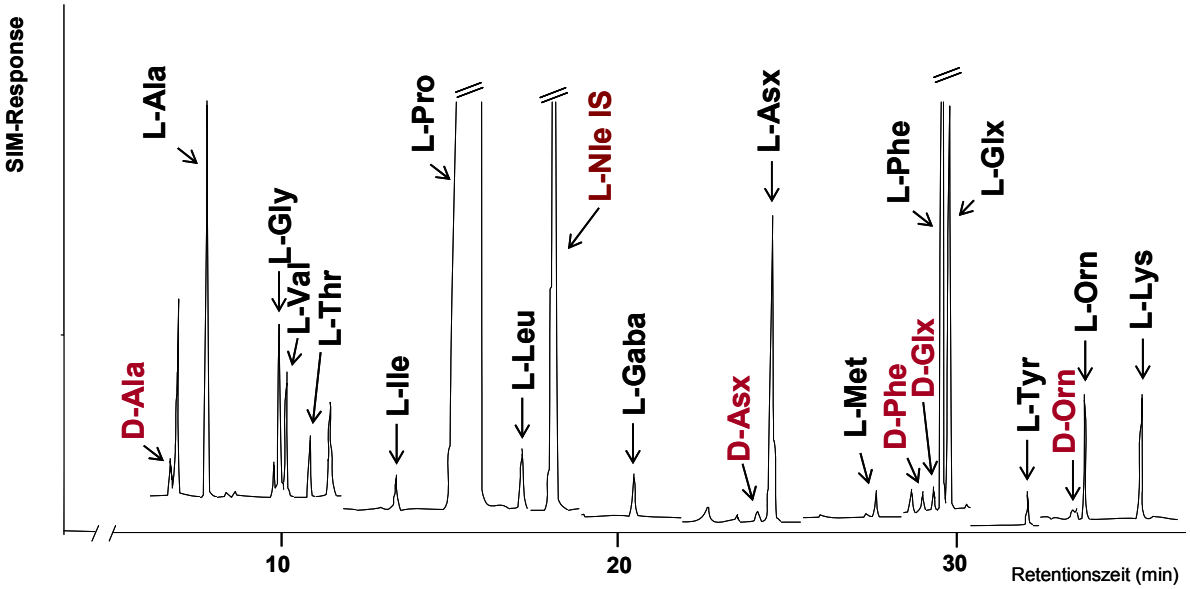


Abb. A-15 **GC-SIM-MS Chromatogramm der Honigprobe BH4 (*Tannenhonig);* TFAA/2-Propanol; Chirasil®-L-Val; Bedingungen siehe Kapitel 2.9.16**

Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

Untersuchungen zur Enantiomerisierung von Aminosäuren mittels chromatographischer Methoden

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Christoph Theis

Gießen, im Juni 2010

Danksagung

Letztlich möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans Brückner für die Bereitstellung des Themas sowie seine engagierte Förderung der vorliegenden Arbeit danken. Seine wertvollen Ratschläge und Ideen haben maßgeblich zum Gelingen der Dissertation beigetragen.

Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. Ralf Pätzold, denn er gab mir mit seinem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Zorn bedanke ich mich für die Zweitkorrektur.

Frau Renate Becker und Frau Dipl. oec. troph. Kerstin Kübler danke ich, da sie mich ebenfalls mit ihren Ideen sowie mit konstruktiver Kritik unterstützt haben.

Ein großer Dank geht aber auch an meine Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis, insbesondere Frau Angelika Schneidewind, Herrn Dr. Jochen Kirschbaum, Herrn Dr. Thomas Degenkolb und Frau MSc. Michaela Hänsch danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Großer Dank geht auch an Herrn Dr. Victor Wray (Helmholtz–Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig) und Herrn Prof. Dr. Richard Göttlich (Institut für Organische Chemie in Gießen) für die Durchführung von NMR-Messungen sowie Ihre Unterstützung bei der Auswertung.

Des Weiteren danke ich meinen Eltern und auch meinen Großeltern, die durch ihre unentwegte Hilfe und Unterstützung meiner Ausbildung diese Arbeit erst ermöglicht haben, sowie meiner Frau Dipl. oec. troph. Nicole Theis für ihre moralische und fachliche Hilfe.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Originalarbeiten in wissenschaftlichen Journalen:

THEIS C, DEGENKOLB T, BRÜCKNER H (2008) Studies on the Selective Trifluoroacetolytic Scission of Native Peptaibols and Model Peptides Using HPLC and ESI-CID-MS. *Chemistry and Biodiversity* **5**: 2337-2355

DEGENKOLB T, DIECKMANN R, NIELSEN KF, GRÄFENHAN T, THEIS C, ZAFARI D, CHAVERRI P, ISMAIEL A, BRÜCKNER H, V. DÖHREN H, THRANE U, PETRINI O, SAMUELS GJ (2008) The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* **7**: 177-219

PÄTZOLD R, THEIS C, BRÜCKNER H (2006) Gas Chromatographic separation of stereoisomers of dipeptides. *Chirality* **18**: 551-557

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (Paper in Vorbereitung) Studies on the enantiomerization of amino acids released from fructose-L-amino acids (AMADORI compounds) and nonproteogenic amino acids during the MAILLARD reaction

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (Paper in Vorbereitung) Determination of AMADORI compounds (Fructose-amino acids) in Honey by High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionisation Mass-Spectrometry (HPLC-MS)

Abstracts und Kurzbeiträge zu Vorträgen und Postern bei wissenschaftlichen Kongressen:

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2010) Synthese von Amadoriverbindungen und deren Nachweis in Honig. *Lebensmittelchemie* **64**: 7-8

BRÜCKNER H, KIRSCHBAUM J, THEIS C, PÄTZOLD R (2009) Amino Acid Racemization in the Course of the MAILLARD Reaction. *Amino Acids* (Supplement) **37**: 4-5

BRÜCKNER H, THEIS C, PÄTZOLD R (2009) D-Amino Acids as Markers for Various Phenomena in Food and Biosciences. *Amino Acids* (Supplement) **37**: 3-4

THEIS C, DEGENKOLB T, BRÜCKNER H (2009) Acidolytic Cleavage of Homooligo-Aib-Peptides and Natural Analogs. Beitrag im Tagungsband auf dem „9th German Peptide Symposium“ 2009 in Göttingen: 72

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2009) Konventionelle und Mikrowellenerhitzung – Einfluss auf die Racemisierung von nicht-proteinogenen Aminosäuren im Honig. *Lebensmittelchemie* **63**: 15-16

THEIS C, HÄNSCH M, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2009) Chirale Analytik von synthetischen Fructose-Aminosäuren (Amadori-Verbindungen). *Lebensmittelchemie* **63**: 16-17

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Determination of AMADORI compounds (Fructose-amino acids) in Honey with High Performance Liquid Chromatography- Mass-Spectrometry (HPLC-MS). Beitrag im Tagungsband auf dem „27th International Symposium on Chromatography“ 2008 in Münster

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Studies on the enantiomerization of amino acids released from fructose-L-amino acids (AMADORI compounds) during the MAILLARD reaction. Beitrag im Tagungsband auf dem „20th International Symposium on Chirality“ 2008 in Genf: 247

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Bestimmung des Aminosäurespektrums von "Kopi Luwak" - einer Kaffeespezialität aus Indonesien. *Lebensmittelchemie* **62**: 16

THEIS C, HÄNSCH M, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Synthese und säulenchromatographische Reinigung von Amadoriverbindungen. *Lebensmittelchemie* **62**: 17

PÄTZOLD R, THEIS C, BRÜCKNER H (2006) GC-SIM-MS Bestimmung der Stereoisomeren von Dipeptiden. *Lebensmittelchemie* **60**: 14-15

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2004) Nachweis von Dipeptiden in Würzsoßen mittels GC-SIM-MS. *Lebensmittelchemie* **58**: 107-108

Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen:

DINGELDEY F, THEIS C, PÄTZOLD R (2010) Schnellmethode zur Bestimmung von Aminosäuren mittels Einschrittderivatisierung und GC-FID. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West und Bayern vom 8 bis 9 März 2010 in Erlangen

THEIS C, DEGENKOLB T, BRÜCKNER H (2009) Acidolytic Cleavage of Homooligo-Aib-Peptides and Natural Analogs. 9th German Peptide Symposium vom 11 bis 14 März 2009 in Göttingen

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Determination of AMADORI compounds (Fructose-amino acids) in Honey with High Performance Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry (HPLC-MS). 27th International Symposium on Chromatography vom 21 bis 25 September 2008 in Münster

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Studies on the enantiomerization of amino acids released from fructose-L-amino acids (AMADORI compounds) during the MAILLARD reaction. 20th International Symposium on Chirality vom 6 bis 9 July 2008 in Genf

BRÜCKNER H, DEGENKOLB T, THEIS C (2008) Studies on Selective Trifluoroacetolytic Scisson of Native Peptaibols and Model Peptides using HPLC and ESI-CIDMS. 11th Naples Workshop on Bioactive Peptides vom 24 bis 27 Mai 2008 in Neapel

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Konventionelle und Mikrowellenerhitzung – Einfluss auf die Racemisierung von nicht-proteinogenen Aminosäuren im Honig. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West vom 3 bis 4 März 2008 in Hohenheim

THEIS C, HÄNSCH M, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2008) Chirale Analytik von synthetischen Fructose-Aminosäuren (Amadori-Verbindungen). Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West vom 3 bis 4 März 2008 in Hohenheim

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2007) Bestimmung des Aminosäurespektrums von "Kopi Luwak" - einer Kaffeespezialität aus Indonesien. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West vom 5 bis 6 März 2007 in Gießen

THEIS C, HÄNSCH M, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2007) Synthese und Säulenchromatographiscghe Reinigung von Amadoriverbindungen. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West vom 5 bis 6 März 2007 in Gießen

PÄTZOLD R, THEIS C, BRÜCKNER H (2005) GC-SIM-MS Bestimmung der Stereoisomeren von Dipeptiden. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West vom 7 bis 8 März 2005 in Frankfurt

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2004) Nachweis von Dipeptiden in Würzsoßen mittels GC-SIM-MS. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West vom 8 bis 9 März 2004 in Würzburg

Buchbeiträge:

DEGENKOLB T, DIECKMANN R, NIELSEN KF, GRÄFENHAN T, THEIS C, ZAFARI D, CHAVERRI P, ISMAIEL A, BRÜCKNER H, V. DÖHREN H, THRANE U, PETRINI O, SAMUELS GJ (2008) The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. DOI 10.1007/s11557-008-0563-3

THEIS C, DEGENKOLB T, BRÜCKNER H (2008) Studies on the Selective Trifluoroacetolytic Scission of Native Peptaibols and Model Peptides Using HPLC and ESI-CID-MS. In:TONIOLO C, BRÜCKNER H (Eds.) Peptaibiotics - Fungal Peptides Containing a-Alkyl a-Amino Acids. Verlag Helvetica Chimica Acta, 2009, Zürich und Wiley-VCH, Weinheim: 321-339

Vorträge:

THEIS C, PÄTZOLD R, BRÜCKNER H (2009) Synthese von Amadoriverbindungen und deren Nachweis in Honig. Tagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft; Regionalverband Süd-West am 2 und 3 März 2009 in Koblenz