

**Lebensmittelchemie**

**Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori-  
Umlagerungsprodukten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

---

vorgelegt von  
Ralf Liedke  
aus Münster  
1999

---

Dekan: Prof. Dr. W. Lange

Erster Gutachter: Prof. Dr. K. Eichner

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H.-P. Thier

Tag der mündlichen Prüfungen:

Tag der Promotion:

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Die Maillard-Reaktion  | 1         |
| 1.1.1    | Bildung von Glykosylaminen   | 1         |
| 1.1.2    | Die Amadori-Umlagerung   | 2         |
| 1.1.3    | Die Bildung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen über die Enolisierung der Amadori-Verbindung                                  | 4         |
| 1.1.3.1  | Die Bedeutung des 1-Desoxyosons in der nicht-enzymatischen Bräunung  | 6         |
| 1.1.3.2  | Die Bedeutung des 3-Desoxyosons in der nicht-enzymatischen Bräunung  | 7         |
| 1.1.4    | Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen  | 8         |
| 1.1.4.1  | Die Bildung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen über die Autoxidation der Amadori-Verbindung                                  | 8         |
| 1.1.4.2  | Die Bildung von N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin ( <i>Nonenzymatic Glycosylation</i> )                                       | 10        |
| 1.1.5    | Weitere oxidative Prozesse im Verlauf der Maillard-Reaktion  | 11        |
| 1.1.5.1  | Die Autoxidation von reduzierenden Zuckern und die autoxidative Glykosylierung ( <i>Autoxidative Glycosylation</i> )           | 12        |
| 1.1.5.2  | Bildung von N,N'-Dialkylpyrazinkation-Radikalen in der frühen Phase der Maillard-Reaktion                                      | 13        |
| 1.1.6    | Weiterführende Reaktionswege unter Beteiligung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen  | 14        |
| 1.1.6.1  | Die Retroaldol-Reaktion von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen und Amadori-Verbindungen  | 14        |
| 1.1.6.2  | Der Strecker-Abbau von Aminosäuren   | 15        |
| 1.1.6.3  | Bildung heterocyclischer Verbindungen  | 15        |
| 1.1.6.4  | Bildung von Melanoidinen   | 16        |
| 1.2      | Problemstellung und Zielsetzung  | 16        |
| <b>2</b> | <b>Analytische und präparative Arbeitsweisen</b>   | <b>20</b> |
| 2.1      | Analytik und Untersuchungsmethoden   | 20        |
| 2.1.1    | Die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin  | 21        |
| 2.1.2    | Gaschromatographische Bestimmung von Zuckern, Amadori-Verbindungen und Chinoxalinderivaten nebeneinander                       | 23        |
| 2.1.3    | Aufarbeitung realer Lebensmittelproben   | 27        |
| 2.1.3.1  | Entwicklung einer Methode zur Extraktion von Chinoxalinderivaten aus wässrigen Extrakten                                       | 29        |
| 2.1.4    | Nachweis von Radikalen mit der DPPH-Methode  | 30        |
| 2.1.5    | Nachweis und Charakterisierung von Radikalen mit der Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie (ESR)                              | 33        |
| 2.1.5.1  | Grundlagen der ESR   | 33        |
| 2.1.5.2  | Nachweis kurzlebiger Radikale durch Spin Trapping mit DMPO   | 35        |
| 2.2      | Präparative Arbeiten   | 37        |
| 2.2.1    | Präparative Darstellung der Amadori-Verbindungen   | 37        |
| 2.2.2    | Präparative Darstellung der Chinoxalinderivate der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen  | 38        |
| 2.2.2.1  | Darstellung von 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin (1-Desoxyoson-chinoxalin)                                    | 38        |
| 2.2.2.2  | Darstellung von 2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl)-chinoxalin (3-Desoxyoson-chinoxalin)  | 39        |
| 2.2.2.3  | Darstellung von D- <i>arabino</i> -Hexos-2-ulose-chinoxalin (D-Glucoson-chinoxalin)  | 40        |
| 2.2.3    | Charakterisierung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Chinoxaline mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie Kopplung | 40        |
| 2.2.3.1  | Charakterisierung der Chinoxalinderivate mittels GC/MS-Kopplung nach Silylierung   | 40        |
| 2.2.3.2  | Charakterisierung der Chinoxalinderivate mittels GC/MS-Kopplung nach Acetylierung  | 42        |
| 2.2.4    | Charakterisierung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Chinoxaline mittels FT-Infrarot Spektroskopie                       | 43        |
| <b>3</b> | <b>Untersuchungen an wässrigen Modellsystemen</b>  | <b>45</b> |
| 3.1      | Nachweis des radikalischen Abbaus von Amadori-Verbindungen mittels ESR nach Spin Trapping                                      | 45        |
| 3.2      | Nachweis des radikalischen Abbaus von Amadori-Verbindungen mittels der DPPH-Methode  | 50        |
| 3.3      | Die Autoxidation und die Enolisierungsreaktionen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen                                  | 52        |
| 3.3.1    | Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Modellen mit unterschiedlichen pH-Werten                                       | 53        |
| 3.3.1.1  | Bildung des 1-Desoxyosons  | 54        |
| 3.3.1.2  | Bildung des 3-Desoxyosons  | 55        |

| Inhaltsverzeichnis |   | II         |
|--------------------|---|------------|
| 3.3.1.3            | Bildung des Glucosons   | 56         |
| 3.3.1.4            | Abbau des Fructose-Alanins  | 58         |
| 3.3.1.5            | Zusammenfassender Vergleich der Ergebnisse für die pH-Wert-Abhängigkeit   | 59         |
| 3.3.2              | Abhängigkeit der Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen von der Temperatur                                    | 61         |
| 3.3.2.1            | Bildung des 1-Desoxyosons   | 61         |
| 3.3.2.2            | Bildung des 3-Desoxyosons   | 62         |
| 3.3.2.3            | Bildung des Glucosons   | 63         |
| 3.3.2.4            | Abbau des Fructose-Alanins  | 65         |
| <b>3.4</b>         | <b>Die Kupfer-Katalyse bei der autoxidativen Glucoson-Bildung</b>   | <b>66</b>  |
| 3.4.1              | Einfluß unterschiedlicher Kupferionen-Konzentrationen auf die Bildung des Glucosons                                 | 67         |
| 3.4.2              | Einfluß von Puffersubstanzen auf die Bildung des Glucosons  | 68         |
| 3.4.3              | Einfluß des EDTA-Gehaltes auf die Bildung des Glucosons   | 71         |
| <b>3.5</b>         | <b>Die Autoxidation von reduzierenden Zuckern im Vergleich zur Amadori-Verbindung</b>                               | <b>73</b>  |
| 3.5.1              | Einfluß der Amino-Verbindung auf die Bildung des Glucosons  | 74         |
| 3.5.1.1            | Die Bedeutung der Amadori-Verbindung für die Bildung des Glucosons  | 75         |
| 3.5.2              | Einfluß unterschiedlicher Zucker auf die Bildung des Glucosons  | 77         |
| <b>4</b>           | <b>Untersuchungen an wasserarmen Modellsystemen</b>   | <b>80</b>  |
| 4.1                | Vorüberlegungen zu den wasserarmen Modellsystemen   | 80         |
| 4.2                | Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus Amadori-Verbindungen über die Enolisierungsreaktionen              | 82         |
| 4.2.1              | Bildung des 1-Desoxyosons   | 82         |
| 4.2.1.1            | Abhängigkeit der Bildung vom pH-Wert  | 82         |
| 4.2.1.2            | Abhängigkeit der Bildung von der Wasseraktivität  | 82         |
| 4.2.2              | Bildung des 3-Desoxyosons   | 84         |
| 4.2.2.1            | Abhängigkeit der Bildung vom pH-Wert  | 84         |
| 4.2.2.2            | Abhängigkeit der Bildung von der Wasseraktivität  | 85         |
| 4.2.3              | Einfluß der Kupfer-Katalyse auf die Enolisierungsreaktionen   | 87         |
| 4.3                | Bildung des Glucosons über den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung  | 88         |
| 4.3.1              | Abhängigkeit vom pH-Wert  | 88         |
| 4.3.2              | Einfluß der Kupfer-Katalyse   | 90         |
| 4.3.3              | Abhängigkeit von der Wasseraktivität  | 91         |
| 4.4                | Abbau des Fructose-Alanins  | 93         |
| 4.5                | Zusammenfassung   | 95         |
| <b>5</b>           | <b>Untersuchungen zum Prozeß des Bierbrauens</b>  | <b>98</b>  |
| 5.1                | Einleitung  | 98         |
| 5.1.1              | Die Grundstoffe für die Bierbereitung   | 98         |
| 5.1.1.1            | Das Malz  | 98         |
| 5.1.1.2            | Das Brauwasser  | 99         |
| 5.1.1.3            | Weitere Inhaltsstoffe   | 100        |
| 5.1.2              | Die Würzebereitung  | 100        |
| 5.1.2.1            | Das Schroten des Malzes   | 100        |
| 5.1.2.2            | Der Maischprozeß  | 101        |
| 5.1.2.3            | Das Kochen der Würze  | 101        |
| 5.1.3              | Die Gärung  | 102        |
| 5.2                | Der Brauprozeß im Labormaßstab  | 102        |
| 5.2.1              | Bildung von Mono- und Disacchariden während des Brauprozesses   | 104        |
| 5.2.2              | Bildung von Aminosäuren während des Brauprozesses   | 106        |
| 5.2.3              | Bildung und Abbau von Amadori-Verbindungen während des Brauprozesses  | 109        |
| 5.2.4              | Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen während des Brauprozesses  | 112        |
| 5.2.4.1            | Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bei der Würzebereitung in Abhängigkeit von der Temperaturführung       | 112        |
| 5.2.4.2            | Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen während der Würzebereitung in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration | 116        |
| <b>6</b>           | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>120</b> |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| <b>7</b> | <b>Arbeitsvorschriften</b>   | <b>125</b> |
| 7.1      | Präparative Arbeiten   | 126        |
| 7.1.1    | Darstellung von Amadori-Verbindungen   | 126        |
| 7.1.2    | Darstellung von 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin (1-Desoxyoson-chinoxalin)            | 127        |
| 7.1.3    | Darstellung von 2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl)-chinoxalin (3-Desoxyoson-chinoxalin)                      | 129        |
| 7.1.4    | Darstellung von D- <i>arabino</i> -Hexos-2-ulose-chinoxalin (D-Glucoson-chinoxalin)                    | 131        |
| 7.1.5    | Charakterisierung der Präparate mittels GC/MS  | 132        |
| 7.1.6    | Charakterisierung der Präparate mittels FT-IR  | 134        |
| 7.2      | Ansatz der wäßrigen Modellsysteme  | 135        |
| 7.2.1    | Modelle mit Fructose-Alanin als Ausgangsverbindung   | 135        |
| 7.2.2    | Modelle mit Zuckern und Aminosäuren als Ausgangsverbindungen   | 135        |
| 7.2.3    | Citratpuffer (0,02 mol/l)  | 136        |
| 7.2.4    | Modelle zur Abhängigkeit von der Kupferkonzentration   | 136        |
| 7.2.5    | Modell zur Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration   | 138        |
| 7.2.6    | Erhitzungsbedingungen / Aufarbeitung der Proben  | 139        |
| 7.3      | Ansatz der wasserarmen Modellsysteme auf Basis mikrokristalliner Cellulose (Avicel)                    | 139        |
| 7.3.1    | Citratpuffer (0,04 mol/l)  | 140        |
| 7.3.2    | Einstellung des $a_w$ -Wertes  | 140        |
| 7.3.3    | Erhitzungsbedingungen / Aufarbeitung der Proben  | 141        |
| 7.4      | Ansatz der Maischen und der Würzen im Labormaßstab   | 141        |
| 7.4.1    | Schroten des Gerstenmalzes   | 142        |
| 7.4.2    | Ansatz der Maische im Labormaßstab   | 142        |
| 7.4.3    | Das Würzekochen  | 143        |
| 7.5      | Extraktion der Chinoxalinderivate aus wäßrigen Lösungen  | 143        |
| 7.5.1    | Bestimmung der Wiederfindungsraten für die Extraktion mit n-Butanol                                    | 144        |
| 7.6      | Analytische Arbeiten   | 146        |
| 7.6.1    | Nachweis von Radikalen in wäßrigen Modellsystemen  | 146        |
| 7.6.2    | Untersuchungen in Malz, Maischen und Würzen  | 148        |
| 7.6.3    | Gaschromatographische Bestimmung von Zuckern, Amadori-Verbindungen und Chinoxalinen nebeneinander      | 150        |
| 7.6.4    | Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA | 152        |
| 7.6.5    | Bestimmung des Wassergehaltes in wasserarmen Proben mittels der Karl-Fischer-Titration                 | 156        |
| <b>8</b> | <b>Literatur</b>   | <b>157</b> |
| <b>9</b> | <b>Anhang</b>  | <b>163</b> |
| 9.1      | Verwendete Abkürzungen   | 163        |
| 9.2      | MS-Spektren  | 164        |
| 9.3      | FT-IR-Spektren   | 164        |
| 9.4      | ESR-Spektren   | 168        |



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Maillard-Reaktion

Erhitzt man eine wässrige Lösung eines Gemisches aus Glucose und Glycin, so kommt es zu einer Vielzahl chemischer Prozesse, die sich in einer zunehmenden Bräunung der Lösung äußern. Zusammengefaßt werden die Reaktionen, die aus der Umsetzung von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren oder Proteinen resultieren, unter dem Begriff der nicht-enzymatischen Bräunung. 1912 führte Louis-Camille Maillard [1] als erster umfangreiche Untersuchungen zu diesen komplexen Reaktionen durch. Nach ihm wurde die nicht-enzymatische Bräunung auch unter dem Begriff der Maillard-Reaktion bekannt.

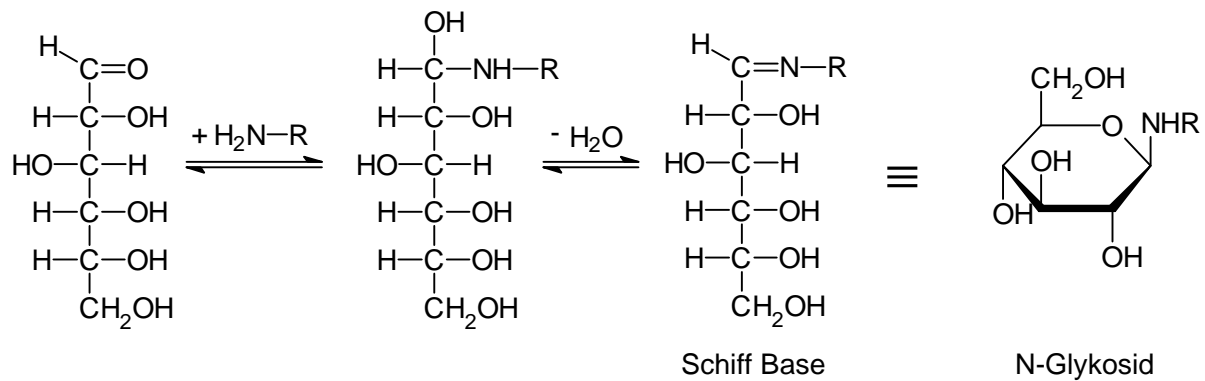
Die Maillard-Reaktion spielt bei vielen technologischen Prozessen wie dem Kochen, Backen aber auch dem Trocknen und Lagern von Lebensmitteln eine Rolle und ist von großer Bedeutung für den Geruch, den Geschmack und die Farbe des Endproduktes. So kommt es im Verlauf der Maillard-Reaktion sowohl zu erwünschten als auch zu unerwünschten und zum Teil sogar toxischen Folgeprodukten [2][3].

Dabei handelt es sich bei der Maillard-Reaktion aber nicht um eine einzige Reaktion, sondern um eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionswege, die in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen ablaufen können. 1953 stellte Hodge [4][5] ein grundlegendes Schema für die einzelnen Stufen der Maillard-Reaktion auf, das noch bis heute gültig ist.

Ein anderer Aspekt der Maillard-Reaktion ist ihre Bedeutung im menschlichen Körper [6]. So spielt die Maillard-Reaktion *in vivo* bei Alterungsprozessen an körpereigenen Proteinen und bei Diabetes mellitus eine große Rolle. Hier sind es vor allem oxidative Prozesse, die im Verlauf der Maillard-Reaktion zu einer Schädigung von Gewebeproteinen führen können.

### 1.1.1 Bildung von Glykosylaminen

Im ersten Schritt der Maillard-Reaktion kommt es zu einer nucleophilen Addition von Aminen an die Carbonylfunktion von reduzierenden Zuckern [6]. Da die reduzierenden Zucker in wässrigen Lösungen in Form ihrer Halbacetale bzw. Halbketale vorliegen, ergibt sich die Reaktivität aus der glykosidischen Hydroxylgruppe am anomeren Kohlenstoffatom, die leicht durch die Amino-Gruppe ersetzt werden kann.



**Abbildung 1: Bildung von Glykosylaminen (N-Glykosiden) aus reduzierenden Zuckern und Aminen (nach [4]).**

Der Mechanismus läuft dabei wahrscheinlich über die Öffnung der Ringform des Zuckers ab (Abbildung 1). Nach Addition der Aminoverbindung spaltet sich direkt ein Molekül Wasser ab, wodurch sich die entsprechende Schiff'sche Base bildet, die allerdings aus Reaktionsgemischen von reduzierenden Zuckern und Aminosäuren nicht isoliert werden kann. Ob es zwangsläufig zu der Abspaltung des Wassers kommen muß, ist unklar, da die isolierten Glykosylamine bevorzugt als Monohydrat auskristallisieren.

Die entstandenen Glykosylamine liegen wie die reduzierenden Zucker ebenfalls in Form der Halbacetale bzw. der Halbketale vor. Sie neigen ebenfalls zur Mutarotation und liegen in wässrigen Lösungen bevorzugt als  $\beta$ -Pyranosid vor [7]. Die allgemein übliche Darstellung in der offenkettigen Form stellt lediglich eine schematische Vereinfachung dar.

Die Glykosylamine sind allerdings an sich relativ instabil. Stabile Glykosylamine erhält man lediglich aus der Reaktion von reduzierenden Zuckern mit aromatischen und heterocyclischen Aminen wie etwa den Purinen - prominentes Beispiel für ein solches stabiles Glykosylamin ist das Adenosintriphosphat (ATP). Glykosylamine aus aliphatischen Aminen oder Aminosäuren sind dagegen sehr instabil. Sie können nur in Form ihrer Metallkomplexe isoliert werden, nicht jedoch in freier Form. Zum einen ist ihre Bildung reversibel, wobei mit einer Rückbildung der Ausgangsprodukte vor allem in wässrigen Systemen gerechnet werden muß [7], zum anderen reagieren die Glykosylamine in Lebensmitteln und Modellsystemen schnell weiter zu stabilen Zwischenprodukten.

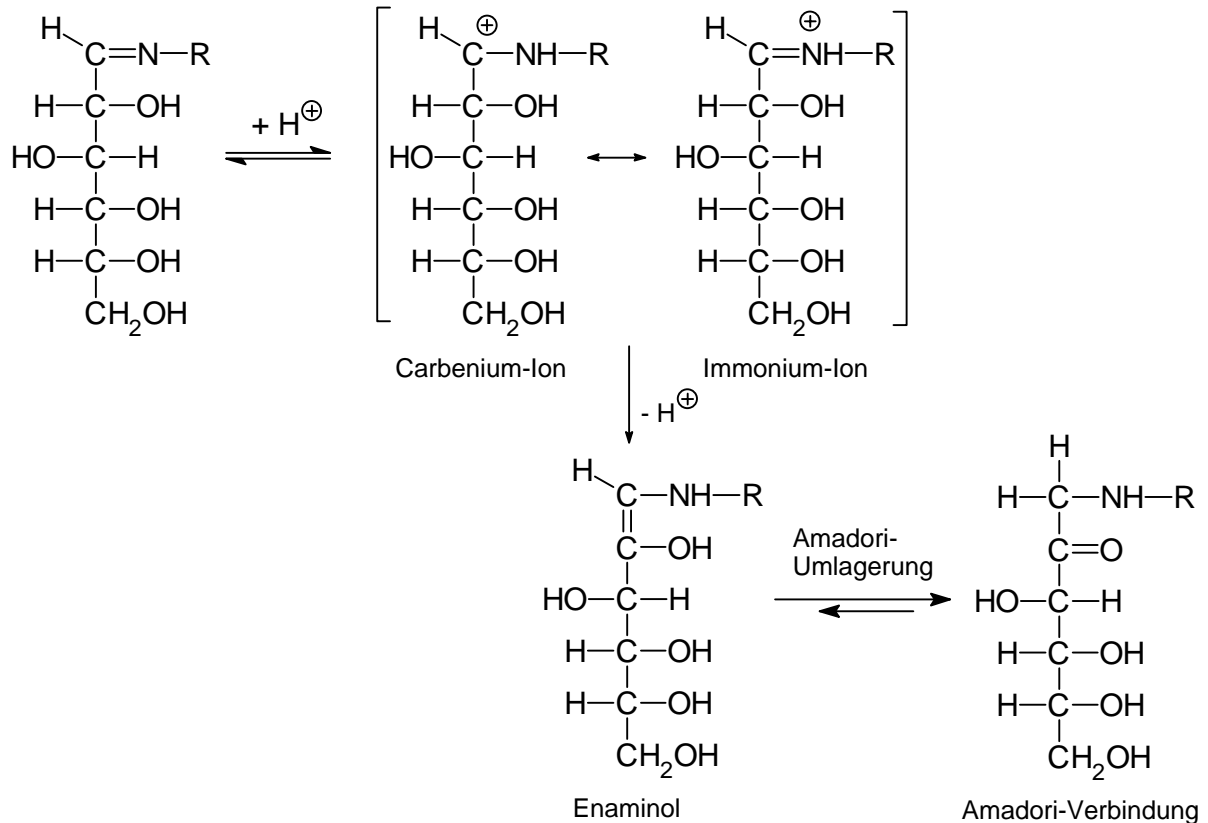
### 1.1.2 Die Amadori-Umlagerung

Die instabilen Glykosylamine aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren oder aliphatischen Aminen durchlaufen eine intramolekulare Umwandlung, die nach ihrem Entdecker als Amadori-Umlagerung bezeichnet wird. Amadori [8] konnte beim Erhitzen von Glucose mit primären aromatischen Aminen zwei Isomere nachweisen, die sich jedoch sehr in ihrer Stabilität unterscheiden. Kuhn und Weygand [9] konnten die Strukturen aufklären. So handelt



es sich bei der instabilen Form um das N-Glykosid, bei der stabilen Form um die Isomere 1-Amino-1-Desoxy-Fructose, die sogenannte Amadori-Verbindung.

Bei der Amadori-Umlagerung werden allgemein Aldosylamine zu den korrespondierenden 1-Amino-1-Desoxy-ketosen umgewandelt (Abbildung 2). Die analoge Umlagerung von Keto-sylaminen zu den 2-Amino-2-Desoxy-aldosen wird als Heyns-Umlagerung bezeichnet [10].



**Abbildung 2: Bildung von Amadori-Verbindungen aus Glykosylaminen**

In einem ersten Schritt der Amadori-Umlagerung bildet sich aus dem Glykosylamin über eine 1,2-Enolisierung die Enaminolform. Dieser Schritt läuft bereits in Gegenwart kleiner Mengen an Protonen ab. Dabei müssen die benötigten Protonen nicht von außen zugeführt werden, da das Carboxylproton des Aminosäure-Restes hier autokatalytisch wirksam ist [11]. Die protonierte Form des Glykosylamins ist dabei über das Carbenium-Ion und das Immonium-Ion mesomer stabilisiert [12]. Die Elektrophilie der Mesomeren erleichtert die Abspaltung des aciden Protons am zweiten Kohlenstoffatom des Zuckerrestes, wodurch das Enaminol als wichtige Zwischenstufe der Amadori-Umlagerung entsteht [11]. Aus dem Enaminol bildet sich dann die 1-Amino-1-Desoxy-Fructose. Die Amadori-Verbindungen sind relativ stabil und stellen deshalb die ersten analytisch faßbaren Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion dar. Der Nachweis von Amadori-Verbindungen gelang in erhitzten und gelagerten Lebensmitteln sowie in verschiedenen Trockenprodukten, aber auch in Glucose und Aminosäure enthaltenden Infusionslösungen. Auch in vivo konnten Amadori-Verbindungen in unterschiedlichen menschlichen Geweben nachgewiesen werden, vor allem bei Menschen mit

Diabetes mellitus [6]. Bei geeigneten Reaktionsbedingungen (niedriger Wassergehalt, pH-Wert 3 - 6) stellen die Amadori-Verbindungen wichtige Markersubstanzen für die frühe Maillard-Reaktion dar [13]. Auch wenn es sich bei ihnen um relativ stabile Verbindungen handelt, so führt ihr Abbau in wäßrigen Systemen mit zunehmendem pH-Wert zu braungefärbten Lösungen. Dabei zeigen sie eine stärkere Reaktivität als die entsprechenden reduzierenden Zucker.

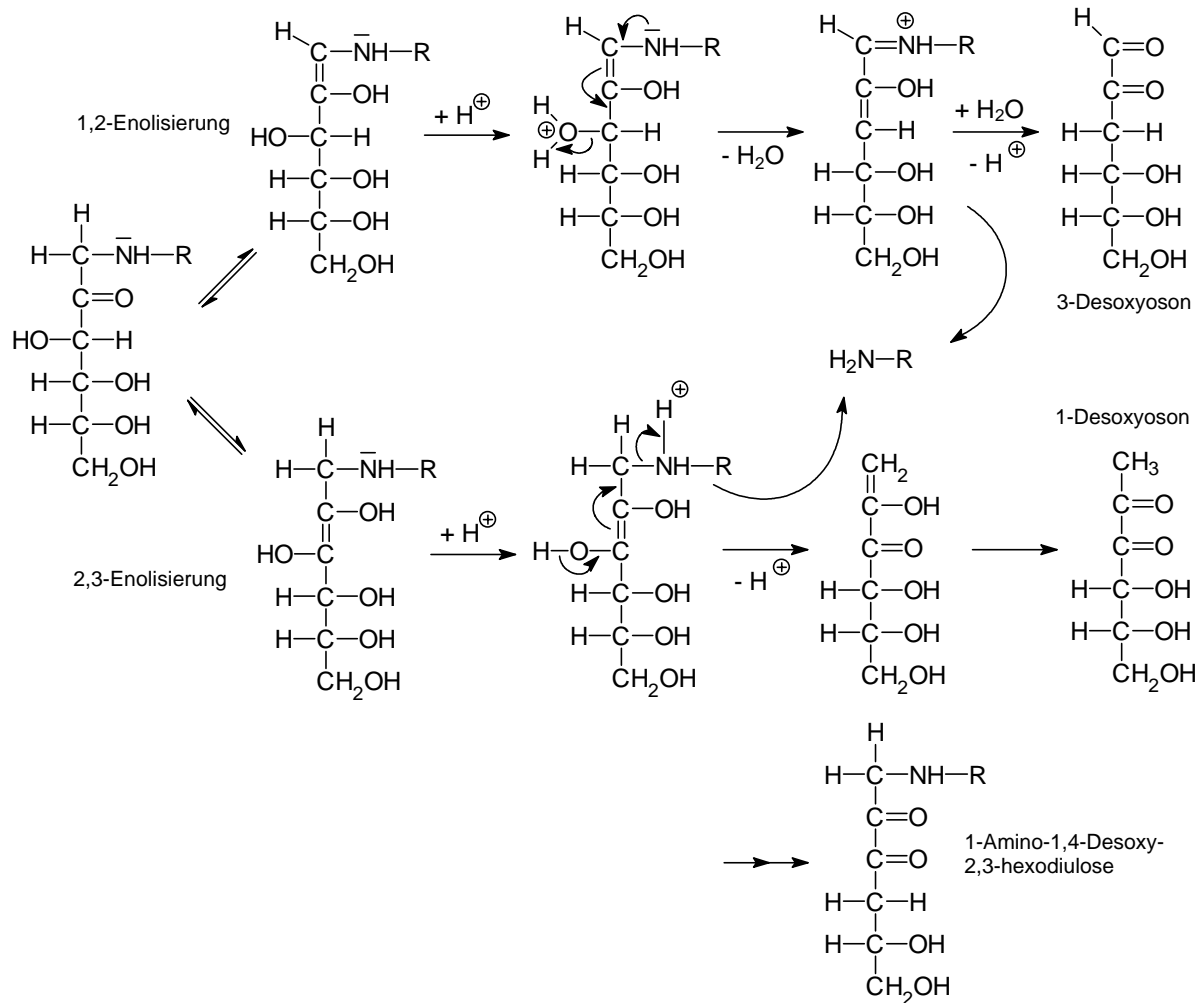
Amadori-Verbindungen liegen in wäßrigen Systemen in Form der Halbacetale vor, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form der Fructopyranose und Fructofuranose einstellt. Die  $\beta$ -Fructopyranose-Form stellt dabei mit 61 % das Hauptisomer dar, womit die Gleichgewichtseinstellung vergleichbar mit der der reinen Fructose ist ( $\beta$ -Pyranose 69 %) [13].

Ein noch nicht vollständig geklärter Aspekt bei der Amadori-Umlagerung ist die Frage nach der Reversibilität der Reaktion. Die Amadori-Umlagerung wird generell als irreversibler Prozeß betrachtet. Grundsätzlich handelt es sich allerdings um eine Gleichgewichtsreaktion, so daß es über die mögliche Rückreaktion zur Bildung der Ausgangsverbindungen kommen kann [14]. Unter physiologischen Bedingungen konnte bereits gezeigt werden, daß die Amadori-Verbindungen zu einem minimalen Anteil zu den Ausgangsverbindungen rückreagieren kann [15][16]. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen sind die Geschwindigkeitskonstanten für die weiterführenden Folgereaktionen der Amadori-Verbindungen jedoch viel größer als die der Rückreaktion. Da die Amadori-Verbindungen gerade unter thermischer Belastung schnell zu den Folgeprodukten weiter reagieren, kann angenommen werden, daß die Umkehrreaktion mit steigenden Temperaturen keine Rolle mehr spielt [17].

### **1.1.3 Die Bildung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen über die Enolisierung der Amadori-Verbindung**

Ebenso wie Ketosen und Aldosen neigen auch Amadori-Verbindungen zu einer Säure-Base-katalysierten Enolisierung. Die Enolform der Amadori-Verbindung stellt eine sehr reaktive Zwischenstufe dar, die zu den unterschiedlichsten Folgeprodukten weiter reagieren kann. Möglich sind intramolekulare Wanderungen der Carbonylgruppe,  $\beta$ -Eliminierungsreaktionen oder oxidative Prozesse [13].

Der wohl wichtigste Zwischenschritt in dieser Phase der nicht-enzymatischen Bräunung ist die Enolisierung mit anschließender  $\beta$ -Eliminierung, die zu den Desoxydiketosen bzw. Desoxyaldoketosen führt (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Bildung der Desoxyosone über die Enolisierung der Amadori-Verbindung**

Über die 1,2-Enolisierung bildet sich das Enaminol der Amadori-Verbindung. Nach  $\beta$ -Eliminierung der Hydroxylgruppe am  $C_3$ -Atom und anschließender Hydrolyse bildet sich die 3-Desoxy-2-hexosulose, das 3-Desoxyoson.

Analog bildet sich über die 2,3-Enolisierung das Endiol der Amadori-Verbindung. Durch die Abspaltung der Aminokomponente bildet sich die 1-Desoxy-2,3-hexodiulose - das 1-Desoxyoson. Unter geeigneten Bedingungen kann die Eliminierung des Aminrestes auch ausbleiben. In diesem Fall wird eine Eliminierung der Hydroxylgruppe am  $C_4$ -Atom begünstigt, wodurch als weitere Dicarbonylverbindung die 1-Amino-1,4-dideoxy-2,3-hexodiulose gebildet werden kann [6].

Ein wichtiger Aspekt bei den Enolisierungsreaktionen ist, daß die an der Bildung der Amadori-Verbindung beteiligte Aminokomponente unverändert aus den Reaktionen hervorgeht und so wieder für eine neue Reaktionsfolge zur Verfügung steht.

Die Bedeutung der Aminokomponente ist deshalb in erster Linie darin zu sehen, daß sie die intramolekulare Disproportionierung der Zucker zu den Desoxydicarbonylverbindungen katalysiert. Diese Reaktionen, die im Rahmen der Karamelisierung auch in Abwesenheit von

Aminen bei drastischen Bedingungen (hohe Temperatur, extreme pH-Werte [ $< 3$  bzw.  $> 8$ ]) ablaufen können, werden durch die Amine in einem für Lebensmittel und physiologische Systeme üblichen pH-Bereich katalysiert [6].

### 1.1.3.1 Die Bedeutung des 1-Desoxyosons in der nicht-enzymatischen Bräunung

Das 1-Desoxyoson stellt ein sehr reaktives Zwischenprodukt der Maillard-Reaktion dar, dessen Bildung bevorzugt im neutralen bis basischen Bereich abläuft.

Hodge postulierte bereits 1967 einen Abbauweg der Amadori-Verbindung, der über das 1-Desoxyoson verläuft [12]. Der Nachweis des 1-Desoxyosons in Maillard-Reaktionsgemischen gelang allerdings erst 1988. Ledl [18] konnte das 1-Desoxyoson in Form des stabilen Chinoxalinderivates beim Erhitzen von Amadori-Verbindungen in Gegenwart von *o*-Phenylendiamin identifizieren.

In wässrigen Lösungen liegt das 1-Desoxyoson aufgrund der Möglichkeit einer intramolekularen Acetalbildung in Form von cyclischen Hydroxyfuranonen und Hydroxypyranonen vor (Abbildung 4).

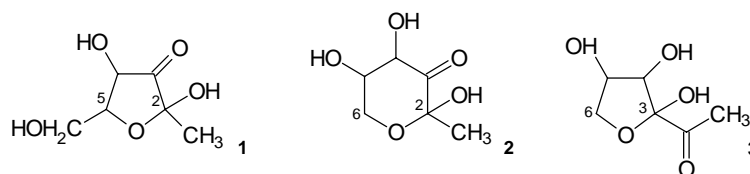


Abbildung 4: Die intramolekulare Acetalbildung des 1-Desoxyosons in wässrigen Lösungen

Viele der typischen Folgeprodukte ergeben sich direkt aus diesen Vorstufen. So entsteht aus der Furanonform (1) durch Dehydratisierung das Isomaltol (Abbildung 5). Typische Marker-substanzen für die Bildung des 1-Desoxyosons stellen das Maltol und das 2,3-Dihydro-3-hydroxymaltol (DHM) dar.

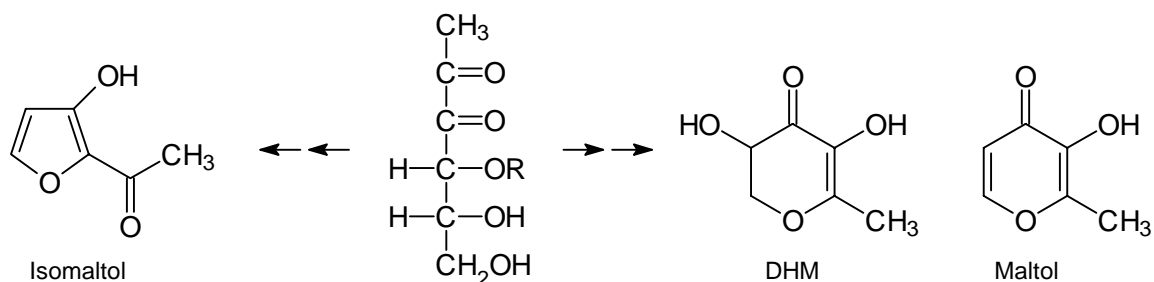


Abbildung 5: Typische Folgeprodukte des 1-Desoxyosons im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung

Die beiden Folgeprodukte bilden sich aus der Pyranform (2) des 1-Desoxyosons. Für die Bildung der beiden Markersubstanzen ist dabei entscheidend, ob das 1-Desoxyoson eines Monosaccharids ( $R = H$ ) oder eines Disaccharids ( $R = \text{Glykosyl}$ ) vorliegt. Während das Mal-

tol aus dem 1-Desoxyoson aus Disacchariden gebildet wird, entsteht das DHM aus 1-Desoxyhexosulosen [13].

### 1.1.3.2 Die Bedeutung des 3-Desoxyosons in der nicht-enzymatischen Bräunung

Das 3-Desoxyoson konnte bereits 1960 erstmals von Anet [19] in Maillard-Reaktionsgemischen nachgewiesen werden. Wenn es sich hierbei auch um ein sehr reaktives Intermediärprodukt handelt, so ist das 3-Desoxyoson doch deutlich stabiler als das 1-Desoxyoson.

Auch das 3-Desoxyoson liegt in wässrigen Lösungen in Form der Hydroxyfurane und der Hydroxypyrane vor (Abbildung 6 [13]).

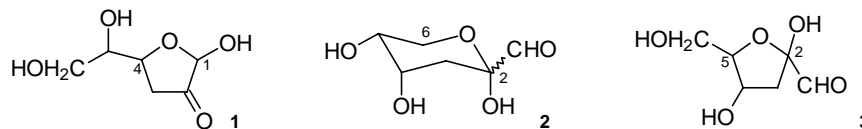


Abbildung 6: Die intramolekulare Acetalbildung des 3-Desoxyosons in wässrigen Lösungen

Unter sauren Bedingungen bildet sich als Hauptfolgeprodukt des 3-Desoxyosons das 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), das häufig als Markersubstanz für den 1,2-Enolisierungsweg im Verlauf der Maillard-Reaktion betrachtet wird (Abbildung 7). In Anwesenheit größerer Mengen an Aminverbindungen wird die Bildung des HMFs unterdrückt. Statt dessen bilden sich dann substituierte Pyrrole und Pyridiniumbetaine.

Im basischen Bereich bildet sich aus dem 3-Desoxyoson vor allem die Metasaccharinsäure, die, ausgehend von dem Hydroxyfuranon (1), in Form ihres Lactons gebildet wird [6].

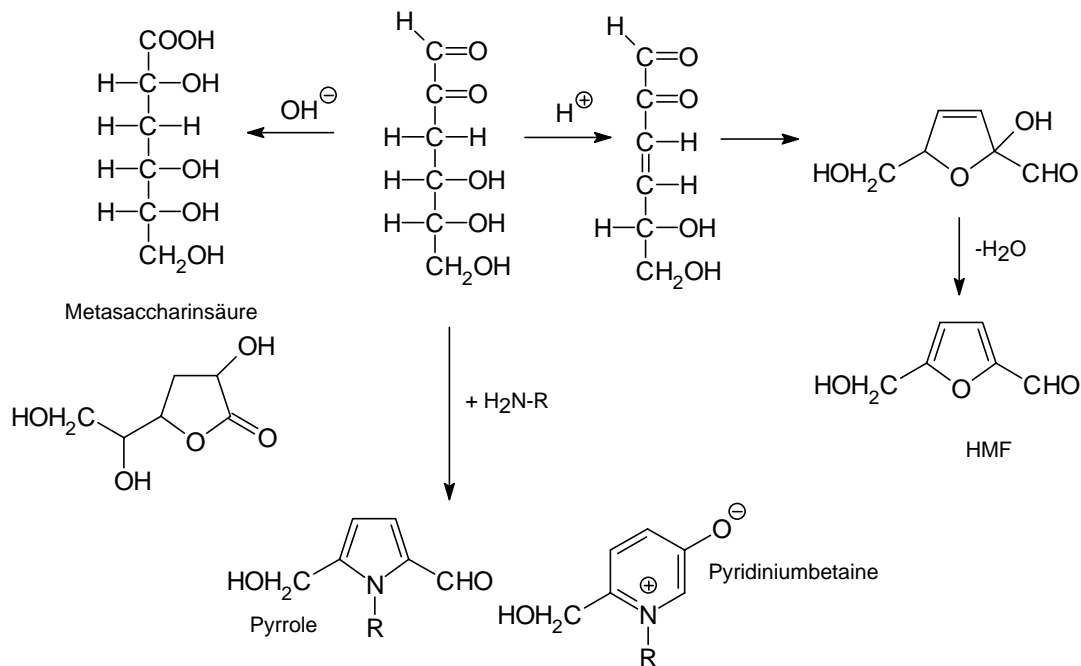


Abbildung 7: Schematische Darstellung typischer Abbauewege des 3-Desoxyosons im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung

### 1.1.4 Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen

Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen stellt einen alternativen Abbauweg zu den klassischen Enolisierungsreaktionen dar. Beachtung finden die oxidativen Reaktionsmechanismen vor allem in Bezug auf ihre Relevanz für physiologische Systeme. Man geht davon aus, daß die Maillard-Reaktion *in vivo* für Alterungsprozesse von Körperproteinen und für einzelne pathologische Erscheinungen bei Diabetes Mellitus verantwortlich ist. Dabei ist gerade die Bildung von Amadori-Verbindungen aus freien Zuckern und körpereigenen Proteinen und deren oxidativer Abbau von besonderem Interesse.

Der oxidative Abbau von Amadori-Verbindungen scheint - ähnlich wie die Bildung der beiden Desoxyosone - über zwei verschiedene Reaktionsmechanismen zu verlaufen.

Zum einen kann es über die Endiolform als Zwischenstufe zu einer oxidativen Spaltung kommen, die zur Bildung von Glykonsäuren und oxidierten Resten der Amadori-Verbindung wie dem N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML s. 1.1.4.2) führt.

Alternativ dazu kann die Autoxidation auch über die Enaminolform der Amadori-Verbindung verlaufen, was die Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zur Folge hat (1.1.4.1).

Bei beiden Reaktionswegen bilden sich parallel sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*: O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, HO•), die zur Schädigung von Proteinen unter oxidativem Streß fähig sind [20].

#### 1.1.4.1 Die Bildung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen über die Autoxidation der Amadori-Verbindung

Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen unter Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen wurde maßgeblich von Kawakishi et al. [21] untersucht. Der oxidative Abbau der Amadori-Verbindungen stellt demnach einen Weg für die Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen dar, der in Konkurrenz zu den 1,2- und 2,3-Enolisierungsreaktionen steht, die ihrerseits zu Dicarbonylen - nämlich den Desoxyosonen - führen. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen stellt das Glucoson das Hauptprodukt des Abbaus dar, während die Desoxyosone in diesem Fall in den Hintergrund gedrängt werden. Dabei gelang Kawakishi der Nachweis des Glucosons sowohl direkt in den Reaktionsgemischen als auch in Form des abgefangenen Chinoxalinderivates.

Bei der Autoxidation der Amadori-Verbindungen handelt es sich um eine Reaktion, die unter Metall-Katalyse bevorzugt abläuft. Kawakishi postulierte einen radikalischen Reaktionsmechanismus, der von der Enaminolform der Amadori-Verbindung ausgeht.

Auf diesem Reaktionsweg bildet sich aus diesem Enaminol eine radikalische Zwischenstufe, dessen ungepaartes Elektron über ein mesomeres System stabilisiert wird (Abbildung 9). Letztlich bilden sich aus den Amadori-Verbindungen die korrespondierenden Glykosone und parallel dazu das Superoxidradikal, als typische ROS (Abbildung 8).

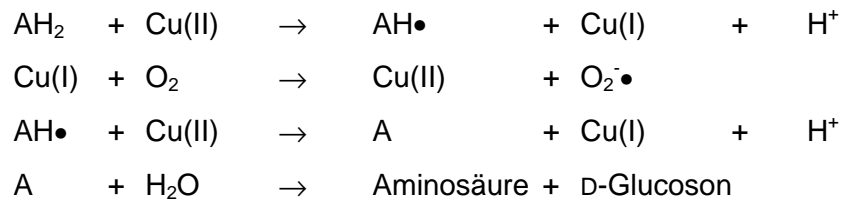


Abbildung 8: Allgemeines Schema für die radikalische Autoxidation von Amadori-Verbindungen (AH<sub>2</sub>)

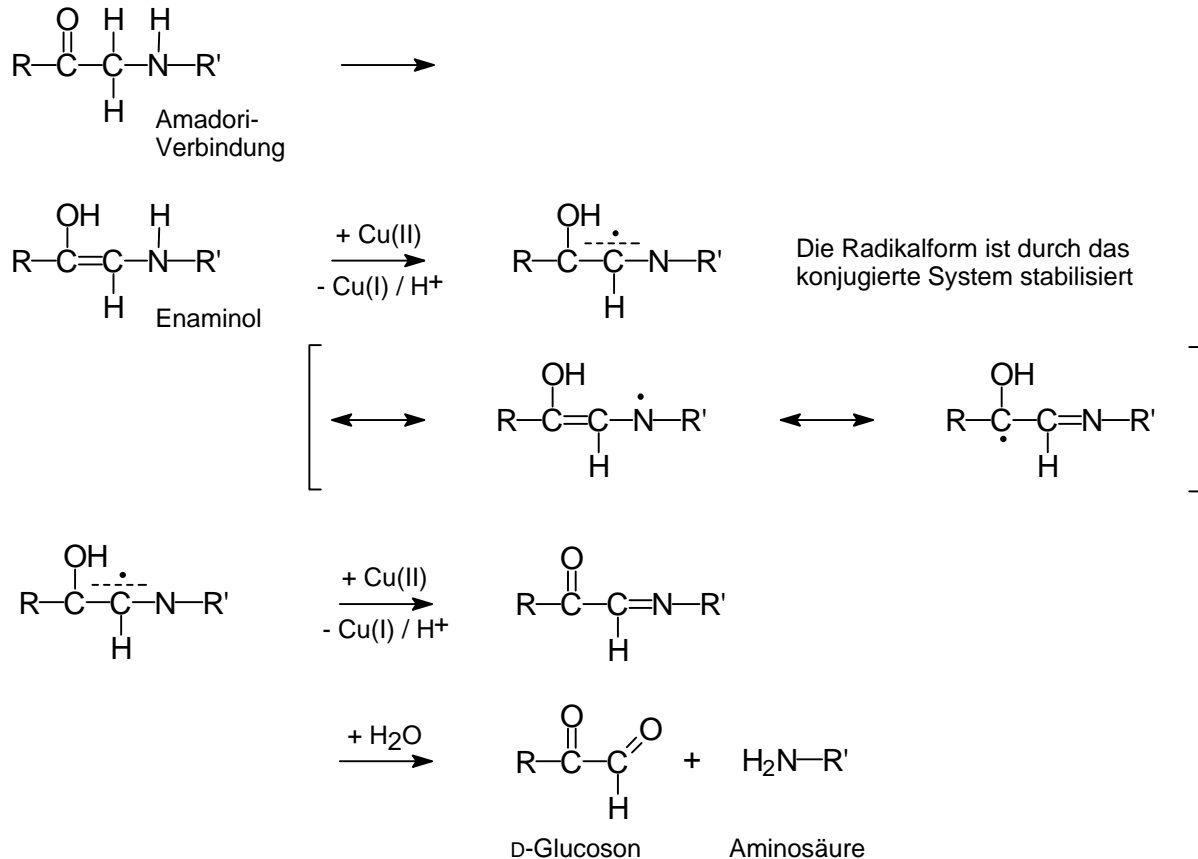


Abbildung 9: Bildungsweg des D-Glucosons über den radikalischen Abbau von Amadori-Verbindungen (in Anlehnung an [22])

In Reaktionsgemischen mit Fructose- $\beta$ -Alanin wurden unter physiologischen Bedingungen (pH 7,2, 40 °C) bei Anwesenheit von Kupferionen innerhalb von 24 Stunden 88 % der Amadori-Verbindung zum D-Glucoson umgesetzt. Bei Abwesenheit von Kupferionen wird das D-Glucoson hingegen kaum gebildet [21]. Der Einfluß der Metall-Katalyse konnte ebenfalls durch den Einsatz von Chelatkomplexbildnern (z. B.: EDTA) zu den Modellen gezeigt werden. Bei Anwesenheit von Komplexbildnern wird der oxidative Abbau stark gebremst.

Bei den über die Autoxidation von Amadori-Verbindungen entstehenden Produkten handelt es sich um Substanzen, die in der Lage sind, Proteine oxidativ zu schädigen. Das durch die Metall-Katalyse entstandene Superoxidradikal kann über Reaktionen vom *Haber-Weiss*-Typ zu Wasserstoffperoxid und weiter zu Hydroxylradikalen umgesetzt werden, die starke oxidative Schädigungen an Körperproteinen hervorrufen können [13]. Doch nicht die ROS allein

sind für den oxidativen Streß im Verlauf der Autoxidation verantwortlich. Sowohl die ausgehende Amadori-Verbindung als auch das entstandene D-Glucoson kann unter Anwesenheit von Kupferionen Proteine angreifen. Bei der Amadori-Verbindung verläuft dies über Kupferkomplexe, die von der Enaminolform ausgebildet werden - diese Komplexe stellen auch den ersten Schritt auf dem Wege der oxidativen Glucoson-Bildung dar. Bei dem D-Glucoson bilden sich analog dazu Kupferkomplexe mit der Endiolform aus, die in der Lage sind, Proteine zu oxidieren bzw. zu spalten [23][24]. In Systemen, in denen die Bildung der ROS durch geeignete Reagenzien (Superoxid-Dismutase, Mannit als Hydroxylradikalfänger) unterdrückt wird, kommt es so durch die Radikale der Amadori-Verbindung trotzdem zu Schädigungen. Parallel dazu steigt der Gehalt an D-Glucoson; dies ist ein Indiz für die Autoxidation der Amadori-Verbindung und die Bedeutung dieser  $\alpha$ -Dicarbonylverbindung als wichtiges reaktives Zwischenprodukt der Maillard-Reaktion unter oxidativen Bedingungen.

Die Bildung des Glucosons im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung spielt jedoch nicht nur unter physiologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle. Wittmann [25] konnte in Maillard-Reaktionsgemischen und bei der präparativen Darstellung des 3-Desoxyosons das Glucoson als Minorkomponente nachweisen. War es ihm damals noch nicht möglich, die Struktur der von ihm als U2 bezeichneten Substanz abzusichern, so steht heute durch Vergleich der von ihm angefertigten Massenspektren außer Frage, daß es sich bei der von ihm isolierten Verbindung um das Glucoson handelt [26].

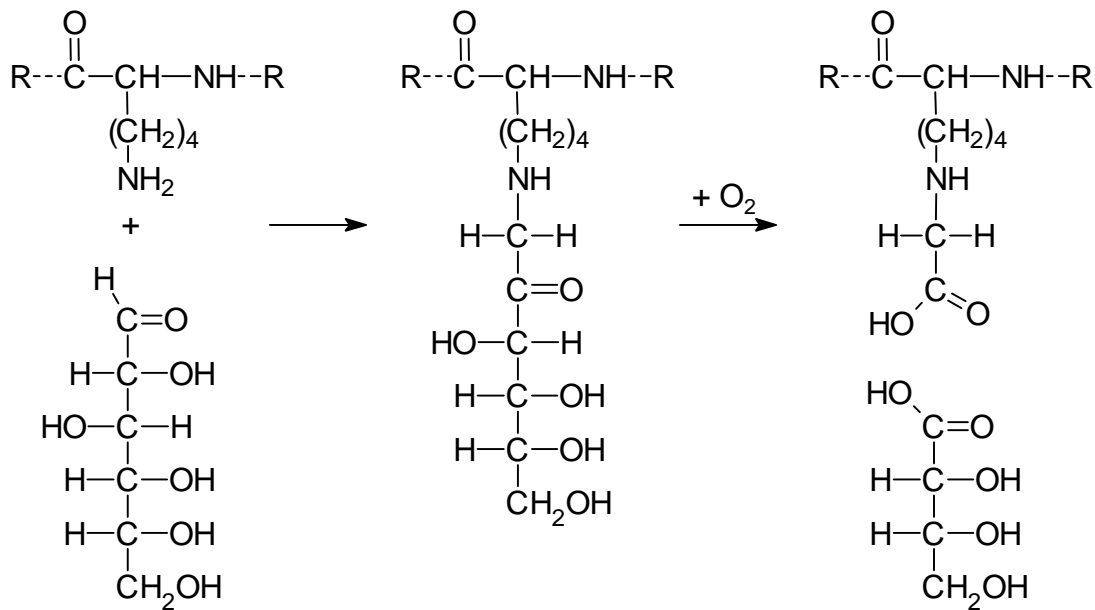
Mit der Bildung des Glucosons als oxidatives Abbauprodukt muß in allen lebensmittelchemischen und technologischen Prozessen, in denen die Maillard-Reaktion abläuft, gerechnet werden.

#### 1.1.4.2 Die Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (*Nonenzymatic Glycosylation*)

Die Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) als Abbauprodukt von Fructose-N<sup>ε</sup>-Lysin wurde erstmals von Ahmed et al. [15] beschrieben. Bei der Bildung von CML handelt es sich um einen oxidativen Spaltprozeß von Amadori-Verbindungen. Als weiteres Spaltprodukt konnte die Erythronsäure identifiziert werden. Bei dem Reaktionsmechanismus bildet sich in einem ersten Schritt aus freien Zuckern mit der endständigen Aminogruppe des proteingebundenen Lysins die entsprechende Amadori-Verbindung; ein Vorgang, der in der Literatur als *nonenzymatic glycosylation* bezeichnet wird. Schließlich kommt es zu einer oxidativen Spaltung der N<sup>ε</sup>-Lysin-Amadori-Verbindung (Abbildung 10). Offensichtlich verläuft auch hier die Spaltung über die Endiolform der Amadori-Verbindung. Dabei ist die Bildung von CML abhängig vom Sauerstoffgehalt des Systems; unter Sauerstoffausschluß bildet sich das CML und die Erythronsäure nicht mehr. Des weiteren scheint die Bildung von CML auch von Metallionen abhängig zu sein. So steigt die Bildungsrate bei der Anwesenheit von Eisenionen deutlich an. Die Bildung von CML ist pH-abhängig und steigt mit zunehmendem pH-



Wert an. Mit steigender Temperatur nimmt anfänglich auch die Bildungsrate des CMLs zu. Im weiteren Verlauf der Reaktion bilden sich dann bei höheren Temperaturen (> 50 °C) geringere Gehalte, da es hier offensichtlich zu temperaturabhängigen Konkurrenzreaktionen kommt, die zur Bildung von Melanoidinen führen. Ahmed et al. gelang ebenfalls der Nachweis von 3-(N<sup>ε</sup>-Lysino)-Milchsäure (Lysino lactic acid: LL), das im Vergleich zum CML um ein Kohlenstoffatom längere Spaltprodukt des Fructose-N<sup>ε</sup>-Lysins - folgerichtig konnte dazu parallel die Glycerinsäure als Spaltrest nachgewiesen werden.



**Abbildung 10: Bildung von CML und Erythronsäure durch oxidative Spaltung der N<sup>ε</sup>-Lysin-Amadori-Verbindung**

Von besonderer Bedeutung ist die Bildung von CML und LL in vivo. So konnte sowohl CML als auch die Erythronsäure in menschlichem Urin als auch in verschiedenen Körperproteinen nachgewiesen werden. Unklar ist jedoch noch, welcher freie Zucker in biologischen Systemen über die Zwischenstufe der N<sup>ε</sup>-Lysin-Amadori-Verbindung für die Bildung von CML verantwortlich ist. Mit dem N<sup>ε</sup>-Carboxymethylguanosid (CMG) konnte aus Modellen, die Glucose und Guanosen enthielten, eine zum CML analoge Verbindung isoliert werden [27]. Dies zeigt die mögliche Schädigung von DNA durch Glucose und andere reduzierende Zucker unter oxidativem Streß.

### 1.1.5 Weitere oxidative Prozesse im Verlauf der Maillard-Reaktion

Neben der direkten Autoxidation von Amadori-Verbindungen konnten im Verlauf der Maillard-Reaktion noch weitere oxidative Prozesse nachgewiesen werden, die jeweils auch über radikalische Zwischenstufen verlaufen. Auch hier werden die einzelnen Reaktionsmechanismen im Bezug auf ihre Relevanz für die Schädigung von Körperproteinen diskutiert.

### 1.1.5.1 Die Autoxidation von reduzierenden Zuckern und die autoxidative Glykosylierung (*Autoxidative Glycosylation*)

Die Autoxidation von reduzierenden Zuckern ist ein weiterer oxidativer Prozeß, der unter geeigneten Reaktionsbedingungen parallel zu der Maillard-Reaktion ablaufen kann. Bei der Autoxidation von Monosacchariden handelt es sich um eine metall-katalysierte Reaktion, die über eine radikalische Zwischenstufe verläuft. Aus dieser Zwischenstufe bilden sich  $\alpha$ -Ketoaldehyde und Wasserstoffperoxid, die allesamt in der Lage sind, als sehr reaktive Verbindungen körpereigenes Protein oder DNA zu schädigen. Während der unspezifische Nachweis von  $\alpha$ -Dicarbonylstrukturen und Wasserstoffperoxid in vitro bereits gelang, herrscht immer noch Unklarheit über die Natur der radikalischen Zwischenstufe [13]. Sicher ist, daß es sich bei der Autoxidation von Glucose - als typisches Monosaccharid - um einen metallkatalysierten Prozeß handelt.

Das erstmals von Wolff et al. [28] vorgeschlagene Reaktionsschema geht davon aus, daß Glucose und andere  $\alpha$ -Hydroxyaldehyde bzw.  $\alpha$ -Hydroxyketone über ihre Endiolform zu den entsprechenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen oxidiert werden (Abbildung 11). So kommt es über eine radikalische Zwischenstufe zur Bildung der reaktiven Glykosone und der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Wolff konnte nachweisen, daß sowohl die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als auch die ROS in der Lage sind, Proteine zu schädigen. Ein Vorgang, der in Abgrenzung zur klassischen *nonenzymatic glycosylation* als *autoxidative glycosylation* bezeichnet wird.

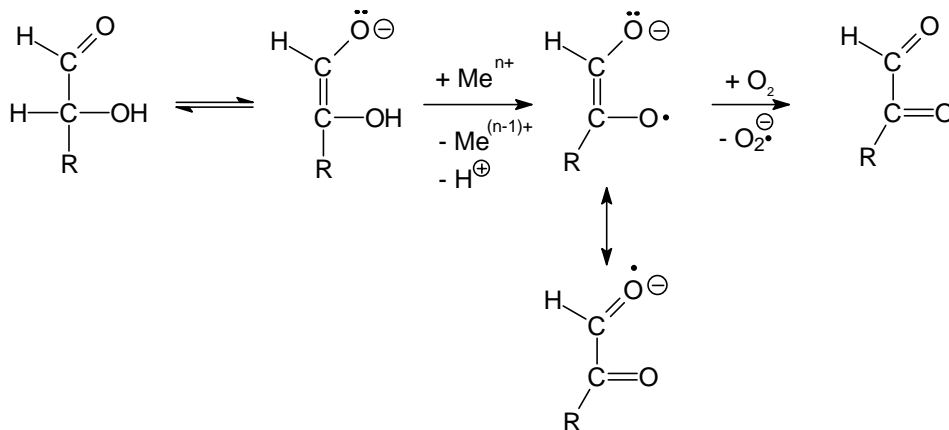


Abbildung 11: Autoxidation von reduzierenden Zuckern (nach [13])

Aus dem Reaktionsschema nach Wolff et al. geht hervor, daß bei der Autoxidation der Glucose das Glucoson als relevante  $\alpha$ -Dicarbonylverbindung entsteht. Baynes et al. [29] konnten das Glucoson jedoch nicht während der Glucose-Autoxidation nachweisen. Ihre Untersuchungen ergaben, daß sich Glyoxal als Dicarbonylverbindung bildet; parallel kommt es in den Ansätzen zur Bildung von Arabinose. Gleichzeitig schließen sie die Möglichkeit aus, daß das Glyoxal hierbei direkt aus zwischenzeitlich gebildetem Glucoson resultiert. Das

auf autoxidativen Wege entstandene Glyoxal stellt wiederum eine wichtige Verbindung für die Proteinmodifikation dar. So kommt es durch Quervernetzung von Proteinen mit Glyoxal ebenfalls zur Bildung von CML. Des Weiteren sind auch die auf diesem Wege entstehenden reaktiven ROS für die oxidative Schädigung von Proteinen verantwortlich.

Ein weiteres Indiz für die Bildung des Glucosons auf dem Wege der Autoxidation ergibt sich jedoch aus Untersuchungen an bestrahlten Zuckerlösungen. So stellt das Glucoson das Hauptabbauprodukt von Glucose und Fructose bei der Bestrahlung von wässrigen Zuckerlösungen dar [30][31]. Die Bildung des Glucosons resultiert vermutlich auch hier aus der Oxidation der Hexosen. Nur sind es hier nicht die katalytischen Metallionen, sondern die durch Strahlungsenergie in der Lösung entstandenen ROS, die oxidativ wirksam werden. In Tests mit Salmonella-Stämmen konnte Den Drijver et al. die Mutagenität von bestrahlten Zuckerlösungen nachweisen. Auch hier sind es die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen die zu einer Schädigung der DNA führen; analog zu den Vorgängen bei der DNA-Schädigung auf dem Weg der CMG-Bildung (1.1.4.2).

#### 1.1.5.2 Bildung von N,N'-Dialkylpyrazinkation-Radikalen in der frühen Phase der Maillard-Reaktion

Der Nachweis radikalischer Reaktionsmechanismen in der frühen Phase der Maillard-Reaktion gelang erstmals Namiki et al. [32][22]. Er konnte N,N'-Dialkylpyrazinkation-Radikale nachweisen. Die Aufklärung der Struktur der Radikale gelang durch die Auswertung der Hyperfeinstruktur von ESR-Spektren, die in erhitzten Maillard-Reaktionsgemischen aufgenommen wurden. Die Bildung dialkylierter Pyrazinkation-Radikale stellt einen alternativen Reaktionsweg dar, der vor der eigentlichen Bräunung einsetzt. Der Nachweis dieser Radikale gelang in Systemen, die Glucose und diverse Aminosäuren bzw. Amine enthielten. In Reaktionsansätzen, die die entsprechende Amadori-Verbindung enthalten, kann demgegenüber kein Pyrazinkation-Radikal nachgewiesen werden [33]. Namiki geht deshalb davon aus, daß die Radikale vor der Bildung der Amadori-Verbindungen aus den Glykosylaminen gebildet werden. Die Bildung der Pyrazinkation-Radikale zeigt eine deutliche pH-Wert-Abhängigkeit. Sie setzt im neutralen Bereich ein und durchläuft bei einem pH-Wert von 11 ein Maximum. Somit läuft sie parallel zur Bräunung bevorzugt im alkalischen Bereich ab - ihre Bedeutung für die Bildung von Melanoidinen wird deshalb immer wieder diskutiert [34].

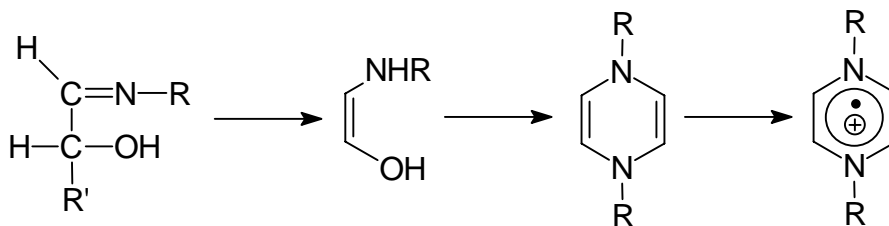


Abbildung 12: Bildung von N,N'-Dialkylpyrazinkation-Radikalen aus Glykosylaminen

Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus für die Bildung der Pyrazinkation-Radikale geht von der Schiff'schen Base als Ausgangsverbindung aus (Abbildung 12). Die Schiff'sche Base durchläuft eine Retroaldol-Reaktion, wodurch sie gespalten wird und ein Enaminol mit dem Gerüst aus zwei Kohlenstoffatomen entsteht. Zwei dieser Enaminole können dann direkt zu N,N'-disubstituierten Pyrazinderivaten und weiter zu Pyrazinkation-Radikalen reagieren. Alternativ dazu kann auch der eingesetzte Zucker direkt eine Retroaldol-Reaktion durchlaufen und das entstehende Spaltprodukt (Glycolaldehyd) mit einer Aminosäure zum Enaminol reagieren [35]. Auszuschließen ist hingegen, daß die Amadori-Verbindung in ihrer Enaminolform eine Ausgangsverbindung für die Bildung des Radikals darstellt. Folgerichtig gelingt der Nachweis der Radikale beim Erhitzen von Maillard-Reaktionsgemischen in den ersten Minuten, noch bevor die Bildung der Amadori-Verbindungen und der Desoxyosone ihr Maximum erreicht hat und deutlich vor der einsetzenden Bräunung. Mit dem Anstieg der Bräunung können dann andere Radikale mit einem breiteren ESR-Spektrum nachgewiesen werden, die von radikalischen Strukturen bei der Melanoidin-Bildung herrühren. Mit dem 1,4-Bis(5-amino-5-carboxy-1-pentyl)pyrazinradikal-Kation (CROSSPY) gelang Hofmann et al. der Nachweis solcher Radikale bei der Bildung der Melanoidine [36]. Das CROSSPY stellt hierbei eine neue Art der Quervernetzung von Proteinen in vivo und in lebensmittelchemischen Prozessen dar. Proteingebundenes CROSSPY konnte über die ESR-Spektroskopie sowohl in Modellen mit Rinderserum-Albumin (bsa) als auch in braunen Brotkrusten nachgewiesen werden. Der Bildungsweg von CROSSPY läuft vermutlich auch unter Beteiligung von Glycolaldehyd ab, welcher mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe von proteingebundenem Lysin reagiert.

## **1.1.6 Weiterführende Reaktionswege unter Beteiligung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen**

### **1.1.6.1 Die Retroaldol-Reaktion von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen und Amadori-Verbindungen**

Wichtige Folgereaktionen der Amadori-Verbindungen, aber auch der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen sind die Retroaldol-Reaktionen, die mit den Enolisierungsreaktionen einhergehen [13][37]. Durch diese unspezifischen Reaktionen entstehen eine Vielzahl unterschiedlicher C<sub>2</sub> - C<sub>4</sub>-Spaltprodukte, die über  $\alpha$ -Dicarbonyl- oder  $\alpha$ -Hydroxycarbonyl-Strukturen verfügen (Abbildung 13)[38].

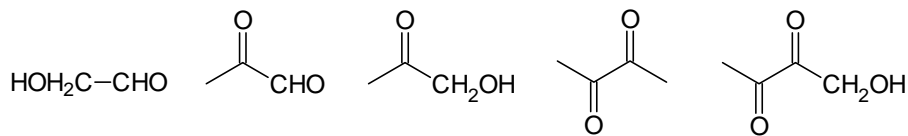


Abbildung 13: Typische Folgeprodukte der Retroaldol-Reaktionen

Die Spaltprodukte selbst sind sehr reaktiv und können auf den verschiedensten Wegen weiter reagieren. Auch die Bildung der Pyrazinkation-Radikale beginnt mit der Spaltung der Glykosylamine im Sinne einer Retroaldol-Reaktion (1.1.5.2).

### 1.1.6.2 Der Strecker-Abbau von Aminosäuren

Eine wichtige Reaktion in Maillard-Reaktionsgemischen, an der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beteiligt sind, ist der Strecker-Abbau von Aminosäuren. In einem ersten Schritt bildet sich aus der Kondensationsreaktion der Aminosäure mit der Dicarbonylverbindung die aza-vinyloge  $\beta$ -Ketosäure (Abbildung 14). Nach Decarboxylierung und Hydrolyse bilden sich aus dem verbleibenden Aminosäure-Rest die entsprechenden Strecker-Aldehyde, die häufig mit zum Aroma eines erhitzten Lebensmittels beitragen [6].

Als Nebenprodukt entsteht ein Enaminol, das sich an der Bildung verschiedener Heterocyclen (Pyridine, Pyrazine, Imidazole) beteiligen kann.

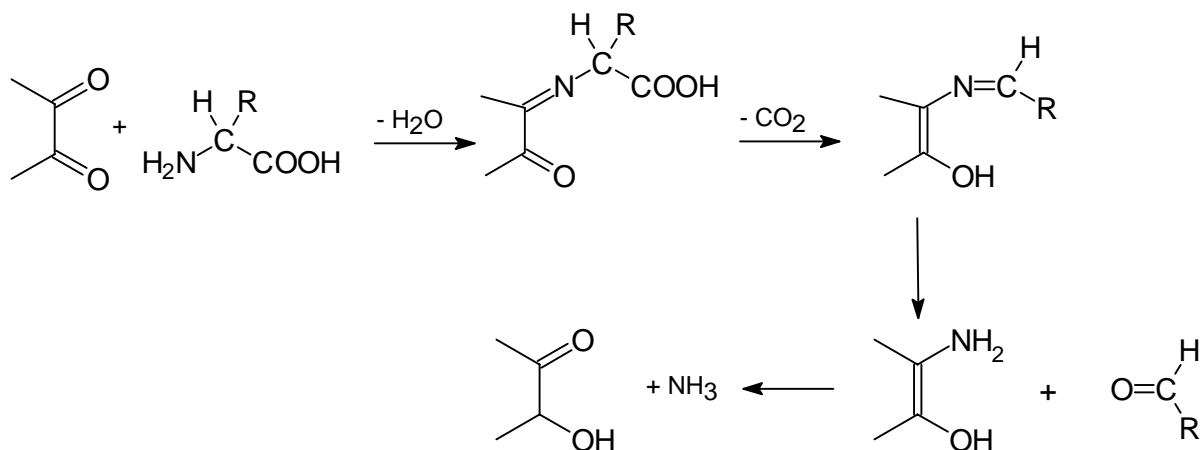


Abbildung 14: Der Strecker-Abbau von Aminosäuren mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen

### 1.1.6.3 Bildung heterocyclischer Verbindungen

Über die Selbstkondensation zweier  $\alpha$ -Aminocarbonylverbindungen bilden sich im weiteren Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung eine Vielzahl unterschiedlich substituierter Pyrazine (Abbildung 15).

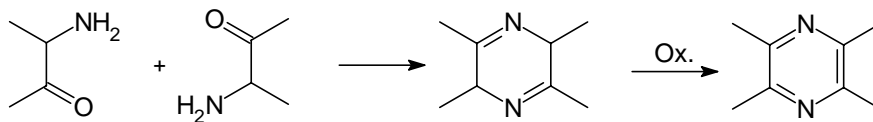


Abbildung 15: Bildung von Pyrazinen aus  $\alpha$ -Aminocarbonylverbindungen

Die  $\alpha$ -Aminocarbonylverbindungen stammen zum einen aus dem Strecker-Abbau der Aminosäuren mit den  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen. Zum anderen können sie aber auch aus der Reaktion von  $\alpha$ -Dicarbonyl- oder  $\alpha$ -Hydroxycarbonylverbindungen mit Ammoniak gebildet werden. Der Ammoniak kann dabei ebenfalls aus dem Strecker-Abbau stammen (Abbildung 16 [39][40]).

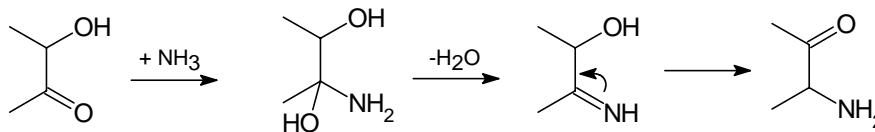


Abbildung 16: Bildung von  $\alpha$ -Aminocarbonylverbindungen

#### 1.1.6.4 Bildung von Melanoidinen

In der Endphase der Maillard-Reaktion kommt es zur Bildung braun gefärbter Verbindungen. Diese Verbindungen entstehen durch Kondensation oder Polymerisation der unterschiedlichen Zwischenstufen.

Eine genaue Identifizierung dieser als Melanoidine bezeichneten Verbindungen in Lebensmitteln ist bisher aufgrund der Vielzahl der möglichen Strukturen nicht möglich gewesen. Als Strukturelemente zu erwarten sind unterschiedliche Heterocyklen wie Pyrrole, Imidazole, Pyranone und Furanone [4][6]. Einige dieser Strukturen konnten aus geeigneten Modellsystemen isoliert werden [41][42]. Dabei handelt es sich allerdings um die relativ kleinen Premelanoidine, die über ein Ringsystem von zwei bis vier polymerisierten Heterocyklen verfügen. Eine Charakterisierung oder Identifizierung der hochmolekularen Melanoidine gelang bisher noch nicht.

## 1.2 Problemstellung und Zielsetzung

Seit Maillard 1912 als erster Untersuchungen zur nicht-enzymatischen Bräunung durchführte, wird sie von einer großen Anzahl von Arbeitsgruppen mit dem Ziel ihrer Aufklärung erforscht. Wenn diese Namensreaktion auch nur wenigen Chemikern geläufig ist, so spielt sie im Bereich der Lebensmittelchemie und der Lebensmitteltechnologie eine zentrale Rolle. Die auch als Maillard-Reaktion bezeichnete nicht-enzymatische Bräunung ist jedem Lebensmitteltechnologe bekannt und spielt bei vielen technologischen Zubereitungen von

Lebensmitteln eine große Rolle. Aber auch die Hausfrau kommt meist unbewußt tagtäglich mit der Maillard-Reaktion beim Kochen und Backen in Berührung.

Die nicht-enzymatische Bräunung beeinflusst bei vielen küchentechnischen und lebensmitteltechnologischen Prozessen die Farbe, das Aroma und den Geschmack des Endproduktes. Gerade im Bereich der Lebensmitteltechnologie sind dies Merkmale, die entscheidend für die Qualität und somit auch für den Erfolg eines Produktes sind.

Ein Problem ergibt sich aus der Vielzahl der Reaktionen, die im Verlauf der Maillard-Reaktion zu den unterschiedlichen Verbindungen führen können. So kann es sowohl zu erwünschten als auch zu unerwünschten Folgeprodukten kommen. Ein Ziel der Lebensmittelchemie bzw. Lebensmitteltechnologie ist es deshalb, den Verlauf der Maillard-Reaktion durch die Wahl geeigneter Ausgangsstoffe und geeigneter Reaktionsbedingungen so zu steuern, daß nur erwünschte Verbindungen entstehen bzw. die Bildung unerwünschter Verbindungen vermieden oder minimiert wird. Möglich ist eine solche Steuerung durch den prozeßbegleitenden Nachweis von sogenannten Markersubstanzen, die spezifisch auf einem Reaktionsweg der Maillard-Reaktion entstehen und so Aussagen über ihren Verlauf während des untersuchten Prozesses erlauben.

### ***$\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Markersubstanzen***

Bei den eigenen Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk auf der Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori-Verbindungen. Um Aussagen über die Bildungsrate der sehr reaktiven Verbindungen machen zu können, sollte die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin ausgenutzt werden, mit der es möglich ist, die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Form ihrer stabilen Chinoxalinderivate abzufangen und deren Gehalt zu quantifizieren. Die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen können so direkt nachgewiesen werden und man muß nicht über den Umweg von aus diesen Verbindungen in weiteren Reaktionsfolgen gebildeten Markersubstanzen (HMF, DHM) gehen, um Aussagen über die beiden Enolisierungsreaktionen der Amadori-Verbindung machen zu können. Zur Bestimmung der Chinoxaline in den Modellen mußte eine geeignete analytische Methode entwickelt werden. Ebenso mußten die einzelnen Chinoxaline präparativ dargestellt werden, um Vergleichssubstanzen für die Identifizierung und Quantifizierung zu erhalten.

### ***Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen***

Untersucht werden sollte das Abbauverhalten von Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen an geeigneten Modellsystemen. Als Ausgangsverbindung sollte Fructose-Alanin als Amadori-Verbindung der Glucose mit der Aminosäure Alanin eingesetzt werden. Andere Arbeitsgruppen benutzen häufig Amadori-Verbindungen mit Piperidin als Aminokomponente, da dieses Umlagerungsprodukt relativ leicht herzustellen ist. Bei den eigenen Untersuchungen sollte durch die Wahl des Fructose-Alanins als Amadori-

Verbindung, die auch in Lebensmitteln vorkommt, die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Modelle auf reale Proben erhöht werden. Durch den Vergleich mit Modellen, die reduzierende Zucker mit der korrespondierenden Aminosäure enthalten, sollte die Bedeutung der Amadori-Verbindung für die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen untersucht werden.

Von besonderem Interesse war die Abhängigkeit der Bildungsraten der einzelnen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen vom pH-Wert des Systems. Daneben sollte die Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden.

### ***Wasserarme Systeme***

Da die Amadori-Verbindungen in wasserarmen Systemen eine hohe Stabilität aufweisen, spielen sie vor allem bei der Trocknung von Lebensmitteln eine große Rolle. Deshalb sollten die Abhängigkeiten der Bildungswege der einzelnen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen von den Reaktionsbedingungen auch an wasserarmen Modellen untersucht werden. Auch hier war die Abhängigkeit der Bildungswege vom pH-Wert von besonderem Interesse. In den wasserarmen Systemen sollte aber vor allem die Abhängigkeit von der Wasseraktivität untersucht werden.

### ***Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen***

Die radikalische Bildung des Glucosons beim autoxidativen Abbau von Amadori-Verbindungen wurde von Kawakishi [21] postuliert. Die eigenen Untersuchungen sollten aufklären, ob der Abbau der Amadori-Verbindungen zum Glucoson tatsächlich über eine radikalische Zwischenstufe verläuft. Dazu wurde die Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie eingesetzt. Diese für Radikale hochspezifische Meßmethode sollte an wässrigen Systemen angewendet werden, die die Amadori-Verbindung als Ausgangssubstanz enthielten.

Die Bildung des Glucosons läuft bei Anwesenheit von Kupferionen bevorzugt ab. Deshalb sollte die Abhängigkeit der Bildung des Glucosons von der Kupferionenkonzentration untersucht werden. Da Schwermetallspuren in realen Proben häufig komplexgebunden vorliegen, sollte dabei auch geklärt werden, inwieweit unterschiedliche Komplexierungsreagenzien die Kupfer-Katalyse beeinflussen.

Bei all diesen Untersuchungen sollte die Bildung der Desoxyosone über die Enolisierungsreaktionen und die Bildung des Glucosons über den radikalischen Abbauweg jedoch nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Es sollte vielmehr geklärt werden, ob die Autoxidation einen Reaktionsweg darstellt, der parallel zu den Enolisierungsreaktionen abläuft, oder ob es in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen zu einer direkten Konkurrenz zwischen den unterschiedlichen Abbauwegen der Amadori-Verbindung kommt, die zu einer Verschiebung der Bildungsraten der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen führt.



***Untersuchungen an lebensmitteltechnologischen Prozessen***

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Modellsysteme auf reale Lebensmittel zu verifizieren, sollte an Hand eines lebensmitteltechnologischen Prozesses die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen auch in realen Proben exemplarisch untersucht werden. Prozeßbegleitend wurde die Würzebereitung bei der Bierherstellung untersucht, da hier die Maillard-Reaktion und damit die Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen und Reduktonen eine große Rolle spielen. Zur Analytik der einzelnen Stufen des Brauprozesses mußte eine Methode zur Isolierung und Anreicherung der  $\alpha$ -Dicarbonyle in Form ihrer Chinoxaline entwickelt werden.

## 2 Analytische und präparative Arbeitsweisen

### 2.1 Analytik und Untersuchungsmethoden

Bei der nicht-enzymatischen Bräunung handelt es sich um eine komplexe Folge unterschiedlicher Reaktionsmechanismen. Abhängig von den gewählten Reaktionsbedingungen können unterschiedliche Reaktionswege beschrieben werden, die zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Produkten führen. Die analytischen Methoden zur Untersuchung der Maillard-Reaktion sind deshalb ebenso vielseitig wie die Funktionalitäten dieser Produkte. Bei der Untersuchung zur nicht-enzymatischen Bräunung in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen bedient man sich häufig sogenannter Markersubstanzen. Hierbei handelt es sich um Verbindungen, die typische Produkte der einzelnen Reaktionswege darstellen. Über den Gehalt dieser Markersubstanzen in Reaktionsgemischen und in realen Lebensmittelproben kann man dann Rückschlüsse auf die Reaktionswege ziehen, die zu diesen Verbindungen führen und auch auf deren Reaktionsbedingungen.

Typische Markersubstanzen bei den Untersuchungen zur nicht-enzymatischen Bräunung sind zum Beispiel das 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) und das 2,3-Dihydro-3-hydroxymaltol (DHM), die beide über die unterschiedlichen Enolisierungsreaktionen der Amadori-Verbindungen gebildet werden. Auch die Bildungsraten anderer heterocyclischer Verbindungen, wie die der Pyrazine oder der Furanderivate, werden häufig zur Bewertung der Maillard-Reaktion untersucht.

Weitere Markersubstanzen stellen Carbonylverbindungen dar, die einerseits beim Abbau der Zuckerkomponente, andererseits beim Strecker-Abbau von Aminosäuren entstehen können. Bei den kürzerkettigen Zuckerabbauprodukten und den Strecker-Abbauprodukten von Aminosäuren handelt es sich meist um relativ flüchtige Substanzen, die häufig zum erhitzenbedingten Aroma bzw. Fehl aroma von Lebensmitteln beitragen. Die Analytik dieser Verbindungen ist dementsprechend relativ einfach, wobei allerdings die Komplexität der vorliegenden natürlichen Matrix die Bestimmung einzelner Verbindungen erschweren kann [43][44].

Ein Problem ergibt sich jedoch bei der Wahl wirklich spezifischer Markersubstanzen daraus, daß eine einzelne Verbindung in einem Maillard-Reaktionsgemisch über unterschiedliche Reaktionswege oder aus unterschiedlichen Edukten gebildet werden kann. So kann zum Beispiel das HMF sowohl über die 1,2-Enolisierung der Amadori-Verbindung als auch aus reduzierenden Zuckern direkt gebildet werden. In diesem Fall kann der Nachweis von HMF allein noch keine Aussagen über den vorausgegangenen Bildungsweg machen.

In den eigenen Untersuchungen sollte das Hauptaugenmerk auf den unterschiedlichen Abbauwegen von Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen liegen. Die unterschiedlichen Reaktionswege sollten aber nicht anhand von in Folgereaktionen

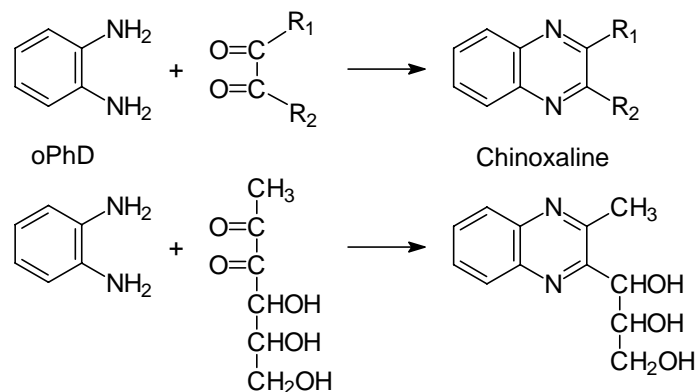
gebildeten Produkten - wie dem HMF oder dem DHM - untersucht werden. Auf den unterschiedlichen Abbauwegen bilden sich in einem ersten Schritt direkt die Desoxyosone bzw. die Glykosone, die noch über das Kohlenstoffgerüst der Zuckerkomponente verfügen. Deswegen ermöglicht ihre Bestimmung in Maillard-Reaktionsgemischen einen direkten, spezifischen Nachweis des jeweiligen Abbauwegs der Amadori-Verbindung, da sie nicht wie die kürzerkettigen Carbonylverbindungen über alternative Reaktionsmechanismen gebildet werden können.

### 2.1.1 Die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin

Bei den beim Abbau von Amadori-Verbindungen gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen handelt es sich um sehr reaktive Verbindungen, deren Bildung nur schwer zu quantifizieren ist, da sie im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung schnell weiter reagieren.

Eine geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung dieser  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen stellt die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (oPhD) dar. So gelang Ledl [18] durch den Einsatz von oPhD 1988 erstmals der Nachweis des 1-Desoxyosons in Maillard-Reaktionsgemischen. Kawakishi [45] konnte die Bildung des Glucosons beim oxidativen Abbau von Amadori-Verbindungen in Anwesenheit von oPhD quantifizieren.

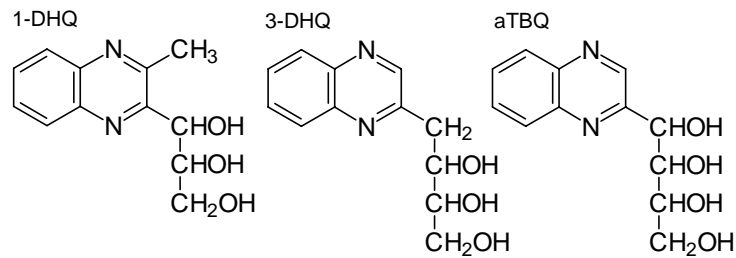
In der Abfangreaktion mit oPhD können grundsätzlich sämtliche Verbindungen mit einer  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur zu den entsprechenden Chinoxalinderivaten umgesetzt werden (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Bildung von Chinoxalinen aus  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit o-Phenylendiamin (oPhD). Bildung des 1-Desoxyoson-chinoxalins (unten).**

In den Maillard-Reaktionsgemischen reagieren dementsprechend die entstehenden Desoxyosone und das Glucoson quantitativ mit dem oPhD. Dargestellt ist das in Abbildung 17 für das 1-Desoxyoson, das so zu dem 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin (1-DHQ) umgesetzt wird.

Analog bildet sich aus dem 3-Desoxyoson das 2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl)-chinoxalin (3-DHQ) und aus dem Glucoson das D-*arabino*-Hexos-2-ulose-chinoxalin (D-*arabino*-Tetrahydroxybutyl-chinoxalin, aTBQ)(Abbildung 18).



**Abbildung 18: Chinoxalinderivate des 1-Desoxyosons (1-DHQ), des 3-Desoxyosons (3-DHQ) und des D-Glucosons (aTBQ)**

Diese Chinoxaline sind bei den untersuchten Reaktionsbedingungen sehr stabil, so daß über die gesamte Erhitzungsdauer nicht mit einem Abbau der Derivate in den Modellen zu rechnen ist. Der zu einem beliebigen Zeitpunkt bestimmte Gehalt an Chinoxalinderivaten entspricht somit der Summe der während der Erhitzungsdauer gebildeten Chinoxaline bzw. der entsprechenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bei den gegebenen Reaktionsbedingungen.

Bei der Abfangreaktion mit oPhD stellt sich allerdings immer die Frage, inwieweit das oPhD die Bildung der einzelnen Abbauprodukte katalysiert oder sogar induziert und ob es sich bei den nachgewiesenen Chinoxalinen um Artefakte handelt. Gerade bei Untersuchungen in Maillard-Reaktionsgemischen ist dies von großer Bedeutung, da das oPhD selbst über zwei Aminogruppen verfügt, die den Abbau von reduzierenden Zuckern beschleunigen können. Eine gewisse Reaktivität im Sinne der Maillard-Reaktion kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist diese Reaktivität durch den aromatischen Rest stark herabgesetzt. So besitzt das oPhD eine deutlich geringere Reaktivität gegenüber Carbonylgruppen als aliphatische Amine oder Aminosäuren [46].

In eigenen Vorversuchen wurde deshalb Fructose-Alanin als Ausgangsverbindung mit unterschiedlichen Konzentrationen an oPhD versetzt und der Abbau der Amadori-Verbindung beobachtet (80 °C, 2 h). Die Konzentration an oPhD wurden dabei so variiert, daß das Abfangreagenz in einem zwei- bis zehnfachen molaren Überschuß vorlag. Diese Vorproben zeigten, daß der Abbau der Amadori-Verbindung bei den gegebenen Reaktionsbedingungen unabhängig von der Konzentration an oPhD ist. Bei den eigenen Untersuchungen kann deshalb davon ausgegangen werden, daß das oPhD in den Reaktionssystemen nicht als Promotor der Maillard-Reaktion wirkt, sondern nur als Abfangreagenz für die entstehenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen.

Takagi [47][48][49] setzte das oPhD ein, um die Strukturen von Stärke und anderen Glucanen aufzuklären. Unter sehr drastischen Bedingungen (pH 10,0, Kochtemperaturen)

entstehen dabei Chinoxaline kürzerkettiger Bruchstücke, die Aufschluß über Carbonylstrukturen und Verzweigungen in den zu untersuchenden Glucanen geben.

In den eigenen Reaktionsgemischen kommen teilweise ebenfalls Glucane vor. So enthalten die wasserarmen Systeme mikrokristalline Cellulose (Avicel) und die untersuchten Malze und Maischen Amylose bzw. Amylopektin als Hauptkohlenhydrat. In geeigneten Vorproben mit Stärke bzw. Avicel konnten allerdings selbst bei einem zehnfachen Überschuß an oPhD nach dem Erhitzen keine Chinoxaline nachgewiesen werden, so daß die Bildung von Artefakten auch hier ausgeschlossen werden kann.

Der Zusatz von oPhD als Abfangreagenz zu den Reaktionssystemen stellt eine einfache Methode dar, den Abbau der Amadori-Verbindungen auf der Stufe der direkt entstehenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als stabile Chinoxaline abzufangen. Diese sonst nur schwer zu analysierenden Intermediate der Maillard-Reaktion können so sehr gut quantifiziert werden.

### **2.1.2 Gaschromatographische Bestimmung von Zuckern, Amadori-Verbindungen und Chinoxalinderivaten nebeneinander**

Die eigene Problemstellung setzt den Schwerpunkt auf die Bildung von Desoxyosonen und Glykosonen, abgefangen als Chinoxalinderivate, beim Abbau von Amadori-Verbindungen im Verlauf der Maillard-Reaktion. Deswegen wurde eine Methode entwickelt, mit der es möglich ist, sowohl die Amadori-Verbindungen bzw. die korrespondierenden Zucker als Edukte als auch die Chinoxalinderivate der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen parallel nachzuweisen.

Zur Trennung und Bestimmung von Amadori-Verbindungen sind in der Literatur mehrere Methoden beschrieben. Zu erwähnen sind hier vor allem Methoden, die auf der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) beruhen. So ist es möglich, die Amadori-Verbindungen mittels HPLC an Anionenaustauschersäulen aufzutrennen und durch eine Nachsäulenderivatisierung mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) als rot gefärbtes Formazanderivat nachzuweisen [50]. Die Vorteile der HPLC, als schonende Trennmethode bei der Analytik der Intermediate der frühen Maillard-Reaktion, liegen auf der Hand. Ein Nachteil ist allerdings, daß Mono- und Disaccharide nicht ohne weiteres mitbestimmt werden können.

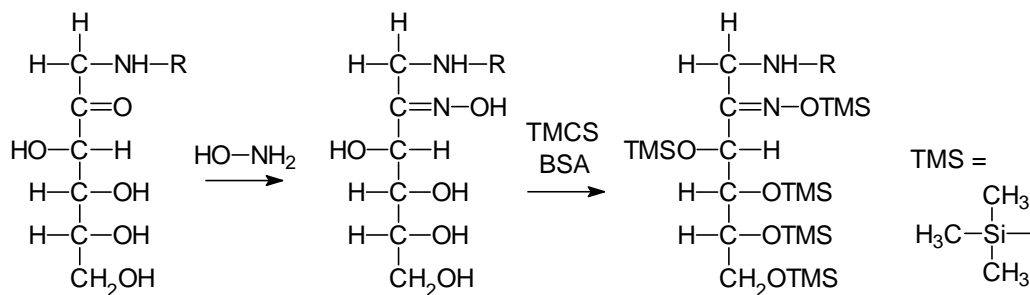
Wittmann [25] entwickelte eine Methode zur Bestimmung von Amadori-Verbindungen mittels Gaschromatographie nach Derivatisierung zu den Oximen und Trimethylsilylethern. Auch die Zucker können mit dieser Methode gleichzeitig in einem analytischen Lauf bestimmt werden.

Auch zur Bestimmung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen können grundsätzlich sowohl gaschromatographische als auch hochdruckflüssigkeitschromatographische Methoden angewendet werden.

Der direkte Nachweis des sehr reaktiven Glucosons aus Modellsystemen gelang sowohl Kawakishi [21] als auch Den Drijver [30].

Der Nachweis der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Form ihrer stabilen Chinoxalinderivate ist demgegenüber unproblematischer. Auch hier gibt es die Möglichkeit, die Chinoxaline mittels HPLC an Umkehrphasen zu bestimmen [51][52].

Ledl [53] und Kawakishi [21] wenden allerdings auch gaschromatographische Methoden an, um die Chinoxaline in Form ihrer Trimethylsilyletherderivate oder nach Acetylierung zu bestimmen. Ausgehend von diesen Trennungsverfahren wurde für die eigenen Untersuchungen eine gaschromatographische Methode entwickelt, mit der die einfache Möglichkeit besteht, sowohl Zucker und Amadori-Verbindungen als auch Chinoxalinderivate parallel in einem analytischen Lauf nachzuweisen und zu quantifizieren.



**Abbildung 19: Oximierung und Silylierung von reduzierenden Zuckern und Amadori-Verbindungen am Beispiel einer Amadori-Verbindung (R = Aminosäure-Rest)**

Die Methode basiert auf dem gaschromatographischen Nachweis von Amadori-Verbindungen nach Wittmann. Die zu analysierende Lösung wird gefriergetrocknet und der wasserfreie Rückstand in Pyridin gelöst, das Hydroxylammoniumchlorid enthält. In einem ersten Schritt werden nun alle Substanzen mit einer freien Carbonylgruppe in die Oxime überführt (Abbildung 19). Bei den untersuchten Modellen und Lebensmitteln sind das die reduzierenden Mono- und Disaccharide sowie die Amadori-Verbindungen. Die Überführung dieser Carbonylverbindungen in die Oxime hat den Vorteil, daß sich bei der anschließenden gaschromatographischen Trennung je Substanz nur zwei Peaks ergeben, die von der *syn*- und *anti*-Form des Oxims herrühren. Dabei stellt der erste Peak im Chromatogramm die *syn*-Form und der zweite die *anti*-Form des Oxims dar. Aldosen bilden aus sterischen Gründen bevorzugt die *syn*-Form des Oxims, während Ketosen beide Formen in der gleichen Größenordnung ausbilden [54][55]. Ohne die Oximierung wären je nach vorliegendem Kohlenhydrat bis zu fünf Peaks denkbar (offene Form, Pyranose und Furanose in der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Form). Die Chinoxalinderivate und die nichtreduzierenden Zucker werden in diesem Schritt natürlich nicht oximiert.

In einem zweiten Schritt werden die Oxime (Abbildung 19) und die übrigen Verbindungen wie die Chinoxaline (Abbildung 20) in die Trimethylsilyletherderivate überführt. Hierfür stehen eine Vielzahl von unterschiedlichen Silylierungsreagenzien zur Verfügung [56]. Bewährt hat sich bei den eigenen Untersuchungen eine Mischung aus N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid

(BSA) und Trimethylchlorsilan (TMCS). Bei diesem Derivatisierungsschritt werden sämtliche Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate, der Amadori-Verbindungen und der Chinoxalinderivate zu den entsprechenden Trimethylsilylethern umgesetzt.

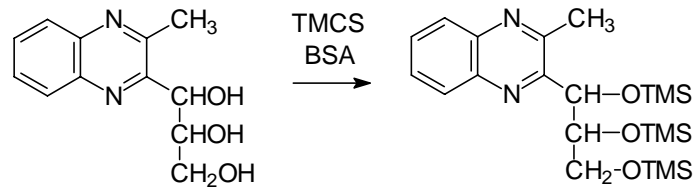


Abbildung 20: Silylierung von Chinoxalinderivaten am Beispiel des 1-Desoxyoson-chinoxalins

Die Trennung der Silylether erfolgt dann an einer Phenyl(5%)-Methyl-Polysiloxan-Phase (HP-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Sämtliche zu untersuchenden Verbindungen können in einem chromatographischen Lauf getrennt und quantifiziert werden (Abbildung 21). Das kritische Paar bei der chromatographischen Trennung stellt hierbei das 3-Desoxyoson-chinoxalin und die *syn*-Form des Fructose-Alanin-Oxims dar. Durch ein genügend langes Plateau in der Aufheizphase ergibt sich aber auch bei diesen beiden Substanzen eine ausreichende Trennung.

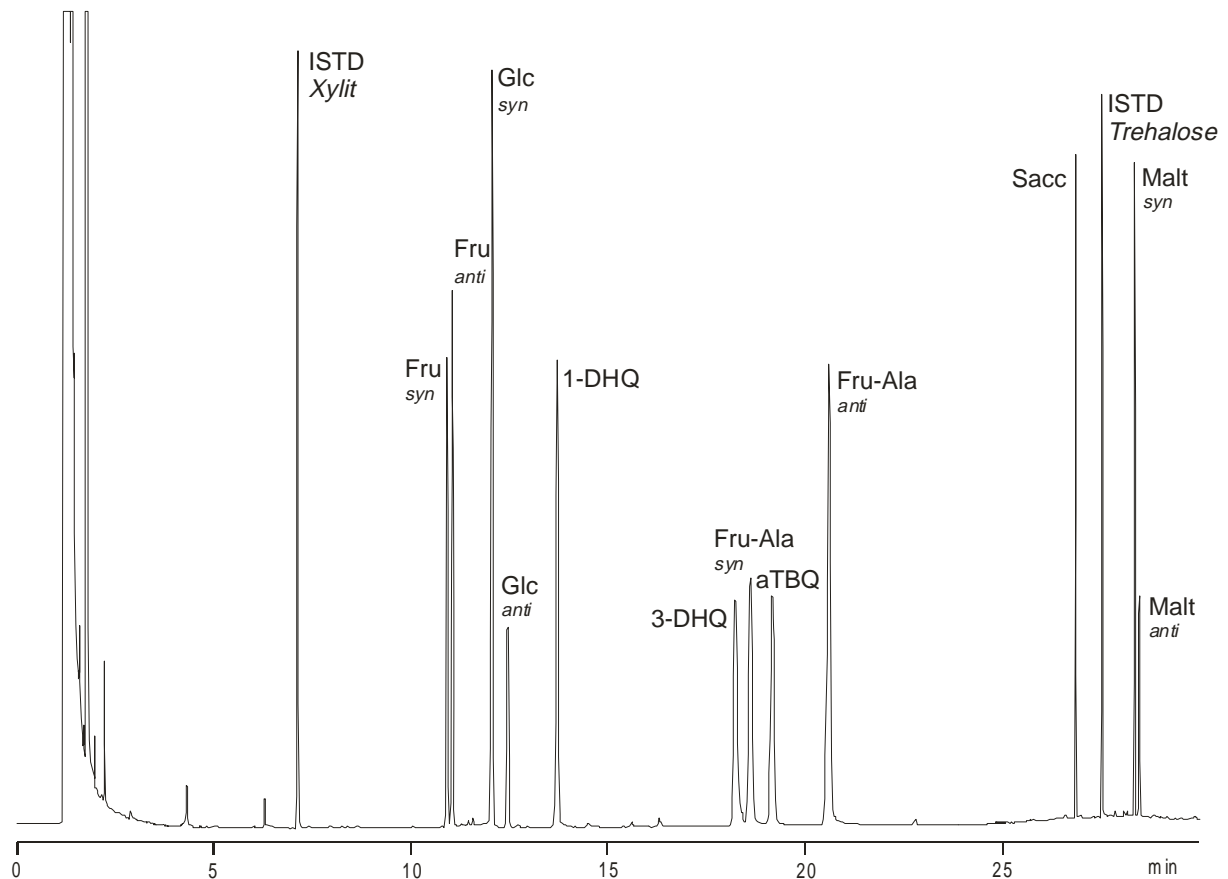
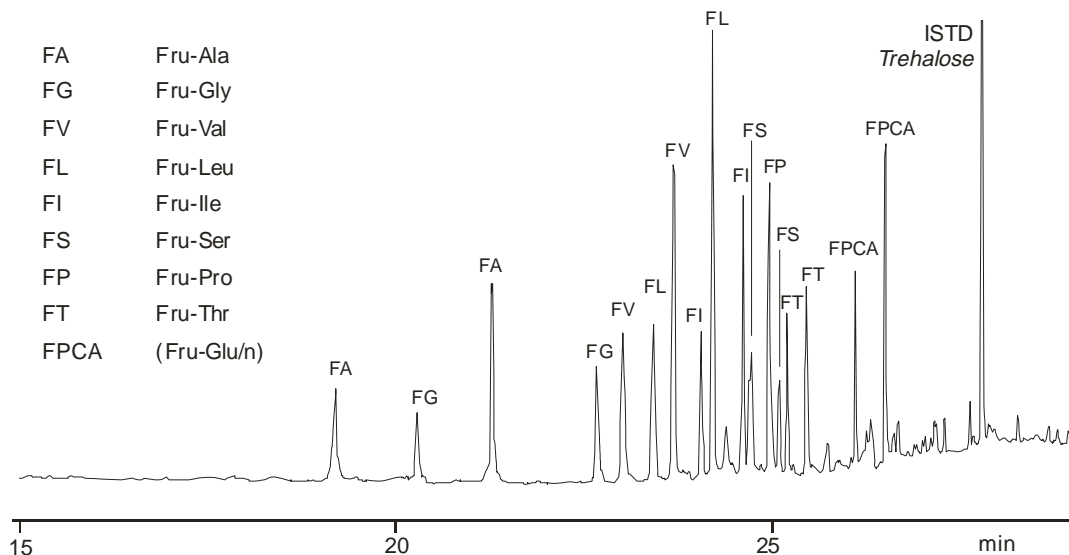


Abbildung 21: Gaschromatographische Trennung von Zuckern, Amadori-Verbindungen und den Chinoxalinderivaten nebeneinander

Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, können die Amadori-Verbindungen jeweils als Doppelpeak im Chromatogramm nachgewiesen werden. Die Trennung der einzelnen Verbindungen ist dabei auch nach der Isolierung der Amadori-Verbindungen aus realen Proben sehr gut (Abbildung 22). Neben der Möglichkeit, die Amadori-Verbindungen über die Retentionszeiten der beiden Peaks zu identifizieren, ergeben sich auch aus dem Flächenverhältnis der *syn*- und *anti*-Form zusätzliche Informationen für die Zuordnung. Im Zweifelsfall werden die Substanzen durch GC-MS-Kopplung über den Vergleich mit Präparaten der Amadori-Verbindungen identifiziert.



**Abbildung 22:** Ausschnitt aus dem Chromatogramm zur Bestimmung von Amadori-Verbindungen aus einem Malz (Abkürzungen der Amadori-Verbindungen: siehe Anhang)

Für die Fructose-Glutaminsäure und das Fructose-Glutamin erhält man bei der Oximierung und Silylierung nicht das zu erwartende Oximderivat. Die Amadori-Verbindung der Glutaminsäure bzw. des Glutamins cyclisiert bei dem Erhitzen während der Oximierung und Silylierung zur Fructose-Pyrrolidoncarbonsäure (FPCA). Bei den gewählten Derivatisierungsbedingungen ist diese Umsetzung nahezu vollständig, so daß die FPCA an Stelle der Fructose-Glutaminsäure (bzw. des Fru-Gln) bestimmt werden kann. Die FPCA stammt dabei allerdings nicht auch noch aus Erhitzungsprozessen im Lebensmittel selbst, da sie bei der Isolierung der Amadori-Verbindungen nicht mit angereichert werden kann (vergl. 2.1.3).

Ein Problem bei dieser Methode stellt die sekundäre Aminogruppe der Amadori-Verbindung dar. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen (größere Variation der Volumina, pH-Wert des Rückstands) kann es zu einer teilweisen Silylierung der Aminogruppe gerade bei Fructose-Glycin und Fructose-Alanin kommen. Da diese Silylierung nicht vollständig verläuft, können im Chromatogramm für diese Amadori-Verbindungen bis zu vier Peaks erscheinen. Dieses Problem kann jedoch bei genauer Einhaltung der Arbeitsvorschrift vermieden wer-



den. Dabei ist vor allem auf das Volumenverhältnis von Oximierungsreagenz zu Silylierungsreagenz zu achten. Des Weiteren sollte der pH-Wert des Rückstandes nicht zu niedrig sein. Quantifiziert werden die einzelnen Verbindungen über eine Ein-Punkt-Kalibrierung mit entsprechenden Reinsubstanzen unter Einbeziehung der inneren Standards Xylit und Trehalose (7.6.3.3). Bei den Substanzen, die zwei Peaks aufweisen, wird bei der Berechnung die Summe beider Flächeninhalte zugrunde gelegt.

Die gaschromatographische Bestimmung nach Oximierung und Silylierung stellt eine einfache Methode dar, um Kohlenhydrate, Amadori-Verbindungen und auch die Chinoxalinderivate nebeneinander zu bestimmen. So ist es möglich, die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen parallel zum Abbau der relevanten Ausgangsverbindungen in einem analytischen Lauf nachzuweisen und zu quantifizieren.

### 2.1.3 Aufarbeitung realer Lebensmittelproben

Bei Untersuchungen an Modellsystemen können sowohl die Ausgangsverbindungen als auch die durch die Maillard-Reaktion entstandenen Produkte grundsätzlich direkt gaschromatographisch bestimmt werden. Für Untersuchungen an realen Lebensmittelproben ist jedoch eine spezielle Probenvorbereitung notwendig. Während die Modellsysteme definierte Mengen an Ausgangsverbindungen und Puffersubstanzen enthalten, kann in den realen Proben nicht abgeschätzt werden, in welchem Maße begleitende Substanzen die anschließende Derivatisierung für die Gaschromatographie stören. Insbesondere ein hoher Anteil an organischen und anorganischen Säuren würde die in Pyridin ablaufende Oximierung und Silylierung stören.

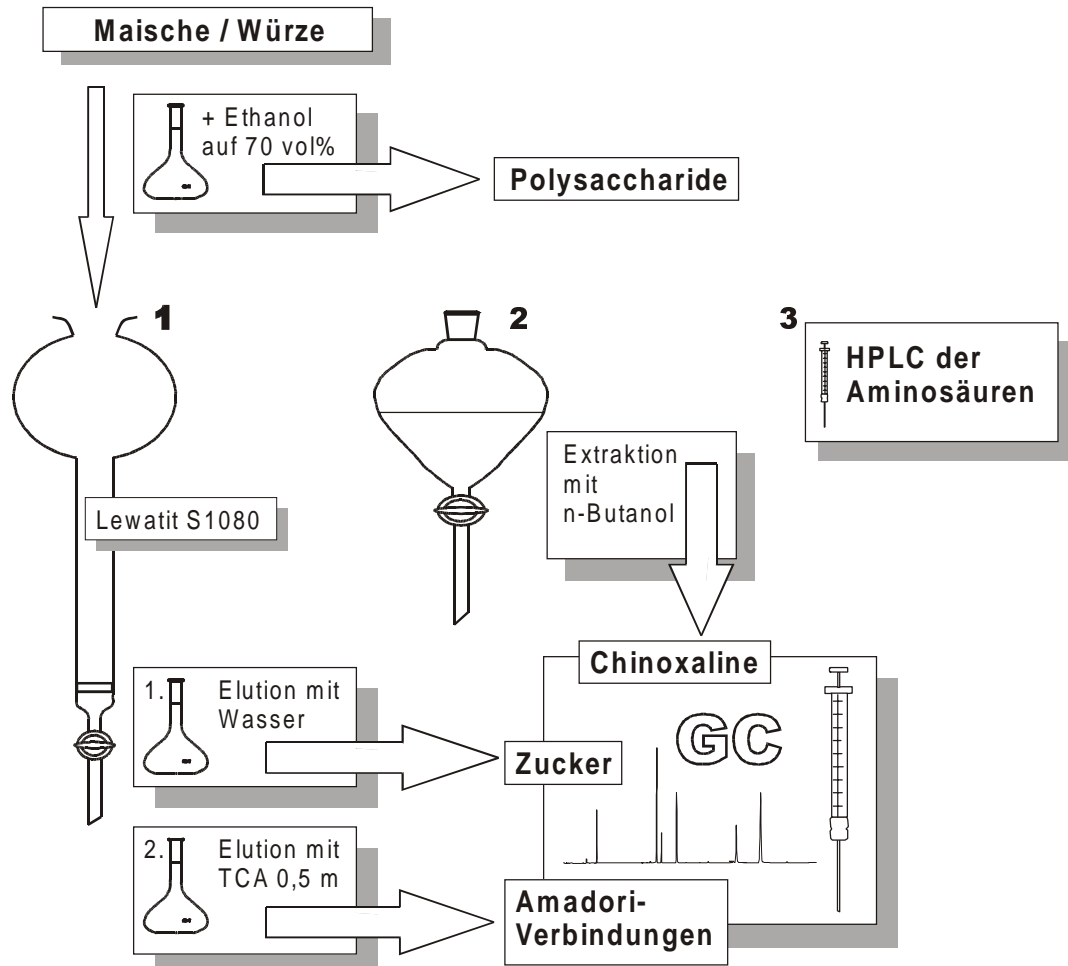
Hinzu kommt, daß die einzelnen Verbindungen in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen können. So kann man zwar die Mono- und Disaccharide direkt aus einem wäßrigen Extrakt bestimmen, zur Bestimmung der Amadori-Verbindungen ist jedoch eine Anreicherung dieser Substanzen erforderlich. Ähnliches gilt für die gebildeten Chinoxaline, die ebenfalls als Minorkomponenten vorliegen.

Der Trennungsgang wird am Beispiel der selbst untersuchten Maischen und Würzen erläutert. Grundsätzlich ist er aber auf alle wäßrigen Lebensmittel bzw. wäßrige Lebensmittel-extrakte anwendbar (Abbildung 23).

In einem ersten Schritt wird der wäßrige Extrakt mit soviel Ethanol (96 %) versetzt, daß der Gesamtethanolgehalt der Lösung mindestens 70 vol% beträgt. Dadurch fällt man die Polysaccharide, die durch Filtration abgetrennt werden können. Am Rotationsverdampfer wird das Ethanol dann vollständig entfernt. Der ethanol- und polysaccharidfreie Extrakt wird dann auf verschiedenen Wegen weiter aufgearbeitet.

Nach Auffüllen auf ein definiertes Volumen kann man die in diesem Extrakt enthaltenen freien Aminosäuren mittels HPLC direkt bestimmen (Abbildung 23 / 3).

Zur Abtrennung der Zucker von den Amadori-Verbindungen wird der Extrakt auf eine Kationenaustauschersäule (Lewatit S 1080) gegeben (Abbildung 23 / 1). Zuerst können die Zucker mit reichlich Wasser von der Säule gewaschen werden. Ein aliquoter Anteil des gesammelten Eluats wird direkt zur gaschromatographischen Bestimmung der Mono- und Disaccharide eingesetzt.



**Abbildung 23:** Schema zur Isolierung und Anreicherung von Zuckern, Amadori-Verbindungen und Chinoxalinderivaten von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus realen Lebensmittelproben als Vorbereitung zur gaschromatographischen Analyse

Mit einer 0,5 molaren Trichloressigsäure-Lösung (TCA) werden dann die auf der Säule angereicherten Amadori-Verbindungen eluiert. Nach dem Entfernen der TCA aus dem Eluat durch Extraktion mit Diethylether wird dieses zur Trockne eingeeengt und der gesamte Rückstand oximiert und silyliert und zur Gaschromatographie eingesetzt.

Zur Anreicherung der Chinoxaline wird parallel ein polysaccharidfreier Extrakt mehrmals mit n-Butanol ausgeschüttelt (Abbildung 23 / 2). Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in einem definiertem Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches aufgenommen. Ein aliquoter Anteil dieser Lösung wird wie oben zur gaschromatographischen Bestimmung der Chinoxaline eingesetzt. Die Wiederfindungsraten

für die selbstentwickelte Methode der Chinoxalin-Extraktion mit n-Butanol wurden in Vorversuchen bestimmt. Die Methodenentwicklung für die Extraktion und Anreicherung der Chinoxalinderivate ist im folgenden Abschnitt 2.1.3.1 beschrieben.

Für die Trennung der Zucker von den Amadori-Verbindungen ergeben sich für die Mono- und Disaccharide Wiederfindungsraten um die 100 %. Die Amadori-Verbindungen werden durch den Anreicherungsschritt zu 85 - 100 % erfaßt. Lediglich das Fructose-Phenylalanin und die Fructose-Pyrrolidoncarbonsäure, die bei der Erhitzung von Fructose-Glutamin bzw. Fructose-Glutaminsäure entsteht, werden durch den Kationenaustauscher nicht zurückgehalten und können deshalb nicht bestimmt werden [25].

### **2.1.3.1 Entwicklung einer Methode zur Extraktion von Chinoxalinderivaten aus wäßrigen Extrakten**

Für die Extraktion der Chinoxalinderivate und ihrer Abtrennung von den begleitenden Substanzen mußte eine geeignete Methode entwickelt werden.

Ein klassischer Weg, um organische Substanzen aus wäßrigen Medien zu isolieren, ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln [43]. Dieser Arbeitsgang kann mit einem mehr oder weniger großen apparativen Aufwand betrieben werden. Die Möglichkeiten gehen von einer einfachen Extraktion durch Ausschütteln bis hin zu Extraktionen in Soxhlet-Systemen oder Rotationsperforatoren. Dabei muß man im allgemeinen einen akzeptablen Kompromiß zwischen der Wiederfindung und dem Arbeitsaufwand finden.

Bei der Extraktion der Chinoxalinderivate von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus Maillard-Reaktionsgemischen können Extraktionen, bei denen die Probe erhitzt werden muß, grundsätzlich nicht eingesetzt werden, da bei den erhöhten Temperaturen eine Artefaktbildung nicht ausgeschlossen werden kann.

Für die Extraktion der Chinoxalinderivate von Dicarbonylverbindungen finden sich in der Literatur zwei verschiedene Arbeitsweisen.

Ledl [57][53] isolierte bei präparativen Arbeiten die Chinoxaline der Desoxyosone aus den wäßrigen Ansätzen durch Ausschütteln mit Dichlormethan. Morita et al. [51] extrahierten die Chinoxalinderivate kürzerkettiger  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus Reaktionsansätzen mit n-Butanol.

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, eine geeignete Methode zu finden, um die Chinoxalinderivate der Desoxyosone und des Glucosons aus wäßrigen Lösungen quantitativ zu extrahieren. Insbesondere war die Reproduzierbarkeit und die Wiederfindung der Methode von Interesse. Dabei sollte vor allem eine ausreichende Abtrennung der Zucker und der organischen Säuren erzielt werden. Außerdem sollte die Methode zweckmäßig und möglichst ohne zu großen Arbeitsaufwand durchzuführen sein.

### **Ermittlung der Wiederfindungsraten bei der Extraktion aus wäßrigen Modellsystemen**

Wäßrige Lösungen, die einen Überschuß an Glucose, Fructose und Citronensäure neben den Chinoxalinderivaten des 1-Desoxyosons und des Glucosons enthielten, wurden zweimal mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand der organischen Phase wurde nach Oximierung und Silylierung gaschromatographisch auf die einzelnen Substanzen untersucht, um die Wiederfindungsraten zu bestimmen.

Neben n-Butanol und Dichlormethan wurden auch Essigester, n-Hexan und t-Butylmethylether (t-BME) als klassische organische Lösungsmittel untersucht. Die ermittelten Wiederfindungsraten für die einzelnen Verbindungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Wiederfindungsraten der einzelnen Substanzen in Prozenten bezogen auf das verwendete Extraktionsmittel. Die Wiederfindungsrate für das 3-DHQ wurde nur für die Extraktion mit n-Butanol bestimmt.**

|               | t-BME | n-Hexan | Essigester | Dichlormethan | n-Butanol   |
|---------------|-------|---------|------------|---------------|-------------|
| Citronensäure | -     | -       | -          | -             | 5,1         |
| Fructose      | 0,5   | 0,0     | 9,5        | 0,0           | 10,2        |
| Glucose       | 0,1   | 0,0     | 8,4        | 0,0           | 10,5        |
| 1-DHQ         | 23,3  | 0,0     | 77,0       | 15,4          | <b>93,5</b> |
| aTBQ          | 16,0  | 0,0     | 30,6       | 0,0           | <b>81,9</b> |
| 3-DHQ         | -     | -       | -          | -             | <b>93,3</b> |

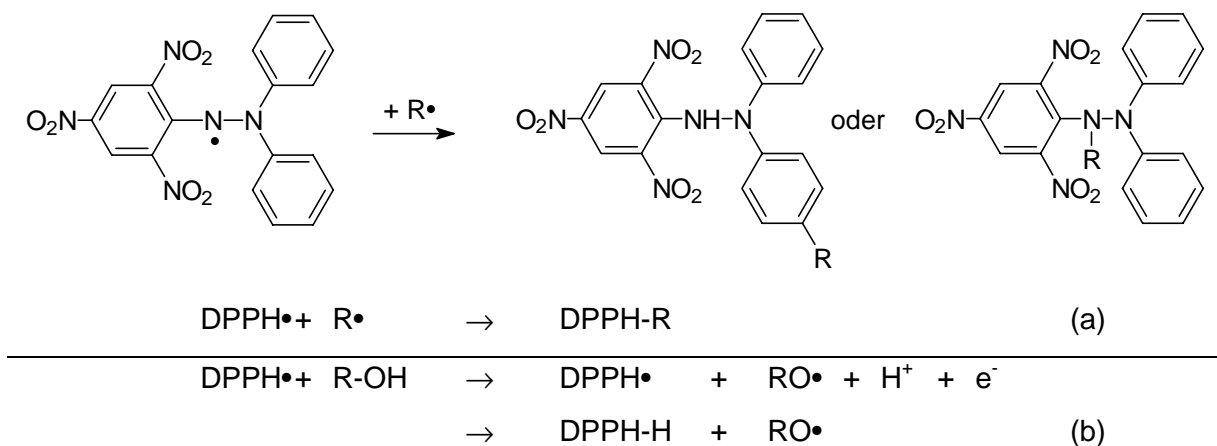
Die Extraktion mit Dichlormethan, wie Ledl sie bei seinen präparativen Arbeiten anwendete, führt zu einem äußerst sauberen Extrakt, der neben den Chinoxalinen kaum Begleitbestandteile enthält. Diese Art der Aufreinigung ist jedoch aufgrund der niedrigen Wiederfindungsraten nur für präparative Arbeiten geeignet. Von den anderen Extraktionsmitteln ist n-Butanol das geeignetste Lösungsmittel. Hier ergeben sich für die drei Chinoxaline Wiederfindungsraten von 82 bis 95 %, wohingegen der Überschuß an Glucose, Fructose und Citronensäure nur zu ca. 10 % in den Extrakt gelangt (7.5). Somit erreicht man nicht nur eine Anreicherung der Chinoxaline aus der Lebensmittelmatrix, sondern auch eine weitgehende Abtrennung der Verbindungen, die in der Matrix in großem Überschuß vorliegen und die sich in diesen großen Mengen störend auf die nachfolgende Derivatisierung für die Gaschromatographie auswirken würden.

#### **2.1.4 Nachweis von Radikalen mit der DPPH-Methode**

Eine apparativ sehr einfache Methode zum Nachweis von Radikalen stellt die Abfangreaktion mit 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Radikal (DPPH•) dar. Bei dem DPPH• handelt es sich um

ein stabiles Radikal. Selbst während der Lagerung unter Luftsauerstoff bei Raumtemperatur nimmt es nur sehr langsam ab. Damit stellt das DPPH• eine ausgezeichnete Verbindung für den Nachweis radikalischer Verbindungen dar, die sich aufgrund ihrer Instabilität anderen analytischen Nachweismethoden entziehen.

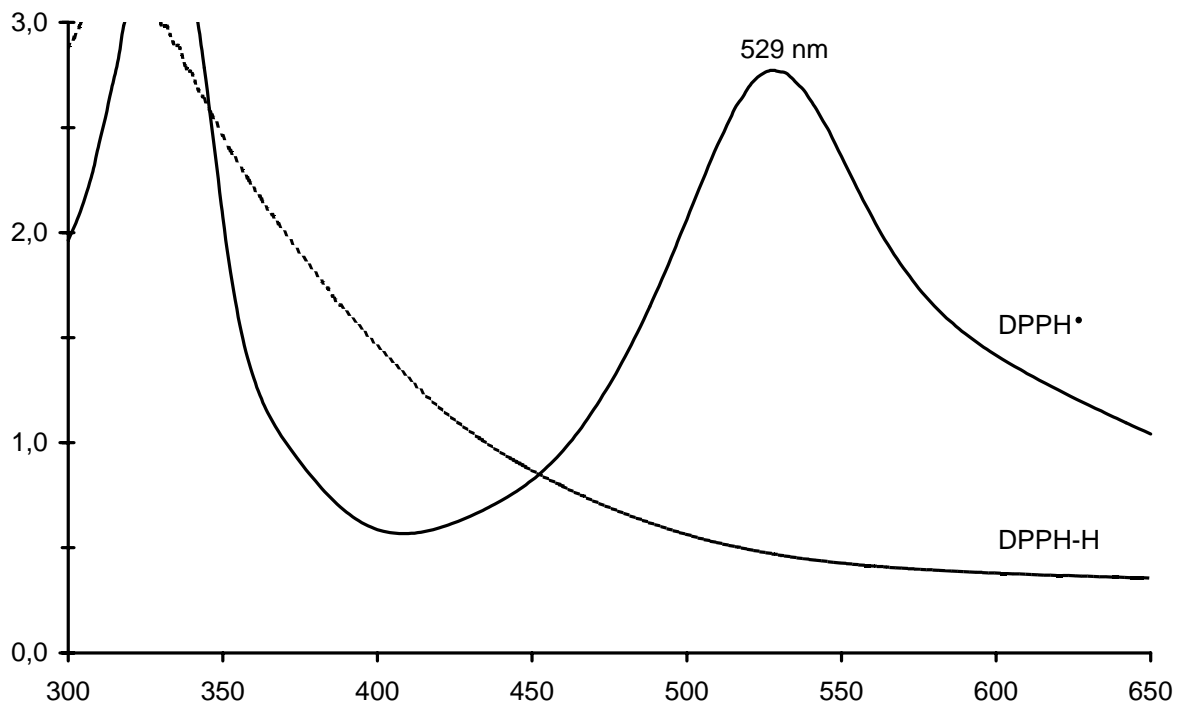
Der Nachweis beruht hierbei auf der Kombination dieser Radikale mit dem DPPH-Radikal (Abbildung 24 (a)); das nachzuweisende Radikal wird durch das DPPH• abgefangen, bevor es weiterreagieren kann. Aufgrund der sterischen Hinderung kann es aber nicht zu einer Rekombination zweier DPPH-Radikale kommen. Die Reaktion läuft - je nach dem wie überschaubar die Anzahl der möglichen Reaktionspartner ist - stöchiometrisch ab. Bei der eigentlichen Analytik handelt es sich um eine photometrische Bestimmung des Gehaltes des DPPH-Radikals, dessen Abnahme ein Maß für die Radikale in der Lösung darstellt.



**Abbildung 24: Reaktionen des DPPH-Radikals: Kombination mit anderen Radikalen (a).  
Reduktion durch Elektronenübertragung (b).**

Während die Lösung des DPPH-Radikals tiefviolett gefärbt ist, zeigt die Lösung der reduzierten Form (DPPH-H) lediglich eine schwach gelbliche Färbung. In Chloroform hat das DPPH-Radikal bei 529 nm ein Maximum; bei dieser Wellenlänge wird dessen Gehalt bestimmt (Abbildung 25).

Eingesetzt wird die DPPH-Methode in erster Linie zur Bewertung von antioxidativ wirksamen (Radikale abfangenden) Substanzen im Rahmen der Lipidoxidation [58][59].



**Abbildung 25: UV/VIS-Spektrum des DPPH-Radikals (DPPH•) und des reduzierten DPPH-H in Chloroform**

Zum Nachweis von Radikalen in den eigenen Maillard-Reaktionsgemischen werden die Modelle, die die Amadori-Verbindung enthalten, unter verschiedenen Reaktionsbedingungen für 2 h bei 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das wässrige Modell mit einer Lösung aus DPPH• in Chloroform ausgeschüttelt. Anschließend kann der Restgehalt an DPPH• in der organischen Phase photometrisch bestimmt werden. Eine Abnahme der Extinktion bedeutet eine Abnahme an freien DPPH-Radikalen. Diese Abnahme muß allerdings nicht zwangsläufig auf Radikale in den wässrigen Modellen zurückzuführen sein, da das DPPH• auch durch Charge-Transfer-Reaktionen reduziert werden kann (Abbildung 24 (b)). Cämmerer [60] führte deshalb im Rahmen des Nachweises von Radikalen im Verlauf der Maillard-Reaktion auch noch eine Bestimmung des Anteils der durch Elektronenübertragung reduzierten Menge an DPPH mittels der Fe-Phenanthrolin-Methode durch. Bei den eigenen Modellen kam es bei dieser Methode jedoch nicht zu sinnvollen Ergebnissen, da einzelne Inhaltsstoffe ( $\text{Cu}^{2+}$ , Citrat) die Bestimmung störten. Die DPPH-Methode wird von den Inhaltsstoffen der Systeme hingegen nicht beeinflusst, lediglich die fehlende Abgrenzung zu den Charge-Transfer-Reaktionen stellt eine Beeinträchtigung der Ergebnisse dar.

Für die eigenen Untersuchungen soll die Bestimmung mit der DPPH-Methode nur ein Indiz für die Bildung von Radikalen beim Abbau von Amadori-Verbindungen darstellen. Denn man sollte sich darüber im klaren sein, daß die DPPH-Methode auch bei Abgrenzung der Charge-Transfer-Reaktionen nie absolute Aussagen über den Gehalt an Radikalen in wässrigen Mo-

dellen machen kann. Zum einen ist die Stöchiometrie der DPPH-Abnahme durch Radikale unbestimmter Struktur - wie sie in den Maillard-Reaktionsgemischen auftreten - nicht bekannt. Zum anderen werden die Radikale nicht direkt bei ihrer Entstehung in der Lösung abgefangen. Die Bestimmung von Radikalen mit der DPPH-Methode stellt deshalb immer nur eine Momentaufnahme des untersuchten Systems dar. Aussagen über absolute Gehalte sind mit ihr nicht möglich.

## **2.1.5 Nachweis und Charakterisierung von Radikalen mit der Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie (ESR)**

### **2.1.5.1 Grundlagen der ESR**

Bei der Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie (ESR) handelt es sich um eine physikalischen Methode, mit der spezifisch Radikale, das heißt Verbindungen mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, untersucht werden können [61][62].

Da die meisten Radikale sehr reaktiv sind und somit nur eine kurze Lebensdauer besitzen, stellt die ESR die wichtigste Methode bei ihrem Nachweis und damit bei der Aufklärung radikalischer Reaktionsmechanismen dar. Denn grundsätzlich ist es mit der ESR möglich, die Radikale direkt am Entstehungsort nachzuweisen. Mit Hilfe der ESR-Spektren lassen sich aber auch schon Aussagen über die Konstitution der einzelnen Radikale und über die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des ungepaarten Elektrons bei den einzelnen Atomen eines radikalischen Moleküls machen.

Eng verwandt ist die ESR-Spektroskopie, gerade bezogen auf ihre physikalischen Grundlagen, mit der Kernresonanz-Spektroskopie.

Jedes Elektron verhält sich in einem Magnetfeld wie ein magnetischer Dipol, der zur Änderung seines magnetischen Moments Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung aufnehmen kann. Die Energiezustände, die ein Elektron in einem Magnetfeld aufnehmen kann, sind dabei gequantelt. Da bei Elektronen der Spin  $I = \frac{1}{2}$  ist, besitzen Elektronen genau zwei Freiheitsgrade; die magnetische Quantenzahl  $m_l$  kann also die Werte  $+\frac{1}{2}$  und  $-\frac{1}{2}$  annehmen. Somit ergeben sich bei der Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit dem Magnetfeld zwei Energiezustände, bei denen mit der ESR-Spektroskopie eine Absorption von eingestrahlten elektromagnetischen Wellen gemessen werden kann. Das Elektron verhält sich bei der Absorption elektromagnetischer Strahlung entsprechend dem *Zeeman-Effekt*, der den Umstand umschreibt, daß die Frequenz einer Strahlung aufgespalten wird, sofern sich das aussendende Teilchen in einem Magnetfeld befindet, dabei ist auch diese Aufteilung gequantelt.

Die Bedingung für die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch ein Elektron im Magnetfeld ergibt sich aus der Gleichung 1.

**Gleichung 1:**

$$\Delta E = h \cdot \nu = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0 \cdot m_l$$

$h \cdot \nu$ : Strahlungsenergie

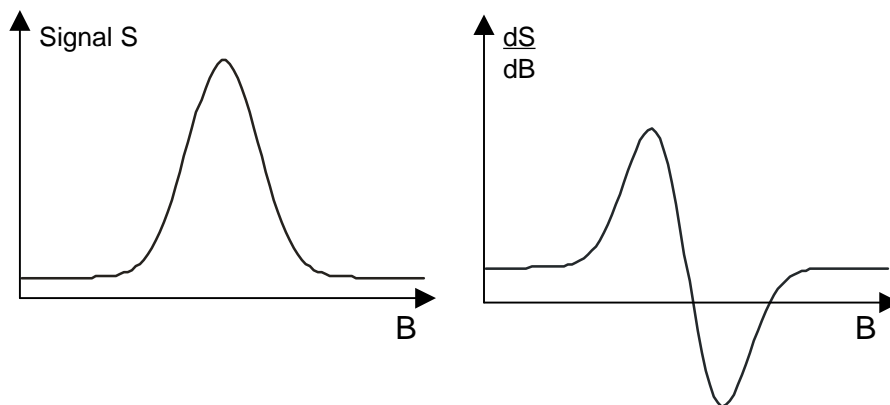
$g_e$ : g-Faktor; stoffspezifische Meßgröße; abhängig von der Struktur des Radikals  
für freie Elektronen gilt:  $g_e = 2,0023$

$\mu_B$ : Bohr'sches Magneton (physikalische Konstante)

$B_0$ : Feldstärke des angelegten Magnetfeldes in G (Gauss)

$m_l$ : magnetische Quantenzahl ( $+\frac{1}{2}$ ,  $-\frac{1}{2}$ )

Zur Spektrenaufnahme würde man nun in der klassischen Spektroskopie (UV/VIS, IR) das Magnetfeld konstant halten und die Frequenz ( $\nu$ ) variieren, bis eine Absorption bei  $\Delta E$  eintritt. Bei der ESR-Spektroskopie wird demgegenüber die Frequenz konstant gehalten und das Magnetfeld solange verändert, bis die Feldstärke die beiden Spin-Zustände derart beeinflusst, daß ihre Energiedifferenz dem Energiegehalt der Strahlung entspricht und es so zur Absorption kommt.



**Abbildung 26:** Absorptionssignal **S** aufgetragen gegen die Feldstärke **B** (links).  
Die erste Ableitung des Signals **S** nach der Feldstärke **B** (rechts).

Bei den meisten ESR-Spektrometern mißt man im sogenannten *X-band* des Mikrowellenbereichs, dessen Frequenz 9,5 GHz beträgt. Für Elektronen mit einem g-Faktor von 2,0023 liegt die Feldstärke des Resonanzmagnetfeldes hier bei 3389 G.

Aus technischen Gründen mißt man jedoch nicht das Absorptionssignal selbst, sondern die erste Ableitung der Intensität nach der Feldstärke (Abbildung 26).

### **Die Hyperfeinstruktur**

Das ungepaarte Elektron ist sehr empfindlich gegenüber Magnetfeldern in seiner unmittelbaren Umgebung. So kommt es durch das magnetische Moment des Kerns, an dem das Elektron lokalisiert ist, zur Ausbildung eines weiteren Magnetfeldes, das mit dem ungepaar-

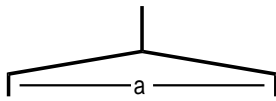


ten Elektron in Wechselwirkung tritt. Das eigentliche Signal bei der Resonanzfeldstärke wird dadurch gemäß dem Kernspin ( $I$ ) des umgebenden Kerns weiter aufgespalten.

Für den einfachsten Fall eines Protons mit der Kernspinzahl  $I = \frac{1}{2}$  ergeben sich wiederum zwei zusätzliche Zustände ( $m_I = +\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$ ). Das Signal spaltet sich in zwei Linien, die jedoch nur die halbe Intensität aufweisen.

Gekennzeichnet ist die Aufspaltung durch die lokale Feldstärke, die sich am Proton ergibt (Gleichung 2).

**Gleichung 2:**

$$B_{\text{lokal}} = B_0 + a \cdot m_I$$


Hierbei ist  $a$  die sogenannte Hyperfeinstruktur-Kopplungskonstante, die im Spektrum den Abstand zwischen den beiden aufgespaltenen Signalen darstellt. Die Mitte des Spektrums gibt als zusätzliche charakteristische Größe den  $g$ -Faktor des Radikals an [63].

Analog spaltet sich das Signal eines ungepaarten Elektrons an einem Stickstoffatom ( $I = 1$ ) in drei Linien gleicher Intensität, da der  $^{14}\text{N}$ -Kern drei erlaubte Spin-Orientierungen hat und jede dieser Orientierungen von einem Drittel der Elektronen besetzt ist (bezogen auf die Aufenthaltswahrscheinlichkeit). Demgegenüber besitzen die  $^{12}\text{C}$ - und  $^{16}\text{O}$ -Kerne mit ihrem Spin  $I = 0$  kein magnetisches Moment, wodurch es zu keiner weiteren Aufspaltung des Signals kommt.

Die Komplexität der Hyperfeinstruktur wächst jedoch durch die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit mehreren Kernen. Hierbei kann es sich um gleichberechtigte Kerne handeln, die damit über die gleiche Kopplungskonstante verfügen oder über Kerne in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Stellung, die das lokale Magnetfeld beeinflussen.

Die Hyperfeinstruktur eines ESR-Spektrums ist der Fingerabdruck der vorhandenen Radikale. Die Zuordnung der Linien zu einzelnen Strukturen und die Ermittlung der Kopplungskonstanten als charakteristische Größe des Radikals wird dabei mit zunehmender Aufspaltung immer schwieriger. Bei ungepaarten Elektronen, die über mehrere verschiedene Kerne delokalisiert sind, kann die Aufspaltung dann sogar so weit gehen, daß nur noch ein einziges sehr breites Signal aufgezeichnet werden kann.

### 2.1.5.2 Nachweis kurzlebiger Radikale durch Spin Trapping mit DMPO

Ein großes Problem der ESR liegt in der Natur der zu untersuchenden Verbindungen. Bei den Radikalen handelt es sich meist um sehr kurzlebige Strukturen, die häufig nur im Moment der Entstehung nachzuweisen sind. Die Lebensdauer verkürzt sich zusätzlich, wenn man Radikale in wäßrigen Systemen bestimmen will, da hier das ungepaarte Elektron Reaktionen mit gelöstem Sauerstoff oder anderen Verbindungen eingehen kann.

In eigenen Vorversuchen konnten Radikale beim Abbau von Amadori-Verbindungen in wäßrigen Systemen nicht direkt mittels der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Selbst nach direkter Bestrahlung von Amadori-Verbindungen mit Röntgenstrahlung konnten in den wäßrigen Lösungen keine Radikale detektiert werden, obwohl eine solche Bestrahlung die unterschiedlichsten radikalischen Strukturen induzieren sollte. Offensichtlich reicht die Lebensdauer der Radikale beim Abbau der Amadori-Verbindung nicht für den direkten Nachweis mittels ESR-Spektroskopie aus.

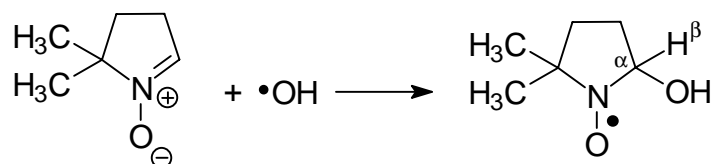
Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Verwendung wäßriger Lösungen als Untersuchungsmaterial. Die Wassermoleküle neigen selbst dazu, die eingestrahlten Mikrowellen zu absorbieren - ein Umstand, der im alltäglichen Haushalt zur Anwendung kommt. Dadurch verringert sich bei der Messung die Intensität der angelegten Strahlung, was zu einer Verringerung der Nachweisgrenze führt.

Für den Nachweis von Radikalen *in vitro* und selbst *in vivo* benutzt man deshalb in letzter Zeit vermehrt das *Spin Labeling* bzw. das *Spin Trapping* [64].

Beim Spin Trapping wird das Radikal mit geeigneten Reagenzien (sogenannte Spin Traps) abgefangen. Dadurch wird das ungepaarte Elektron auf das Spin Trap übertragen und es entsteht ein Radikal mit erheblich längerer Lebensdauer.

Zum Einsatz kommen hierbei die verschiedensten Spin Traps bzw. Spin Labels. Allen gemein ist jedoch das Vorhandensein einer Stickoxid-Gruppe, dessen Stickstoffatom in einem Heterocyclus stabilisiert ist. Die einzelnen Spin Traps unterscheiden sich in ihrer Affinität zu den verschiedenen Radikalen. So wird zum Abfangen von Alkylradikalen ( $R\bullet$ ) häufig das 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl (TEMPO) bzw. die entsprechende 4-Hydroxy-Verbindung (TEMPOL) eingesetzt [65][66].

Ein weiteres, häufig eingesetztes Spin Trap ist das 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO). Es besitzt eine besondere Affinität zu radikalischen Strukturen, die an Sauerstoffatomen lokalisiert sind [67]. So lassen sich mit dem DMPO sowohl Hydroxylradikale ( $HO\bullet$ ) als auch Superoxy- und Hydroperoxyradikale ( $O_2\bullet^- / HOO\bullet$ ) abfangen. Auch Alkoxy- und Peroxyradikale ( $RO\bullet / ROO\bullet$ ) konnten bereits mit DMPO nachgewiesen werden [68].



**Abbildung 27: Bildung des Addukts aus DMPO und Hydroxylradikalen**

Der Mechanismus der Abfangreaktion soll anhand der Adduktbildung des DMPOs mit einem Hydroxylradikal erläutert werden (Abbildung 27). Das Hydroxylradikal wird an die Doppelbindung addiert, wodurch das ungepaarte Elektron an das DMPO-Molekül übergeben wird. Es

wird zwischen dem Stickstoff und dem Sauerstoff delokalisiert, wodurch die radikalische Struktur gleichzeitig stabilisiert wird. Für die Hyperfeinstruktur des entstandenen Radikals im ESR-Spektrum sind dann allerdings nur der  $^{14}\text{N}$ -Kern und das Proton in  $\beta$ -Stellung (bezogen auf das Elektron) verantwortlich, da sämtliche anderen Kerne in der näheren Umgebung kein eigenes magnetisches Moment besitzen [61].

Das nicht umgesetzte DMPO kann demgegenüber nicht mittels der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden, da es selbst nicht über ungepaarte Elektronen verfügt.

Das DMPO wurde bereits verschiedentlich bei lebensmittelchemischen oder verwandten Fragestellungen eingesetzt. Meist handelt es sich dabei um Untersuchungen zur radikalisch verlaufenden Lipidperoxidation bzw. ihrer Unterdrückung mittels antioxidativer Substanzen [69][70].

Freie Radikale konnten ebenfalls mittels Spin Trapping mit DMPO in wässrigen Extrakten von Zigarettenteer nachgewiesen werden [71].

Auch bei Untersuchungen zur Oxidation von Aldosen und Desoxyaldosen durch Chrom(VI) konnten mit DMPO einzelne radikalische Zwischenstufen identifiziert werden.

Ródio et al. [72] schließlich setzten das DMPO bei kinetischen Studien des oxidativen Abbaus von Gluconaten und Glucuronaten unter Kupfer-Katalyse ein.

Aufgrund der ähnlichen Fragestellung bei dem autoxidativen Abbau von Amadori-Verbindungen unter Beteiligung von Kupferionen wurde in den eigenen Untersuchungen ebenfalls das DMPO als Spin Trap eingesetzt.

## 2.2 Präparative Arbeiten

### 2.2.1 Präparative Darstellung der Amadori-Verbindungen

Bei Untersuchungen zur nicht-enzymatischen Bräunung verwendet man häufig Modellsysteme. Um deren Ergebnisse auf reale lebensmittelchemische Prozesse übertragen zu können, ist es wichtig, geeignete Ausgangsverbindungen und Reaktionsbedingungen für die Modellsysteme zu wählen. Bei den eigenen Untersuchungen sollte der Abbau der Amadori-Verbindungen zu den  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen untersucht werden. Hierfür sollten Modelle angesetzt werden, die die Amadori-Verbindung als alleiniges Edukt für die Maillard-Reaktion enthalten. So kann gewährleistet werden, daß die entstehenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen allein aus dem Abbau der Amadori-Verbindung stammen. Häufig werden für Untersuchungen zur Maillard-Reaktion Amadori-Verbindungen aus Glucose und Piperidin oder primären Aminen als Ausgangsverbindungen eingesetzt [18][73], da diese 1-Amino-Ketosen sehr leicht präparativ darzustellen sind. Um die direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Modellen auf reale Lebensmittel zu gewährleisten, sollten bei den eigenen Untersuchungen demgegenüber

Amadori-Verbindungen aus Glucose und Aminosäuren eingesetzt werden, die auch in realen Lebensmitteln vorkommen.

Zur Darstellung von Amadori-Verbindungen gibt es in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien, die prinzipiell alle auf dem direkten Erhitzen des Zuckers mit der Aminosäurekomponente basieren. Dabei kann die Reaktion direkt in der Schmelze der Ausgangsverbindungen oder in Lösung unter Rückfluß stattfinden [13].

Bei der eigenen Darstellung wurde Glucose mit der Aminosäure in Methanol unter Rückfluß erhitzt. Das eingeeengte Reaktionsgemisch wird zur Isolierung der Amadori-Verbindung auf eine mit einem Kationenaustauscher gefüllte Chromatographiesäule aufgegeben. Als erstes trennt man die überschüssige Zuckerkomponente durch Elution mit Wasser ab. Die auf der Säule festgehaltene Amadori-Verbindung wird dann mit einer wäßrigen Trichloressigsäure-Lösung eluiert. Durch mehrmaliges Ausschütteln mit Diethylether entfernt man die Trichloressigsäure aus dem Eluat, das die Amadori-Verbindung enthält. Aus der wäßrigen Phase kann dann durch Gefriertrocknung die Amadori-Verbindung erhalten werden. Die Charakterisierung und Reinheitsüberprüfung der Fructose-Aminosäure erfolgt durch GC/MS-Kopplung über geeignete Vergleichsspektren [74][25].

## **2.2.2 Präparative Darstellung der Chinoxalinderivate der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen**

Die beim Abbau der Amadori-Verbindung entstehenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen werden bei den eigenen Untersuchungen mit *o*-Phenylendiamin abgefangen und dadurch in die stabilen Chinoxalinderivate überführt (2.1.1). Der Nachweis der Chinoxaline erfolgt gaschromatographisch nach Silylierung der Hydroxylgruppen (2.1.2). Um quantitative Aussagen über den Gehalt an Chinoxalinen in den untersuchten Modellen und Lebensmittelproben machen zu können, benötigt man identische Vergleichssubstanzen, mit denen man eine Kalibration der Meßmethode durchführen kann. Die entsprechenden Chinoxaline des 1-Desoxyosons, des 3-Desoxyosons und des D-Glucosons wurden deshalb präparativ hergestellt. Die Präparate werden nach Silylierung bzw. Acetylierung mittels GC/MS-Kopplung charakterisiert und auf Ihre Reinheit kontrolliert. Als zusätzliche Methode zur Charakterisierung wurde die FT-Infrarot Spektroskopie eingesetzt.

### **2.2.2.1 Darstellung von 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin (1-Desoxyoson-chinoxalin)**

Das 1-Desoxyoson stellt eine sehr reaktive Verbindung dar, die schnell weiter reagiert und deshalb erst 1988 von Ledl [18] in Maillard-Reaktionsgemischen in Form des Chinoxalinderivates nachgewiesen werden konnte. Die Darstellung des freien 1-Desoxyosons ist aufgrund der Reaktivität sehr aufwendig und schwierig [75]. Die Darstellung des stabilen

Chinoxalinderivates des 1-Desoxyosons ist demgegenüber viel unproblematischer. Bei den eigenen präparativen Arbeiten wurden die Vorschriften von Ledl [57][18] angewendet.

Hierbei geht man von der 1-Desoxy-1-piperidino-fructose aus, die mit o-Phenylendiamin in Wasser bei einem pH-Wert von 5,5 - 5,8 unter Rückfluß gekocht wird.

Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch neutralisiert. Nebenprodukte wie das 1,4-Desoxy-1-piperidino-hexosulose-chinoxalin und weitere Verunreinigungen werden durch Ausschütteln mit Dichlormethan entfernt.

Die wäßrige Lösung wird zur Trockne eingengt und der Rückstand in wenig heißem Methanol aufgenommen und der unlösliche Rückstand abfiltriert. Über Nacht im Kühlschrank kristallisiert das 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin in weißen Nadeln aus. Das Rohprodukt kann aus Methanol umkristallisiert werden.

### **2.2.2.2 Darstellung von 2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl)-chinoxalin (3-Desoxyoson-chinoxalin)**

Die Darstellung des 3-Desoxyoson-chinoxalins ist erheblich aufwendiger als die des 1-Desoxyoson-chinoxalins. Denn hier muß in einer ersten Stufe das 3-Desoxyoson hergestellt werden. Danach kann das 3-Desoxyoson mit o-Phenylendiamin direkt umgesetzt werden.

Für die präparative Darstellung des 3-Desoxyosons gibt es verschiedene Vorschriften [76][77][25]. Bei der eigenen Darstellung wurde Glucose mit n-Butylamin unter Erhitzen umgesetzt. Das Reaktionsgemisch, das unter anderem das 3-Desoxyoson enthält, wird dann durch mehrere Schritte aufgereinigt. Die Abtrennung der Aminokomponente erfolgt durch Säulenchromatographie an einem sauren Kationenaustauscherharz. Die Abtrennung der Glucose von dem 3-Desoxyoson erfolgt durch eine weitere Säulenchromatographie an Cellulose. Die Elution erfolgt hier mit einem Gemisch aus Ethylacetat, Ethanol und Wasser (6:3:1), wobei das Eluat in mehreren Fraktionen aufgefangen wird. Die Überprüfung der einzelnen Fraktionen auf das 3-Desoxyoson erfolgt durch Gaschromatographie (2.1.2).

Zur Darstellung des Chinoxalinderivates wird das 3-Desoxyoson mit o-Phenylendiamin in Wasser unter Stickstoff umgesetzt. Zur Abtrennung des Chinoxalinderivates wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan ausgeschüttelt.

Die organische Phase wird eingengt und der sirupöse Rückstand mittels der präparativen Schichtchromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Das 3-Desoxyoson-chinoxalin wird mit Methanol aus der Kieselgelschicht extrahiert und kristallisiert nach dem Abdampfen des Methanols aus.

### **2.2.2.3 Darstellung von D-arabino-Hexos-2-ulose-chinoxalin (D-Glucoson-chinoxalin)**

Feather [78] entwickelte eine Methode, mit der sich die stabilen Bis-benzoylhydrazone des 3-Desoxyosons und des D-Glucosons darstellen lassen (vergl. auch [79]). Ausgehend von dieser Darstellungsweise wurde eine eigene Methode entwickelt, mit der sich das Chinoxalinderivat des Glucosons als alleiniges Produkt präparativ herstellen läßt.

Hierzu wird Glucose mit p-Toluidin im essigsäuren Medium unter Rückfluß erhitzt. Nach der Zugabe des o-Phenylendiamins wird der Reaktionsansatz erneut zum Kochen gebracht. Nach dem Abkühlen kristallisiert das Chinoxalinderivat in Form kleiner Plättchen aus. Es wird mehrmals mit Methanol und Diethylether gewaschen und schließlich aus heißem Methanol umkristallisiert.

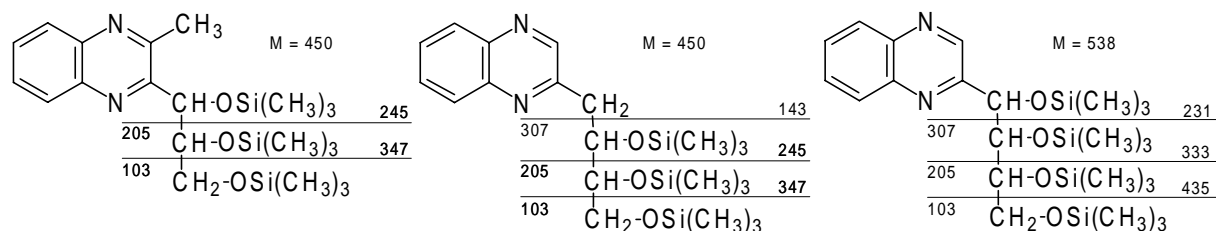
### **2.2.3 Charakterisierung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Chinoxaline mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie Kopplung**

Die wichtigste Methode zur Charakterisierung von Verbindungen ist die Massenspektroskopie. Die eigenen Präparate wurden deshalb mittels Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektroskopie charakterisiert und auf ihre Reinheit überprüft. Die Präparate wurden hierfür mit zwei unabhängigen Methoden acetyliert bzw. silyliert. Die Derivate wurden nach gaschromatographischer Trennung massenspektroskopisch detektiert. Die durch Elektronenstoß-Ionisation (70 eV) erhaltenen Massenspektren konnten dann für die einzelnen Chinoxalinderivate ausgewertet werden.

#### **2.2.3.1 Charakterisierung der Chinoxalinderivate mittels GC/MS-Kopplung nach Silylierung**

Die Charakterisierung der präparativ dargestellten Chinoxaline erfolgt nach Silylierung mittels GC/MS-Kopplung. Nach der Silylierung, die auch für die analytische Bestimmung der Chinoxaline in den Modellen und Lebensmittelproben angewendet wird, erhält man die Chinoxaline in Form ihrer Silylether, die sich sehr gut gaschromatographisch nachweisen lassen.

Die Strukturen der Silylether der hier interessierenden Chinoxalinderivate sind in Abbildung 28 dargestellt. Die Massenspektren befinden sich im Anhang (9.2).



**Abbildung 28:** Schema für die homolytische Spaltung der Trimethylsilylether der Chinoxalinderivate der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bei der Massenspektroskopie (v.l.: 1-DHQ / 3-DHQ / aTBQ)

Bei den Chinoxalinderivaten der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen ist die ursprüngliche Zuckerkomponente ein wichtiges Strukturmerkmal. In der silylierten Form ergeben sich deshalb Fragmente, die auch für die Silylether von Monosacchariden typisch sind [80][81]. Im Massenspektrum können Fragmente nachgewiesen werden, die durch die homolytische Spaltung zwischen den einzelnen Kohlenstoffatomen des Zuckerrestes entstanden sind. Dementsprechend ergibt sich im Spektrum eine ganze Serie von Molekülfragmenten, die für die hier vorliegenden Chinoxaline charakteristisch sind. Die möglichen Fragmente und ihre Massen sind in Abbildung 28 angedeutet. In den Spektren finden sich diese Fragmente in unterschiedlichen Intensitäten.

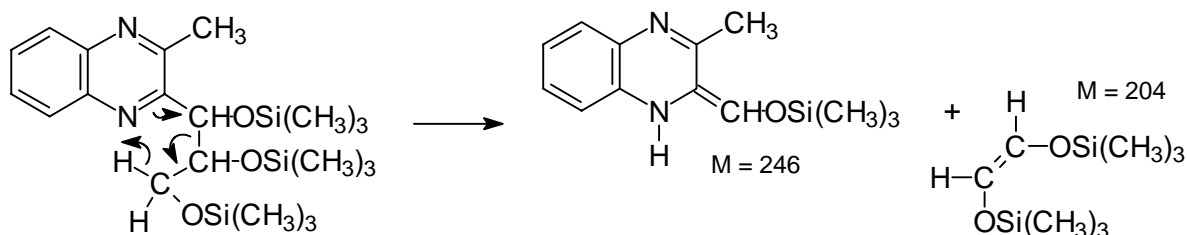
Bei allen drei Chinoxalinderivaten kann der Massenpeak  $M^+$  als wichtiges Charakteristikum nachgewiesen werden. Eine weitere Absicherung des Massenpeaks ist durch das Fragment  $M-15$  möglich. Dieses Fragment ist bei Silylethern üblich, es entsteht durch die Abspaltung einer Methylgruppe. Neben dem  $M-15$  Fragment gibt es noch weitere Spaltprodukte, die typisch für mehrfach silylierte Verbindungen sind. Eine Auflistung dieser Fragmente ist in Tabelle 2 aufgestellt.

**Tabelle 2:** Typische Fragmente mehrfach silylierter Verbindungen

| m/z | Fragment   |
|-----|--|
| 73  | $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$   |
| 147 | $(\text{H}_3\text{C})_3\text{SiO}=\text{Si}(\text{CH}_3)_2$  |
| 217 | $(\text{H}_3\text{C})_3\text{SiO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$<br>307 - $\text{HO}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ |

Die Fragmente mit den Massen 73 und 147 sind in sämtlichen Spektren nachweisbar. Das Fragment 217 entsteht aus dem dreifach silylierten Fragment mit der Masse 307 nach Abspaltung des Trimethylsilanols als Neutralteilchen. Da bei dem Chinoxalin des 1-Desoxyosons das Fragment 307 nicht möglich ist, kann auch das Folgeprodukt 217 nicht nachgewiesen werden. Bei den anderen beiden Chinoxalinen ist die Masse 217 jedoch deutlich erkennbar.

Als weiteres Strukturmerkmal besitzen alle drei Verbindungen den aromatischen Chinoxalinrest, der aus der Reaktion der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit dem o-Phenylendiamin resultiert. Dieser aromatische Heterocyclus neigt kaum zu Fragmentierungen, da das mesomere System in der Lage ist, die aufgenommene Energie bzw. Ladung gut zu stabilisieren. Charakteristische Fragmente ergeben sich aus einer intramolekularen Umlagerungsreaktion, an der sowohl ein Stickstoffatom aus dem Heterocyclus als auch die Kohlenstoffatome des Zuckerrestes beteiligt sind. Bei dieser als McLafferty-Umlagerung bezeichneten Reaktion kommt es über eine sechsatomige Zwischenstufe zur Spaltung des Moleküls.



**Abbildung 29: McLafferty-Umlagerung am Beispiel des 1-Desoxyoson-chinoxalins**

Dargestellt ist dies in Abbildung 29 für das Chinoxalin des 1-Desoxyosons. Hier kann das entstandene stabile Fragment mit der Masse 246 mit einer sehr großen Intensität im Massenspektrum nachgewiesen werden. Grundsätzlich sind aber auch die anderen beiden Chinoxaline in der Lage, eine McLafferty-Umlagerung einzugehen. Beim Glucoson-chinoxalin entstehen dadurch die Fragmente 232 und 306, beim 3-Desoxyoson-chinoxalin analog die Fragmente 306 und 144. In den Spektren sind diese Fragmente in geringen Intensitäten nachweisbar. Beim Glucoson ist die McLafferty-Umlagerung auch dahingehend möglich, daß sich eine Trimethylsilyl-Gruppe anstelle des Protons an den Stickstoff anlagert. Dadurch entsteht das um 72 Masseneinheiten größere Fragment mit der Masse 304, das ebenfalls im Spektrum nachweisbar ist.

### 2.2.3.2 Charakterisierung der Chinoxalinderivate mittels GC/MS-Kopplung nach Acetylierung

Die Chinoxalinderivate wurden auch nach Acetylierung mittels GC/MS-Kopplung untersucht. Dadurch ergibt sich eine weitere unabhängige Methode zur Charakterisierung der Chinoxaline, deren Struktur über die acetylierten Derivate nochmals abgesichert werden kann. Außerdem finden sich in der Literatur Vergleichsspektren für die acetylierten Formen des 1-Desoxyoson-chinoxalins und des 3-Desoxyoson-chinoxalins [57][18].

Hierzu wurden die Präparate in Pyridin mit Acetanhydrid umgesetzt. Dadurch werden die freien Hydroxylgruppen zu den Essigsäureestern umgesetzt. Die acetylierten Verbindungen lassen sich gut gaschromatographisch analysieren. Die entsprechenden Massenspektren der drei Chinoxalinderivate befinden sich im Anhang (9.2).



Der Massenpeak  $M^+$  selbst ist bei den Massenspektren der drei Chinoxaline sehr schwach ausgeprägt. Bei dem 3-Desoxyoson konnte der  $M^+$ -Peak gar nicht detektiert werden. Die Spektren enthalten aber alle für acetylierte Verbindungen typische Fragmente. So lassen sich jeweils das Fragment M-43, das durch die homolytische Spaltung einer Ethoxy-Gruppe entsteht und das Fragment M-59, das aus der Abspaltung der Acetyl-Gruppe resultiert, nachweisen.

Die Massenspektren der Chinoxalinderivate des 1-Desoxyosons und des 3-Desoxyosons konnten zusätzlich mit den Vergleichsspektren in der Literatur verglichen werden. Bei beiden Spektren besteht bezüglich der Fragmente eine sehr gute Übereinstimmung.

#### **2.2.4 Charakterisierung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Chinoxaline mittels FT-Infrarot Spektroskopie**

Neben der Charakterisierung der Chinoxalinderivate durch die Massenspektroskopie sollte eine zusätzliche Bestätigung der Struktur der Präparate durch die Infrarot-Spektroskopie erfolgen [82][83]. Hierfür wurden Verreibungen der einzelnen Präparate mit Kaliumbromid hergestellt und zu Tabletten gepreßt. Diese wurden in einem FT-IR Spektrometer vermessen. Die Spektren sind im Anhang (9.2) beigefügt.

Die IR Spektroskopie erlaubt in erster Linie Aussagen über die funktionellen Gruppen der vorliegenden Verbindungen. Deshalb sind bei den drei verschiedenen Chinoxalinen sehr ähnliche Spektren zu erwarten. Lediglich im sogenannten Fingerprint-Bereich ( $1250 - 667 \text{ cm}^{-1}$ ) unterscheiden sich die Spektren der Chinoxalinderivate erheblich. Mit diesem Ausschnitt ist eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Verbindung möglich. Eine vollständige Zuordnung der Banden in diesem Bereich ist allerdings aufgrund der zahllosen Möglichkeiten für ihre Entstehung bei solchen komplexen Molekülen nicht möglich.

Die Spektren weisen jeweils eine starke Bande im Bereich von  $3400 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  auf, die aus den Hydroxylgruppen resultiert. Diese Bande ist sehr breit, was auf intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen schließen läßt. Zusätzlich finden sich bei  $1250 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  Banden, die von der Schwingung der C-O-Gruppe stammen. Hierbei erscheint die Schwingung der primären Alkoholgruppe bei  $1040 \text{ cm}^{-1}$ ; für die sekundären Alkohole ist die Bande bei  $1100 \text{ cm}^{-1}$  charakteristisch. Das aromatische System produziert ebenfalls eine Reihe charakteristischer Banden im Spektrum. Bei  $2900 \text{ cm}^{-1}$  liegt die Valenzschwingung der C-H-Bindung des aromatischen Ringes. Zusätzlich erkennt man im Bereich zwischen  $1600 \text{ cm}^{-1}$  und  $1450 \text{ cm}^{-1}$  eine Reihe von Banden, die aus der Skelettschwingung des Aromaten resultieren. Die Stickstoffatome im aromatischen Ring ergeben eine zusätzlich Bande bei  $1580 \text{ cm}^{-1}$ , die jedoch nur schwer von den Skelettschwingungen zu unterscheiden ist. Ein charakteristischer Peak, der bei  $760 \text{ cm}^{-1}$  bei allen Spektren auftaucht, resultiert aus

dem ortho-substituierten Phenylring und ist auf eine Kombinationsschwingung der vier benachbarten Wasserstoffatome am Ring zurückzuführen.

Die erhaltenen Infrarot-Spektren lassen sich somit plausibel aus den vorliegenden Strukturen der Chinoxaline erklären.

### 3 Untersuchungen an wäßrigen Modellsystemen

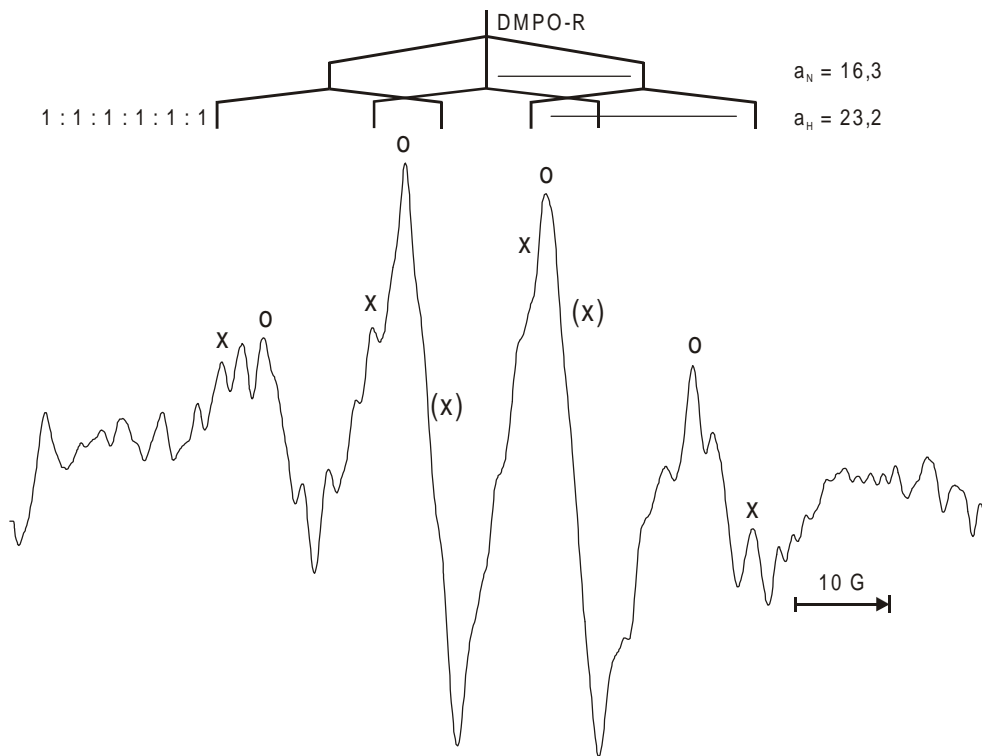
#### 3.1 Nachweis des radikalischen Abbaus von Amadori-Verbindungen mittels ESR nach Spin Trapping

Kawakishi postuliert für die Bildung des Glucosons aus Amadori-Verbindungen einen Abbauweg, der über eine radikalische Zwischenstufe verläuft (vergl. 1.1.4.1). In den eigenen Modellen sollte untersucht werden, ob sich beim Abbau von Amadori-Verbindungen mittels der ESR die Entstehung solcher Radikale nachweisen läßt.

Wie erste Voruntersuchungen an erhitzten (80°C, 2 h) Modellen mit Fructose-Alanin ergaben, sind die entstehenden Radikale sehr instabil und reagieren in dem wäßrigen Milieu schnell weiter. So konnten selbst in ESR-Messungen, die sich direkt an die Erhitzungsphase anschlossen, kaum Radikale nachgewiesen werden. Selbst das ESR-Spektrum einer mit Röntgenstrahlung bestrahlten Fructose-Alanin-Lösung zeigte lediglich ein einziges sehr breites Signal, das sich in der Intensität nur wenig von dem Grundrauschen heraushob. Um die Lebensdauer der entstehenden Radikale zu verlängern, wurde deshalb die Spin Trapping Methode mit 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) angewendet. Dadurch werden zum einen die in der Lösung entstehenden Radikale durch die Bildung des DMPO-Addukts stabilisiert; zum anderen werden die ESR-Spektren durch die Übertragung des freien Elektrons auf das DMPO überschaubarer.

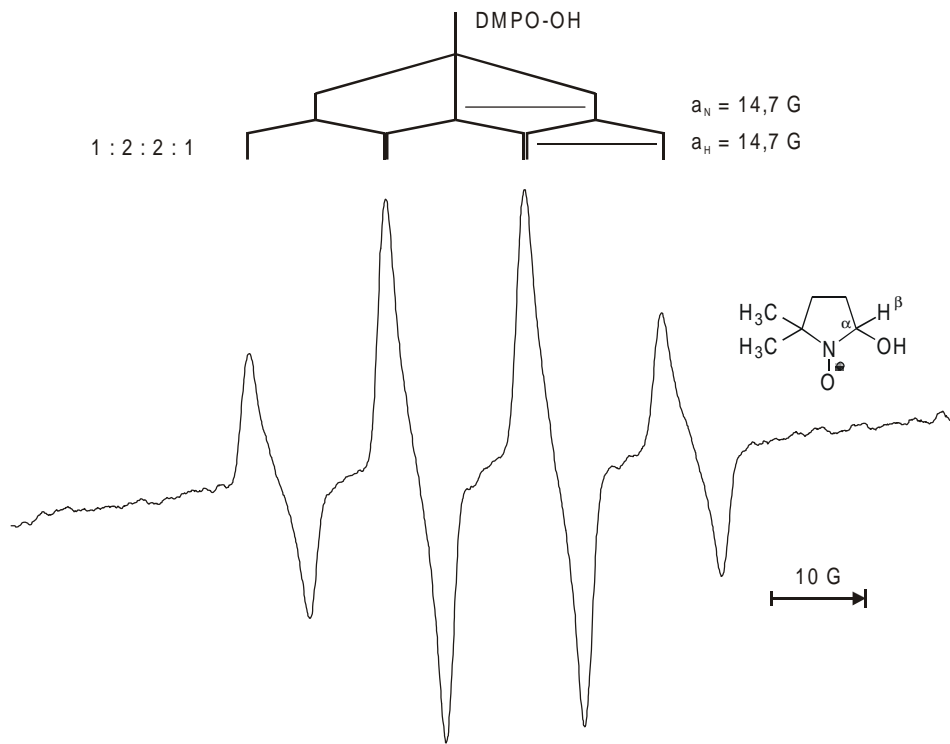
Zum Nachweis der Radikale beim Abbau von Amadori-Verbindungen mittels Spin Trapping und ESR wurde ein Modell angesetzt, das Fructose-Alanin als Ausgangsverbindung enthält. Das System wurde mit Citratpuffer auf pH 7,0 eingestellt. Um den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung zu begünstigen, enthält das System Kupferionen (50 µmol/l). Der Abbau der Amadori-Verbindung in diesem System wurde nach der Zugabe von DMPO ESR-spektroskopisch untersucht.

Bereits kurze Zeit nach der Zugabe des DMPOs zum Modellsystem kann ein ESR-Signal aufgezeichnet werden, dessen Intensität im Verlauf der Reaktion zunimmt. Nach 15 Minuten erhält man das in Abbildung 30 dargestellte Spektrum. Um auszuschließen, daß sich die hier nachgewiesenen Radikale als Artefakte aus anderen Ausgangsverbindungen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{O}_2$ ) bilden, wurden parallel Blindwerte angesetzt, die keine Amadori-Verbindung, jedoch sämtliche anderen Inhaltsstoffe enthielten. In diesem Modell konnten keine ESR-Signale und somit keine Radikale nachgewiesen werden.



**Abbildung 30: ESR-Spektrum der DMPO-Addukte aus dem wässrigen System mit Fructose-Alanin ( $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{mol/l}$  / 15 min bei Raumtemperatur)**

Alleine die Tatsache, daß sich in dem Modell mit DMPO Radikale nachweisen lassen, beweist den radikalischen Reaktionsmechanismus des oxidativen Abbaus der Amadori-Verbindung. Die genauere Auswertung des erhaltenen Spektrums läßt aber zusätzlich Aussagen über die Art der beim Abbau der Amadori-Verbindung entstandenen Radikale zu. In dem ESR-Spektrum erkennt man mehrere aufgetrennte Linien, die von unterschiedlichen DMPO-Addukten herrühren. Sehr intensiv sind die vier Linien, die von dem DMPO-Addukt des Hydroxylradikals stammen (DMPO-OH); diese Linien sind in dem Spektrum mit O gekennzeichnet. Aus dem Spektrum ergeben sich für das DMPO-OH die Kopplungskonstanten  $a_N = a_H = 14,7$  G, was in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten steht [71][72]. Die Linien zeigen die charakteristische Intensitätsverteilung (1 : 2 : 2 : 1). Dies zeigt sich vor allem bei einem Vergleich mit einem ESR-Spektrum des reinen DMPO-OH (Abbildung 31). Daneben erkennt man noch andere Linien, die allerdings eine geringere Intensität aufweisen. Von besonderem Interesse sind die mit einem X gekennzeichneten Linien. Gerade neben den beiden sehr intensiven Linien des DMPO-OH treten sie nur als Schultern auf, was in der begrenzten Auflösung des Gerätes begründet liegt.



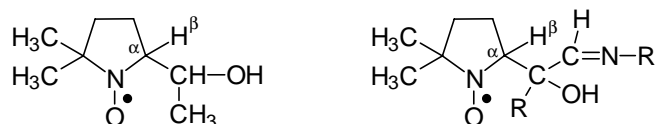
**Abbildung 31: ESR-Spektrum des DMPO-Hydroxylradikal-Addukts**

Das Spektrum selbst stellt bei der ESR-Spektroskopie immer die erste Ableitung des Signals nach der Feldstärke dar. Zusätzliche Informationen erhält man, wenn man auch die zweite Ableitung der Intensität nach der Feldstärke betrachtet. Wenn auf den auf- bzw. absteigenden Ästen der Signale mit großer Intensität weitere Linien als Schultern liegen, so resultieren daraus zwei benachbarte Wendepunkte. Diese Wendepunkte sind im Spektrum direkt zwar nur schwer auszumachen, in der zweiten Ableitung erscheinen diese dann aber als Minima bzw. Maxima (9.4, Abbildung 78). So lassen sich auch die relativ schwachen Linien, die mit (X) gekennzeichnet sind, durch Auswertung der zweiten Ableitung zusätzlich absichern.

Die Verteilung der Linien X in Abhängigkeit von der Feldstärke ist ein weiteres Charakteristikum für die vorliegenden Radikale. Aus der Berechnung der Kopplungskonstanten für diese Linien ergeben sich die Werte  $a_N = 16,3$  und  $a_H = 23,2$  (Abbildung 30). Diese Linien stammen von einem DMPO-Addukt, das aus einem Radikal mit Kohlenstoffgerüst gebildet wird. Die Kopplungskonstanten von DMPO-Addukten mit Radikalen, die über eine  $\alpha$ -Hydroxylgruppe verfügen, liegen alle in der selben Größenordnung. So ergeben sich für das DMPO-Addukt des Ethanol-Radikals (Abbildung 32) Werte von  $a_N = 16,1$  und  $a_H = 23,1$  [71]. Auch die Radikale des Glycerins ( $a_N = 15,9$  /  $a_H = 22,4$ ) und des Sorbits ( $a_N = 15,9$  /  $a_H = 22,5$ ) zeigen ein ähnliches ESR-Spektrum [72].

Die in dem eigenen System ermittelten Kopplungskonstanten lassen den Schluß zu, daß hier Radikale mit ähnlichen Strukturen vorliegen. Aus dem vorgeschlagenen Reaktionsmecha-

nismus ergibt sich auch die mögliche Bildung eines Alkylradikals mit  $\alpha$ -Hydroxylgruppe, das aus der Enaminolform der Amadori-Verbindung nach Proton-Abspaltung entsteht (1.1.4.1, Abbildung 9). Eine mögliche Struktur des entsprechenden DMPO-Addukts ist in Abbildung 32 dargestellt. Die ermittelten Kopplungskonstanten unterstützen die Bildung eines solchen Addukts.



**Abbildung 32:** DMPO-Addukt mit einem  $\alpha$ -Hydroxyethyl-Radikal (links). Mögliche Struktur des DMPO-Addukts aus dem Abbau der Amadori-Verbindung (rechts).

Ähnliche Strukturen konnte Ródio et al. [72] beim Abbau von Gluconaten unter Kupferkatalyse beobachten. Beim Spin Trapping der gebildeten Radikale mit DMPO konnte Ródio Alkylradikale nachweisen, die direkt aus der Endiolform des Gluconats nach Proton-Abspaltung entstehen und ähnliche Kopplungskonstanten aufweisen ( $a_{\text{N}} = 15,96 / a_{\text{H}} = 23,1$ ).

Ganz offensichtlich verläuft der oxidative Abbau der Amadori-Verbindung tatsächlich analog zur Autoxidation von Zuckern in einem ersten Schritt über einen  $\text{Cu}^{2+}$ -Enaminol-Komplex ab. Die eigenen ESR-spektroskopischen Untersuchungen unterstreichen diese Annahme und damit das von Kawakishi postulierte Reaktionsschema.

Die mit X gekennzeichneten Linien des DMPO-Alkylradikals im ESR-Spektrum sind relativ breit und von schwacher Intensität, da der Abbau der Amadori-Verbindung bei Raumtemperatur nur langsam abläuft. Eine Verlängerung der Inkubationszeit oder eine Erhöhung der Temperatur würde allerdings zu Lasten der Stabilität der entstehenden DMPO-Addukte gehen. Um deutlich zu machen, daß Amadori-Verbindungen grundsätzlich zur Bildung solcher Alkylradikale in der Lage sind, wurde eine einmolare Fructose-Alanin-Lösung in Gegenwart von DMPO mit Röntgenstrahlung bestrahlt. In diesem Modell werden durch die Strahlungsenergie größere Gehalte an Radikalen gebildet. Das ESR-Spektrum dieser Lösung ist in Abbildung 33 dargestellt. Man erkennt die Ähnlichkeit zu dem Spektrum, das beim oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung erhalten wurde. Auch in der bestrahlten Lösung lassen sich wieder die vier Linien des DMPO-OH erkennen (O). Zusätzlich sind die sechs Linien des DMPO-Addukts des Alkylradikals aus der Amadori-Verbindung (Abbildung 32) deutlich zu erkennen (X). Die Kopplungskonstanten des Radikals in der bestrahlten Lösung stimmen mit den Werten, die bei der Autoxidation der Amadori-Verbindung für das Alkylradikal ermittelt wurden, überein.



Dieses Hydroperoxid kann im Sinne eines *Haber-Weiss*-Mechanismus unter Bildung von Hydroxylradikalen zerstört werden (Abbildung 34 (b)). Katalysiert wird die Reaktion noch zusätzlich durch die Anwesenheit von Kupferionen, wobei die Bildung der Hydroxylradikale alternativ auch über den unter (c) gezeigten Mechanismus ablaufen kann [84].

### 3.2 Nachweis des radikalischen Abbaus von Amadori-Verbindungen mittels der DPPH-Methode

Im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung konnten in den unterschiedlichsten Phasen radikalische Zwischenstufen und Endprodukte nachgewiesen werden. Besonders zu erwähnen ist hier die Bildung von Pyrazinkation-Radikalen aus den Glykosylaminen in der sehr frühen Phase der Maillard-Reaktion und während der Bildung von Melanoidinen (1.1.5.2). Untersucht wurden die radikalischen Reaktionswege im Verlauf der Maillard-Reaktion meist an physiologischen Systemen. Bei den eigenen Untersuchungen sollte der Schwerpunkt auf Modelle gelegt werden, die bezüglich ihrer Inhaltsstoffe eine größere Relevanz für lebensmittelchemische und lebensmitteltechnologische Prozesse haben.

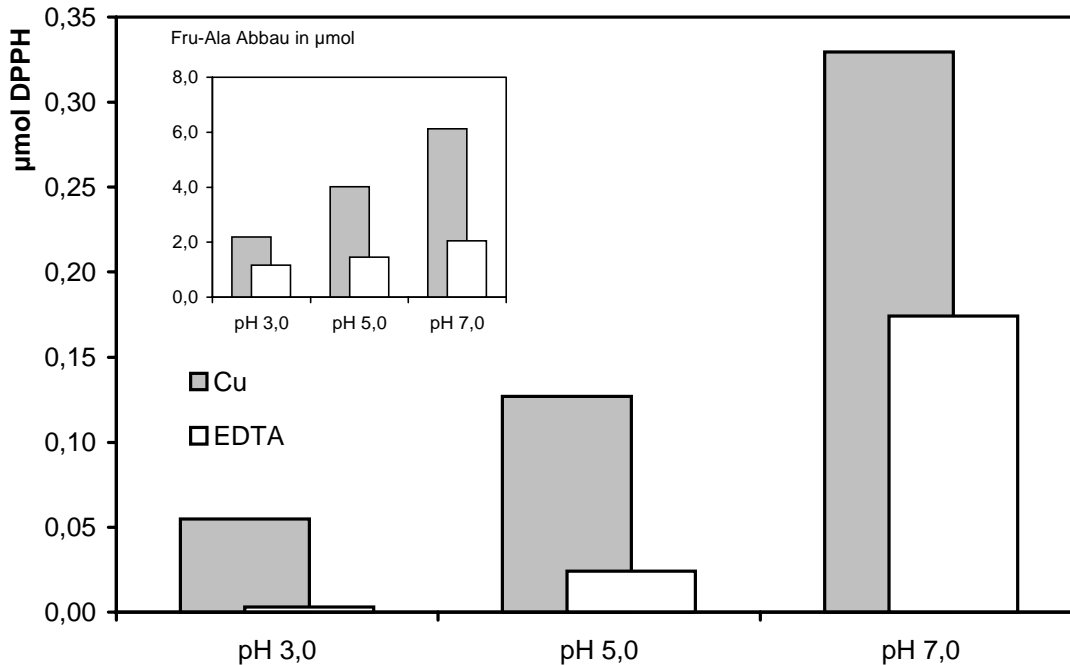
Deswegen wurden citratgepufferte wäßrige Modelle eingesetzt, die Fructose-Alanin als typische lebensmittelrelevante Amadori-Verbindung enthalten. Um den Einfluß der Metall-Katalyse auf die Bildung von Radikalen zu untersuchen, enthielten die Modelle jeweils 50 µmol/l Kupfer(II)-Ionen. Parallel dazu wurden Modelle ohne Kupferionen angesetzt, die zur Maskierung eventueller anderer Schwermetallspuren zusätzlich EDTA als Komplexbildner enthielten.

In den Systemen wurden drei unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Die Proben wurden jeweils 2 h bei 80 °C erhitzt. Der Gehalt an Radikalen nach dem Erhitzen in diesen Modellen wurde mit der DPPH-Methode (2.1.4) ermittelt; dabei stellt die Abnahme des zugesetzten DPPH-Radikals ein Maß für die radikalischen Reaktionen dar. Parallel dazu wurde in den Modellen der Fructose-Alanin-Abbau gaschromatographisch bestimmt.

Wie Abbildung 35 zeigt, ist die Abnahme des DPPH-Radikals in den untersuchten Modellen vom pH-Wert abhängig. In den Modellen ohne Kupferzusatz wird bei pH 3,0 durch die Reaktionsprodukte des Abbaus der Amadori-Verbindung noch kein DPPH• umgesetzt. Parallel dazu wird hier auch nur ein relativ geringer Anteil der Amadori-Verbindung überhaupt abgebaut. Die Abbaurate beträgt hier gerade 1,2 µmol (das entspricht einem Abbau von ca. 10 mol%). Auch bei einem pH-Wert von 5,0 werden bei Abwesenheit von Kupferionen nur 1,5 µmol (12 mol%) der eingesetzten Amadori-Verbindung abgebaut. Dementsprechend ist der radikalische Abbau von DPPH mit 0,02 µmol auch noch sehr gering. Erst bei einem pH-Wert von 7,0 steigt die Abbaurate des DPPH-Radikals und damit der radikalische Anteil beim Abbau der Amadori-Verbindung drastisch an - 0,17 µmol des vorgelegten DPPHs werden hier umgesetzt. Demgegenüber erhöht sich die Abbaurate der Amadori-Verbindung mit



2,0  $\mu\text{mol}$  allerdings nicht in dem selben Maße. Offensichtlich kommt es bei diesem pH-Wert nicht zwangsläufig zu einem stärkeren Abbau über die radikalischen Reaktionswege, vielmehr verschiebt sich das Verhältnis zwischen den radikalischen und den ionischen Prozessen zu Gunsten der Radikalbildung.



**Abbildung 35:** Abnahme des DPPH-Radikals in den verschiedenen Modellansätzen mit Fructose-Alanin (80 °C / 2 h). Das kleine Diagramm zeigt den Abbau der Amadori-Verbindung in diesen Modellen.

Die Abnahme des DPPH-Radikals in den Fructose-Alanin-Modellen steigt unter Anwesenheit von Kupferionen signifikant an, während parallel dazu auch größere Mengen der Amadori-Verbindung abgebaut werden. Dies gilt grundsätzlich für alle Modelle - unabhängig vom pH-Wert. Bei pH 3,0 beläuft sich der Abbau des Fructose-Alanins auf 2,2  $\mu\text{mol}$ , was ca. 18 mol% der Ausgangsverbindung entspricht. Bei pH 5,0 werden bereits 4,0  $\mu\text{mol}$  (34 mol%) der Amadori-Verbindung abgebaut. Parallel dazu werden bei pH 3,0 zwar trotzdem nur 0,05  $\mu\text{mol}$  DPPH umgesetzt, bei pH 5,0 sind es allerdings schon 0,13  $\mu\text{mol}$ , was eine Versechsfachung gegenüber dem Modell ohne Kupferionen darstellt. Bei pH 7,0 steigt die DPPH-Abnahme sogar auf 0,33  $\mu\text{mol}$ ; in diesem Modell wurden 6,1  $\mu\text{mol}$  (52 mol%) des Fructose-Alanins abgebaut. Durch geeignete Blindwerte konnte nachgewiesen werden, daß die Anwesenheit von Kupferionen allein bei den gegebenen pH-Werten nicht ausreicht, um das DPPH abzubauen.

Die Abnahme des DPPH-Radikals resultiert in den Modellen direkt aus dem oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung, der unter Kupfer-Katalyse verstärkt abläuft. Auch wenn die Abnahme des DPPH-Radikals nicht zwangsläufig auf Radikale in der Lösung schließen läßt,

so zeigt sich doch eindrucksvoll die Korrelation zwischen der DPPH-Abnahme und der Bildung des Glucosons. Die DPPH-Abnahme in den Modellen zeigt die gleichen Abhängigkeiten von den Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Kupferionen-Zugabe) wie die Bildung des Glucosons (vergl. 3.3.1.3).

Eine mögliche ionische Abbaureaktion des DPPHs durch einen Elektronentransfer wäre über die Enaminolform der Amadori-Verbindung, unter Bildung radikalischer Zwischenstufen, möglich [58]. Die Enaminolform der Amadori-Verbindung ist in der Lage, Kupferionen zu komplexieren und stellt in dieser Form letztlich die direkte Vorstufe zur Bildung des Glucosons dar [13][85].

Mit der DPPH-Methode konnte somit eindrucksvoll nachgewiesen werden, daß der oxidative Abbau der Amadori-Verbindung durch Kupferkatalyse beschleunigt wird. Die Steigerung der Abnahme des DPPH-Radikals bei Anwesenheit von Kupferionen ist ein Indiz für den radikalischen Charakter der Autoxidation. Besonders im neutralen Bereich ist in Lebensmitteln mit diesem alternativen Abbauweg der Amadori-Verbindung zu rechnen. Dabei benötigt die Autoxidation nicht gezwungener Maßen die Anwesenheit von Kupferionen. Offensichtlich kann der oxidative Abbau auch unabhängig von einer Metall-Katalyse über einen alternativen Reaktionsmechanismus verlaufen.

### **3.3 Die Autoxidation und die Enolisierungsreaktionen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen**

Die Autoxidation und die beiden Enolisierungsreaktionen stellen völlig unterschiedliche Abbauwege der Amadori-Verbindungen dar (vergl. 1.1.3 und 1.1.4). Da die Reaktionswege grundsätzlich unterschiedlich verlaufen, ist damit zu rechnen, daß Veränderungen einzelner Reaktionsbedingungen die verschiedenen Abbauwege auch unterschiedlich beeinflussen.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden die Enolisierungsreaktionen im direkten Vergleich zu der Autoxidation betrachtet. Es sollte geklärt werden, ob die beiden unterschiedlichen Abbauwege der Amadori-Verbindung nebeneinander ablaufen, oder ob in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen Konkurrenzsituationen auftreten. In den Modellen wurde Fructose-Alanin (Fru-Ala) - als Amadori-Verbindung aus D(+)-Glucose und L-Alanin - eingesetzt. Die Konzentration an Fru-Ala in den Modellen beträgt 12 mmol/l. Es sollten nun die Abhängigkeiten der verschiedenen Abbauwege von den einzelnen Reaktionsparametern untersucht werden. Die Modelle sind grundsätzlich citratgepuffert (0,02 mol/l), wodurch eine Kontrolle des eingestellten pH-Wertes über die Versuchsdauer möglich ist. Um quantitative Aussagen über die Bildung der unterschiedlich reaktiven  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen machen zu können, enthalten die Modelle einen doppelt molaren Überschuß an o-Phenylendiamin, das die zu untersuchenden Verbindungen zu den stabilen Chinoxalinderivaten umsetzt. Diese werden gaschromatographisch nachgewiesen.

Modellhafte Untersuchungen zur Abhängigkeit der einzelner Reaktionswege beim Abbau von Amadori-Verbindungen in Maillard-Reaktionsgemischen wurden schon verschiedentlich durchgeführt. Bei der Wahl der richtigen Ausgangsverbindungen und geeigneter Reaktionsbedingungen stellen diese Modelle eine sinnvolle und einfache Möglichkeit dar, die komplexen Vorgänge im Verlauf der Maillard-Reaktion zu untersuchen [6]. Häufig wird bei solchen Untersuchungen aber das Hauptaugenmerk nur auf einen einzelnen Reaktionsweg gerichtet (Enolisierungsreaktionen [18][57][73] oder Autoxidation [28][29][86]).

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Auswahl der Ausgangsverbindungen. Meist kommen Mischungen aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren als Maillard-Reaktionsgemische zum Einsatz. Da der Abbau der einzelnen Komponenten nicht allein über die Amadori-Verbindung verlaufen muß, kann man in solchen Modellen jedoch keine eindeutigen Aussagen über die Bedeutung der Amadori-Verbindung für die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen machen. Häufig werden auch Amadori-Verbindungen aus Glucose und Piperidin oder primären Aminen als Ausgangsverbindungen eingesetzt [18][73]. Zwar sind diese 1-Amino-Ketosen leichter präparativ darzustellen als Amadori-Verbindungen aus Glucose und der entsprechenden Aminosäure, jedoch lassen die Modelle mit den authentischen Amadori-Verbindungen viel leichter Rückschlüsse auf die Gegebenheit in realen Lebensmitteln zu.

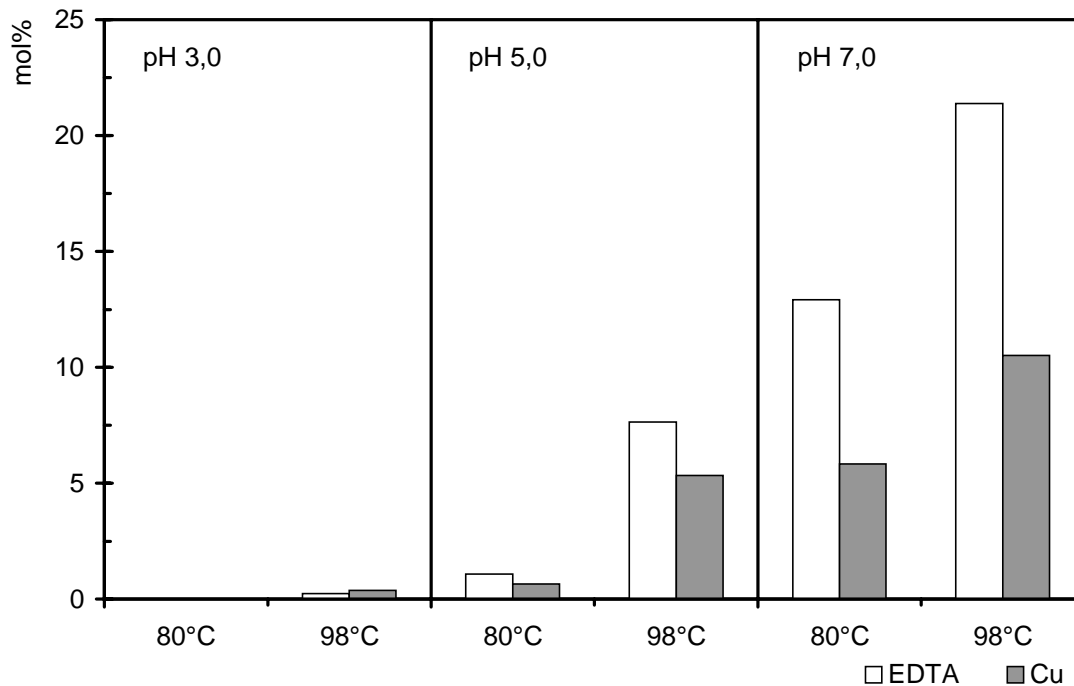
### **3.3.1 Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Modellen mit unterschiedlichen pH-Werten**

Der pH-Wert stellt einen der wichtigsten Reaktionsparameter für die Maillard-Reaktion dar. Gerade durch die Vielzahl der möglichen Reaktionen kann der pH-Wert über den Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung und so über die gebildeten End- und Zwischenprodukte mit entscheidend sein. Untersucht wurde die pH-Wert-Abhängigkeit in einem Bereich von pH 3,0 bis 7,0. Dies ist der pH-Bereich, der bei lebensmitteltechnologischen Prozessen und allgemein in Lebensmitteln von Bedeutung ist.

Dabei ist es aber häufig nicht sinnvoll, den pH-Wert als alleinige Größe zu betrachten, da es teilweise möglich ist, daß die Wirkung der übrigen Reaktionsparameter vom pH-Wert unterschiedlich beeinflußt wird. Deswegen wurden die Modelle mit unterschiedlichen pH-Werten bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (80 / 98 °C) erhitzt, bei denen hohen Ausbeuten an  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zu erwarten sind. Zusätzlich wurden die Modelle jeweils mit und ohne Kupferionen (50  $\mu\text{mol/l}$ ) angesetzt, da von einzelnen kupferkatalysierten Reaktionen bekannt ist, daß das Maß, in dem die Kupferionen katalytisch wirksam werden, stark vom pH-Wert abhängig ist [87].

### 3.3.1.1 Bildung des 1-Desoxyosons

In Abbildung 36 ist die Bildung des 1-Desoxyosons aus dem Fru-Ala in den einzelnen Modellen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.



**Abbildung 36: Bildung des 1-Desoxyosons aus Fru-Ala in Abhängigkeit vom pH-Wert mit und ohne Kupfer-Katalyse (Erhitzungsdauer: 6 h /  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{mol/l}$  / EDTA 100  $\mu\text{mol/l}$ )**

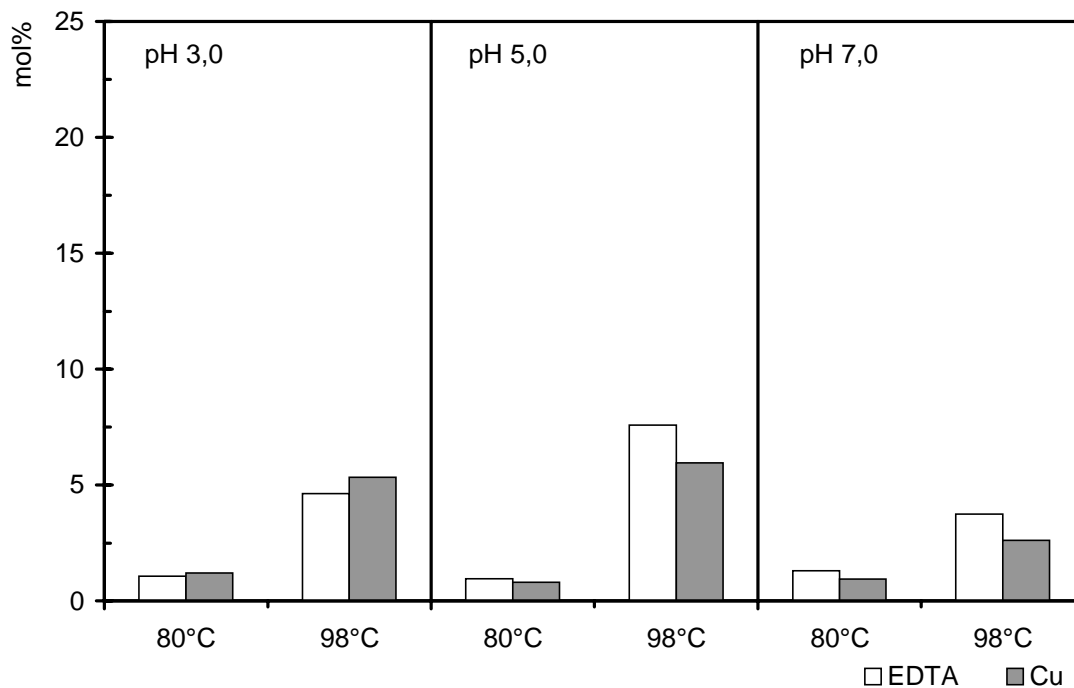
Es zeigt sich, daß die Bildung des 1-Desoxyosons eine sehr starke Abhängigkeit vom pH-Wert aufweist. Bei einem pH-Wert von 3,0 bildet sich das 1-Desoxyoson noch fast gar nicht. Mit zunehmendem pH-Wert wächst dann die Bedeutung der 2,3-Enolisierung beim Abbau der Amadori-Verbindung. So stellt das 1-Desoxyoson bei pH 7,0 und 98 °C mit 23 mol% in Abwesenheit von Kupferionen dann auch das Hauptabbauprodukt dar. Daß der Abbau von Amadori-Verbindungen im neutralen bis basischen Bereich bevorzugt über die 2,3-Enolisierung abläuft, ist allgemein bekannt [13]. So konnten auch Ledl et al. [18] das 1-Desoxyoson bei einem pH-Wert von 7,0 als Hauptprodukt in Maillard-Reaktionsgemischen nachweisen. Diese Abhängigkeit vom pH-Wert verstärkt sich noch mit steigender Temperatur; wie man schon bei den hier untersuchten Modellen erkennt, bildet sich das 1-Desoxyoson bei höheren Temperaturen bevorzugt.

In den Modellen mit Kupferionen bildet sich das 1-Desoxyoson dann in geringerem Maße, die Charakteristik der pH-Wert-Abhängigkeit bleibt jedoch auch hier erhalten. Dennoch halbiert sich gerade bei pH 7,0 der Gehalt an gebildetem 1-Desoxyoson gegenüber den Modellen ohne Kupfer; gleichzeitig verringert sich aber auch die Abbaurate der Amadori-

Verbindung (3.3.1.4). Die Konkurrenz der Autoxidation zur Enolisierungsreaktion bei Kupferzugabe wird bei diesem pH-Wert besonders deutlich.

### 3.3.1.2 Bildung des 3-Desoxyosons

Auch die Bildung des 3-Desoxyosons ist vom pH-Wert des Modells abhängig. Dies wird bei dem Vergleich der absolut gebildeten Menge an 3-Desoxyoson über den untersuchten pH-Bereich nicht ganz so deutlich (Abbildung 37). So bildet sich bei einer Erhitzungstemperatur von 98 °C zwar bei pH 5,0 mit 6 - 8 mol% deutlich mehr 3-Desoxyoson als bei pH 3,0 (ca. 5 mol%) doch werden mit sinkendem pH-Wert an sich deutlich geringere Mengen der Amadori-Verbindung abgebaut (3.3.1.4). Insgesamt läßt sich hier schon festhalten, daß das 3-Desoxyoson bei niedrigeren pH-Werten gegenüber dem 1-Desoxyoson bevorzugt gebildet wird (vergl. 3.3.1.5). Doch es läßt sich gerade an den in Abbildung 37 dargestellten Werten erkennen, daß die 1,2-Enolisierung im Vergleich zu den anderen beiden Folgereaktionen der Amadori-Verbindung (2,3-Enolisierung und Oxidation) bei ihrem pH-Wert-Optimum (pH 3,0) nur zu relativ geringen absoluten Gehalten an 3-Desoxyoson führt. Was letztlich aus der geringen Abbaurate des Fructose-Alanins bei diesem pH-Wert resultiert. Bei pH 5,0 halten sich beide Abbauewege etwa die Waage (vergl. Abbildung 36 und Abbildung 37)



**Abbildung 37: Bildung des 3-Desoxyosons aus Fru-Ala in Abhängigkeit vom pH-Wert mit und ohne Kupfer-Katalyse (Erhitzungsdauer: 6 h / Cu<sup>2+</sup> 50 µmol/l / EDTA 100 µmol/l)**

Dies scheint gerade im Bezug auf andere Publikationen [19][57], die das 3-Desoxyoson als eines der Hauptprodukte beim Abbau der Amadori-Verbindungen nachweisen konnten, ein Widerspruch zu sein. Jedoch muß man bedenken, daß in den meisten Arbeiten der Gehalt

an dem 3-Desoxyoson direkt bestimmt wird. Meist ist es bei solchen Methoden jedoch gar nicht möglich, das 1-Desoxyoson oder das Glucoson als alternative Abbauprodukte zu identifizieren, da diese aufgrund ihrer höheren Reaktivität eine deutlich kürzere Lebensdauer aufweisen. Dieser Unterschied in der Stabilität ist mit ein Grund, warum das 3-Desoxyoson erstmals bereits 1960 von Anet et al. in Maillard-Reaktionsgemischen nachgewiesen werden konnte, während der Nachweis des 1-Desoxyosons erst 1988 Ledl et al. [18] in Form des Chinoxalinderivates gelang.

Die Zugabe von Kupferionen hat gerade bei einem pH-Wert von 3,0 keinen signifikanten Einfluß auf den Gehalt an 3-Desoxyoson. Da die Glucoson-Bildung bei diesem pH-Wert noch keine große Rolle spielt, kommt es hier kaum zu einer Konkurrenz der beiden Abbauewege, wie dies etwa noch bei pH 7,0 zwischen der Autoxidation und der 2,3-Enolisierung der Fall ist (vergl. Abbildung 36 mit Abbildung 38).

Genau wie die 2,3-Enolisierung stellt auch die 1,2-Enolisierung eine Reaktion dar, die durch steigende Temperaturen bevorzugt wird (vergl. 3.3.2). Die pH-Wert-Abhängigkeit verändert sich mit steigender Temperatur jedoch auch hier nicht.

### 3.3.1.3 Bildung des Glucosons

Der radikalische Abbau der Amadori-Verbindung, der zum Glucoson führt, unterliegt ebenfalls einer eindeutigen Abhängigkeit vom pH-Wert (Abbildung 38).

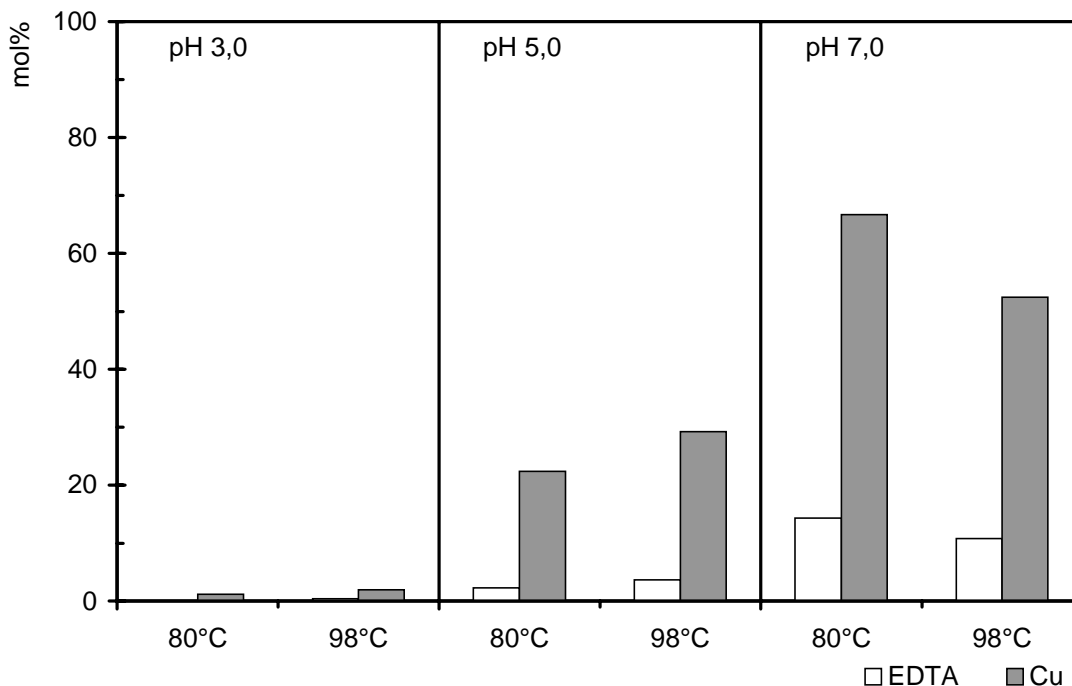
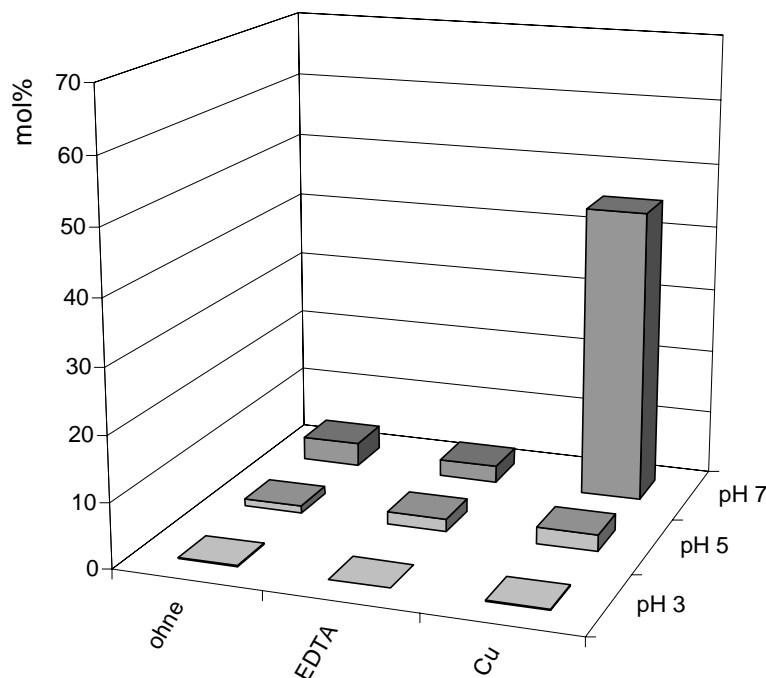


Abbildung 38: Bildung des Glucosons aus Fru-Ala in Abhängigkeit vom pH-Wert mit und ohne Kupfer-Katalyse (Erhitzungsdauer: 6 h /  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{mol/l}$  / EDTA 100  $\mu\text{mol/l}$ )

Bei pH 3,0 bildet sich das Glucoson ähnlich wie das 1-Desoxyoson in diesen Modellen noch fast gar nicht. Mit steigendem pH-Wert wird das Glucoson in sämtlichen Modellen vermehrt gebildet. Bei pH 7,0 bildet sich das Glucoson bei 80 °C mit ca. 14 mol% in Abwesenheit von Kupferionen im gleichen Maße wie das 1-Desoxyoson. Insgesamt stehen diese beiden Abbauprodukte aufgrund ihrer ähnlichen pH-Wert-Abhängigkeit in einer starken Konkurrenz zueinander. Welcher Abbauweg letztlich überwiegt, entscheiden bei den höheren pH-Werten die übrigen Reaktionsparameter.

Eine sehr wichtige Reaktionsbedingung, die den Abbau der Amadori-Verbindung zugunsten des Glucosons beeinflusst, ist die Anwesenheit von Kupferionen.

Bei sämtlichen Modellen steigt der Gehalt an Glucoson bei Kupferanwesenheit deutlich an. Besonders signifikant ist dies bei den höheren pH-Werten; die Kupfer-Katalyse wird so durch den pH-Wert zusätzlich unterstützt. Bei pH 7,0 verfünffacht sich die Menge an Glucoson bei Kupferzugabe bei beiden Erhitzungstemperaturen. Bei 80 °C bilden sich so 66 mol% Glucoson bezogen auf das eingesetzte Fructose-Alanin. Bei pH 5,0 steigt die Bildungsrate des Glucosons bei Anwesenheit von Kupferionen sogar auf das siebenfache an. Denn die direkte Konkurrenz der 2,3-Enolisierungsreaktion ist bei kleineren pH-Werten nicht so ausgeprägt.



**Abbildung 39: Bildung des Glucosons aus Fru-Ala bei unterschiedlichen pH-Werten bei niedriger Erhitzungstemperatur (40°C / 24 h)**

In Modellen, die bei niedrigeren Temperaturen (40° C) über einen längeren Zeitraum erhitzt wurden, zeigt sich, wie wichtig neben dem optimalen pH-Wert auch die Anwesenheit von

Kupferionen als weitere Reaktionsbedingung für die Bildung des Glucosons ist. Wie die eigenen Untersuchungen zeigen, spielen die beiden Enolisierungsreaktionen als Konkurrenzreaktionen hier keine Rolle (3.3.2). Nach 24 h bei 40 °C bildet sich in den Modellen mit Kupferionen bei einem pH von 7,0 dann auch das Glucoson als einzige der drei  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in signifikantem Maße (Abbildung 39). 45 mol% des eingesetzten Fructose-Alanins werden bei diesen Bedingungen zum Glucoson abgebaut. Da der Abbau an Fructose-Alanin in diesem Modell 50 mol% beträgt, werden somit 90 % der umgesetzten Amadori-Verbindung zum Glucoson oxidiert. Doch ist hier weder der pH-Wert noch die Kupferzugabe allein der begünstigende Faktor, vielmehr wirkt sich erst die Kombination dieser beider Parameter positiv auf die Bildung des Glucosons aus. Verändert man nur eine der beiden Reaktionsbedingungen, so bildet sich das Glucoson nur noch in sehr geringen Mengen (Abbildung 39). Auch Kawakishi et al. [21] konnten das Glucoson als Hauptprodukt beim Abbau von Fructose- $\beta$ -Alanin als Amadori-Verbindung unter ganz ähnlichen Bedingungen nachweisen (pH 7,2 / 40 °C / Cu 50  $\mu\text{mol/l}$ ). Auch seinen Untersuchungen zur Folge geht der Abbau der Amadori-Verbindung bei Abwesenheit von Kupferionen drastisch zurück.

### 3.3.1.4 Abbau des Fructose-Alanins

Der Abbau des Fructose-Alanins bei unterschiedlichen pH-Werten ist in Abbildung 40 dargestellt (Temperaturen: 80 und 98 °C).

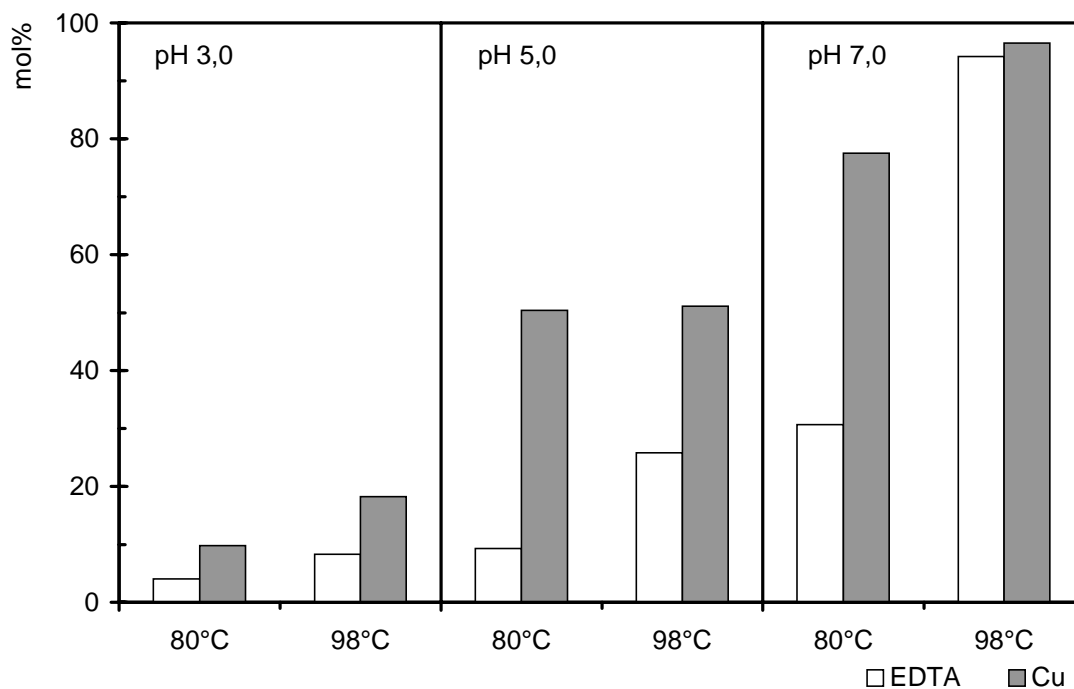


Abbildung 40: Abbau des Fructose-Alanins in Abhängigkeit vom pH-Wert bei Modellen mit und ohne Kupfer-Katalyse (Erhitzungsdauer: 6 h /  $\text{Cu}^{2+}$  50  $\mu\text{mol/l}$  / EDTA 100  $\mu\text{mol/l}$ )



Die Amadori-Verbindung ist bei pH 3,0 noch relativ stabil. In den Modellen ohne Kupferionen werden bei diesem pH-Wert lediglich 4 bzw. 8 mol% der Ausgangsverbindung abgebaut. Erst mit steigendem pH-Wert nimmt der Abbau der Amadori-Verbindung mehr und mehr zu. Bei pH 5,0 werden in den gleichen Modellen bereits 10 bzw. 25 mol% abgebaut. Im neutralen Bereich ist der Abbau des Fructose-Alanins dann am größten. Hier werden in Abhängigkeit von der Temperatur 30 bzw. 95 mol% der Ausgangsverbindung umgesetzt.

Der Abbau der Amadori-Verbindung wird also durch Erhöhung der Erhitzungstemperatur von 80 auf 98 °C bei gleichbleibendem pH-Wert jeweils verdoppelt bis verdreifacht. Bei der höheren Temperatur spielen die beiden Enolisierungsreaktionen, die zu den Desoxyosonen führen, eine größere Rolle, wodurch sich der Abbau der Amadori-Verbindung verstärkt.

Ebenso vergrößert sich der Abbau in den einzelnen Modellen bei Anwesenheit von Kupferionen, da hier über die Autoxidation größere Menge des Fructose-Alanins zum Glucoson umgesetzt werden. Dieser Effekt der Kupferionen ist in den Modellen bei 80 °C stärker ausgeprägt als in den Modellen bei 98 °C. Denn die niedrigere Temperatur begünstigt die Autoxidation zusätzlich.

In den Modellen bei 98 °C treten je nach pH-Wert die beiden Enolisierungsreaktionen verstärkt auf und es kommt zu einer direkten Konkurrenz zwischen der Bildung der Desoxyosone und des Glucosons. Der steigende Abbau der Amadori-Verbindung bei gleichbleibendem pH-Wert setzt sich hier aus der Erhöhung der Summe der Einzelreaktionen zusammen.

### **3.3.1.5 Zusammenfassender Vergleich der Ergebnisse für die pH-Wert-Abhängigkeit**

Für die Bildungswege, die zu den einzelnen Dicarbonylverbindungen führen, lassen sich klare Aussagen bezüglich ihrer Abhängigkeit vom pH-Wert treffen. Noch deutlicher als in den vorangegangenen Betrachtungen (3.3.1.1 bis 3.3.1.3) werden die Gegebenheiten, wenn man nicht nur die gebildeten Mengen an  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen isoliert betrachtet, sondern diese Gehalte auf die tatsächlich abgebaute Menge an Fructose-Alanin bezieht. So kann man herausstellen, welche Dicarbonylverbindung unter den gegebenen Bedingungen das Hauptprodukt des Abbaus darstellt. Dies relativiert vor allem die Betrachtung bei den kleineren pH-Werten, da hier ja der Abbau der Amadori-Verbindung in den untersuchten Modellen mengenmäßig sehr gering ist. So wird das Fructose-Alanin bei pH 3,0 je nach Reaktionsbedingungen nur zu 4 - 18 mol% abgebaut während der Abbau bei pH 7,0 teilweise bis zu 100 mol% beträgt.

Betrachtet man die Modelle bei pH 3,0, so erkennt man, daß die 1,2-Enolisierung den Hauptabbauweg der Amadori-Verbindung darstellt (Tabelle 3). Dies gilt grundsätzlich, unabhängig von den übrigen Reaktionsbedingungen, für sämtliche Modelle bei diesem pH-Wert. In dem Modell ohne Kupferionen wird hier bei einer Temperatur von 98 °C über die Hälfte

(55,5 mol%) der abgebauten Amadori-Verbindung zum 3-Desoxyoson umgesetzt. Lediglich bei einem Zusatz von Kupferionen tritt die Autoxidation zusätzlich in Erscheinung und drängt die 1,2-Enolisierung zurück. Bei 80 °C hält sich dann auch die Bildung des Glucosons mit der 1,2-Enolisierung in etwa die Waage. Sobald die Temperatur etwas steigt (98 °C), ist das 3-Desoxyoson jedoch auch in den kupferhaltigen Modellen das Hauptabbauprodukt. Die 2,3-Enolisierung spielt bei diesem pH-Wert nur eine sehr untergeordnete Rolle.

**Tabelle 3:** Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in den einzelnen Modellen bezogen auf die tatsächlich abgebaute Menge an Fructose-Alanin (angegeben in mol%). Das jeweilige Hauptabbauprodukt ist *fett* dargestellt.

|      |      | 3-Desoxyoson |             | 1-Desoxyoson |      | Glucoson    |             |
|------|------|--------------|-------------|--------------|------|-------------|-------------|
|      |      | EDTA         | Cu          | EDTA         | Cu   | EDTA        | Cu          |
| pH 3 | 80°C | <b>26,4</b>  |             | 0,0          |      | 0,0         |             |
|      |      |              | <b>12,3</b> |              | 0,0  |             | <b>12,0</b> |
|      | 98°C | <b>55,5</b>  |             | 2,9          |      | 5,0         |             |
|      |      |              | <b>29,2</b> |              | 2,1  |             | 10,4        |
| pH 5 | 80°C | 10,3         |             | 11,6         |      | <b>24,3</b> |             |
|      |      |              | 1,6         |              | 1,3  |             | <b>44,4</b> |
|      | 98°C | <b>29,4</b>  |             | <b>29,6</b>  |      | 14,1        |             |
|      |      |              | 11,6        |              | 10,4 |             | <b>57,2</b> |
| pH 7 | 80°C | 4,3          |             | <b>42,1</b>  |      | <b>46,7</b> |             |
|      |      |              | 1,2         |              | 7,5  |             | <b>86,0</b> |
|      | 98°C | 4,0          |             | <b>22,7</b>  |      | 11,4        |             |
|      |      |              | 2,7         |              | 10,9 |             | <b>54,4</b> |

Bei pH 5,0 sind die einzelnen Bildungswege deutlich gleichmäßiger verteilt. Hier entscheiden die Randbedingungen darüber, welcher Abbauweg favorisiert ist. Bei den Modellen mit einer Erhitzungstemperatur von 80 °C stellt das Glucoson, unabhängig von der Anwesenheit von Kupferionen, das Hauptprodukt dar. Bei der höheren Temperatur treten dann in den Modellen ohne Kupferionen die Enolisierungsreaktionen in den Vordergrund. Beide Desoxyosone bilden sich zu ca. 30 mol% bezogen auf die abgebaute Amadori-Verbindung. Insgesamt fällt auf, daß die beiden Enolisierungswege in sämtlichen Modellen bei diesem pH-Wert im gleichen Maße ablaufen. Lediglich das Verhältnis der Enolisierungsreaktionen zur Autoxidation verschiebt sich in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Kupferionen. So stellt das Glucoson in den kupferhaltigen Modellen jeweils das Hauptprodukt dar.

Diese Verschiebung, weg von den Enolisierungsreaktionen, hin zur Autoxidation, verstärkt sich mit zunehmendem pH-Wert. Bei den Modellen mit pH 7,0 spielt nun die 1,2-Enolisierungsreaktion nur noch eine sehr untergeordnete Rolle. Dafür tritt hier die

2,3-Enolisierung in Konkurrenz mit der Autoxidation. Bei diesem pH-Wert stellt die Autoxidation in den kupferhaltigen Modellen stets das Hauptabbauprodukt dar. In den bei 80 °C erhitzten Modellen werden hier 86 mol% der abgebauten Amadori-Verbindung zum Glucoson umgesetzt. Bei Abwesenheit von Kupferionen entscheidet dann die Erhitzungstemperatur, ob der Abbau bevorzugt über die 2,3-Enolisierung oder die Autoxidation erfolgt. Während bei 80 °C noch beide Reaktionswege zu ca. je 45 mol% des Gesamtabbaus beitragen, wird bei 98 °C das 1-Desoxyoson das Hauptabbauprodukt und die Autoxidation wird wieder zurückgedrängt. Bei den Modellen mit einem pH-Wert von 7,0 nimmt mit steigender Temperatur der Anteil der drei  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen am Gesamtabbau des Fructose-Alanins ab. Ganz offensichtlich sind hier noch andere alternative Abbauewege, wie etwa die Retroaldol-Reaktion, von zunehmender Bedeutung.

### **3.3.2 Abhängigkeit der Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen von der Temperatur**

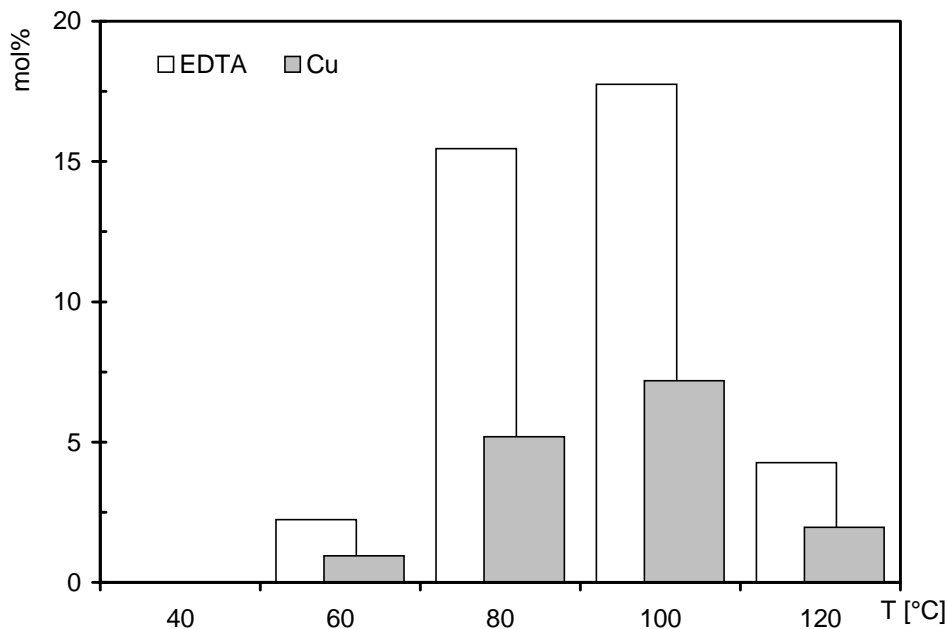
Für die Temperaturabhängigkeit der Maillard-Reaktion gilt die Faustregel, daß der Stoffumsatz mindestens verdoppelt wird, wenn man die Temperatur um 10 °C erhöht [6]. Hierbei handelt es sich natürlich nur um einen Näherungswert, da hier die Maillard-Reaktion als Ganzes betrachtet wird. Bei den eigenen Untersuchungen sollte die Temperaturabhängigkeit der Abbauewege der Amadori-Verbindung im Vordergrund stehen.

Die auf 80 bzw. 98 °C erhitzten Modelle zur Untersuchung der pH-Wert-Abhängigkeit der einzelnen Bildungswege der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen ließen bereits auch erste Trends bezüglich der Temperaturabhängigkeit zu. Zur besseren Beurteilung wurden die gleichen Modelle bei Temperaturen zwischen 40 und 120 °C für sechs Stunden erhitzt. In diesen Modellen wurde der pH-Wert 7,0 eingestellt, da hier der Abbau des Fructose-Alanins begünstigt ist, und man bei diesem pH-Wert sehr gut die Konkurrenz zwischen der Autoxidation und den Enolisierungsreaktionen beobachten kann. Die Modelle wurden jeweils mit und ohne Kupferionen (50  $\mu\text{mol/l}$ ) angesetzt.

#### **3.3.2.1 Bildung des 1-Desoxyosons**

Betrachtet man die über eine 2,3-Enolisierung erfolgende Bildung des 1-Desoxyosons, so läßt sich erkennen, daß diese bis zu einer Temperatur von 100 °C durch Temperaturerhöhung beschleunigt wird (Abbildung 41). Bei niedrigen Temperaturen (40 °C) bildet sich das 1-Desoxyoson noch gar nicht. Auch bei 60 °C bilden sich in den Modellen ohne Kupferionen lediglich 2 mol%. Erst ab 80 °C gewinnt die 2,3-Enolisierung an Bedeutung. Bei dieser Temperatur werden bereits ca. 16 mol% der eingesetzten Amadori-Verbindung zum 1-Desoxyoson umgesetzt. Bei 100 °C durchläuft die Bildungsrate des 1-Desoxyosons ein Maximum - hier werden 18 mol% gebildet. Bei steigender Temperatur

nimmt die Bildungsrate jedoch wieder ab. Bei 120 °C werden dann auch nur noch 4 mol% zum 1-Desoxyoson umgesetzt. Bei Anwesenheit von Kupferionen wird bei sämtlichen Temperaturen weniger 1-Desoxyoson gebildet. Generell wird die Bildungsrate halbiert bis gedrittelt. Die Charakteristik der Temperaturabhängigkeit mit dem Maximum bei 100 °C ist jedoch auch in den Modellen mit Kupferionen erkennbar.



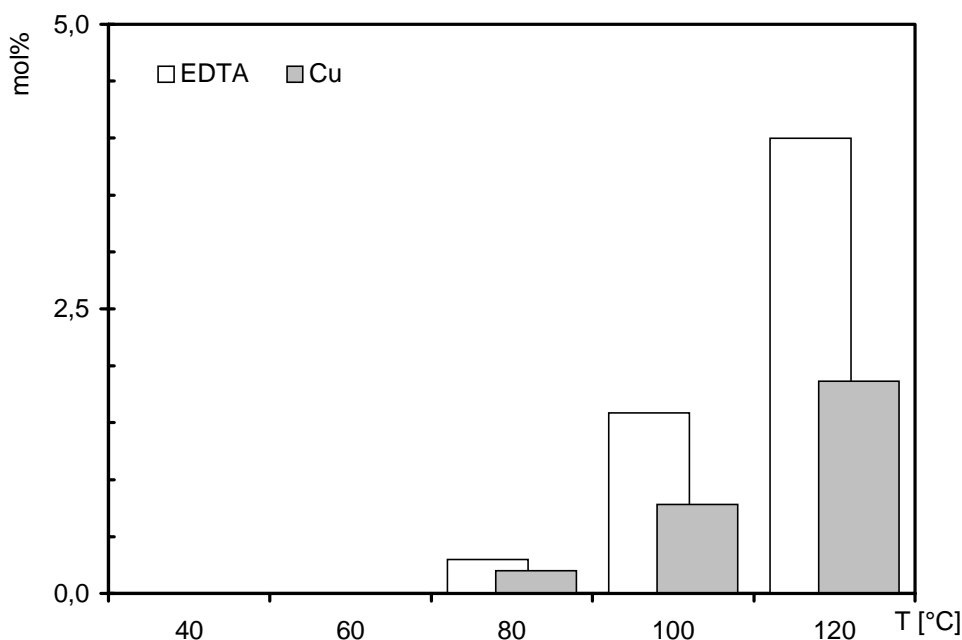
**Abbildung 41:** Bildung des 1-Desoxyosons aus Fru-Ala in Abhängigkeit von der Temperatur bei Modellen mit und ohne Kupfer-Katalyse (pH 7,0 / Erhitzungsdauer: 6 h)

### 3.3.2.2 Bildung des 3-Desoxyosons

Grundsätzlich spielt die 1,2-Enolisierung bei pH 7,0 gegenüber der 2,3-Enolisierung und der Glucoson-Bildung nur eine untergeordnete Rolle. Trotzdem kann man an den untersuchten Modellen sehr gut die Temperaturabhängigkeit der Bildung des 3-Desoxyosons erkennen (Abbildung 42).

Auch das 3-Desoxyoson wird bevorzugt bei höheren Temperaturen gebildet. Bei Temperaturen bis 60 °C kann in den untersuchten Modellen noch kein 3-Desoxyoson nachgewiesen werden. Bei 80 °C beginnt dann der Abbau der Amadori-Verbindung über die 1,2-Enolisierung. Mit steigender Temperatur nimmt die Bildungsrate des 3-Desoxyosons mehr und mehr zu. Bei 100 °C bilden sich ca. 2 mol%; bei 120 °C sind dann schon 4 mol% der Amadori-Verbindung zum 3-Desoxyoson umgesetzt. Insgesamt ergibt sich für die 1,2-Enolisierung über dem untersuchten Temperaturbereich kein Maximum, wie dies noch für die 2,3-Enolisierung der Fall war. Die Bildung des 3-Desoxyosons steigt hier mit zunehmender Temperatur kontinuierlich an.

Bei Anwesenheit von Kupferionen ergibt sich für die 2,3-Enolisierung der Amadori-Verbindung das gleiche Bild wie für die 1,2-Enolisierung. Auch hier wird die Bildungsrate bei sämtlichen Temperaturen halbiert.



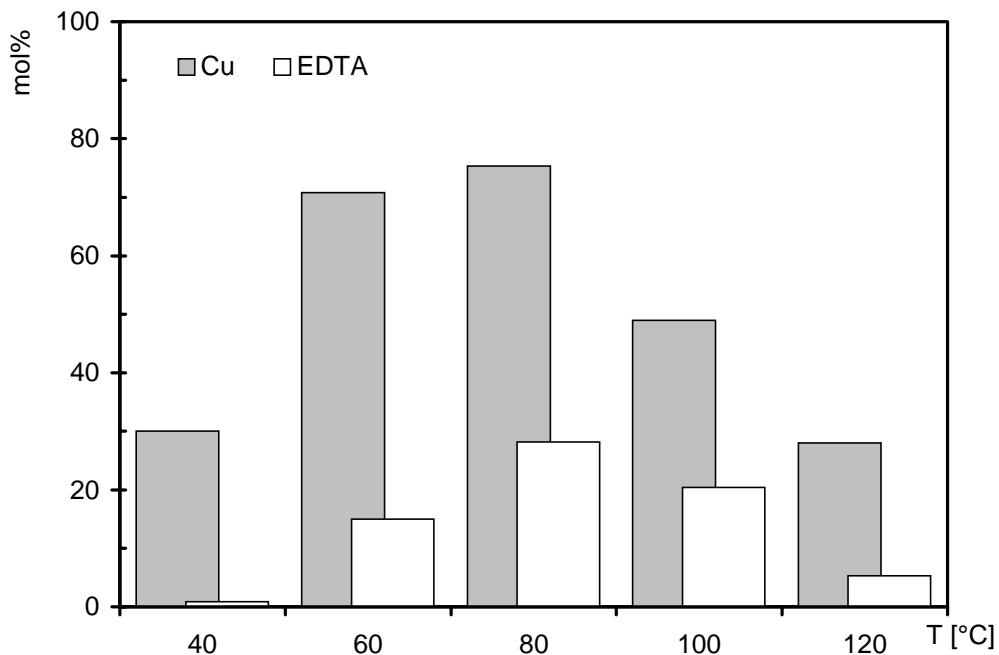
**Abbildung 42:** Bildung des 3-Desoxyosons aus Fru-Ala in Abhängigkeit von der Temperatur bei Modellen mit und ohne Kupfer-Katalyse (pH 7,0 / Erhitzungsdauer: 6 h)

### 3.3.2.3 Bildung des Glucosons

Für die Autoxidation der Amadori-Verbindung ergibt sich eine grundsätzlich andere Temperaturabhängigkeit als bei den Enolisierungsreaktionen. In den Modellen ohne Kupferionen spielt die Bildung des Glucosons bei einer Temperatur von 40 °C noch keine Rolle. Bei 60 °C steigt die Bildungsrate dann allerdings an. Hier werden schon 15 mol% der Amadori-Verbindung zum Glucoson umgesetzt. Bei 80 °C steigt der Glucoson-Gehalt weiter an. Mit ca. 29 mol% ist das Glucoson hier - wie auch schon in dem Modell mit 60 °C - das Hauptabbauprodukt der Amadori-Verbindung. Die Bildungsrate durchläuft bei dieser Temperatur ihr Maximum. Bei 100 °C werden nur noch ca. 20 mol% Glucoson gebildet. Bei dieser Temperatur wird es somit in ähnlichem Maße wie das 1-Desoxyoson gebildet. Mit steigender Temperatur geht dann die Bildung des Glucosons weiter zurück. Bei 120 °C werden nur noch 5 mol% der Amadori-Verbindung zum Glucoson umgesetzt.

Für die Bildung des Glucosons hat die Anwesenheit von Kupferionen einen größeren Einfluß auf die Temperaturabhängigkeit, als dies noch bei den Enolisierungsreaktionen der Fall war. Bei Zusatz von Kupferionen wird das Glucoson vermehrt gebildet. Je nach Temperatur wird die Bildungsrate mehr als verdoppelt bis verfünffacht. Auch hier erkennt man ein Maximum

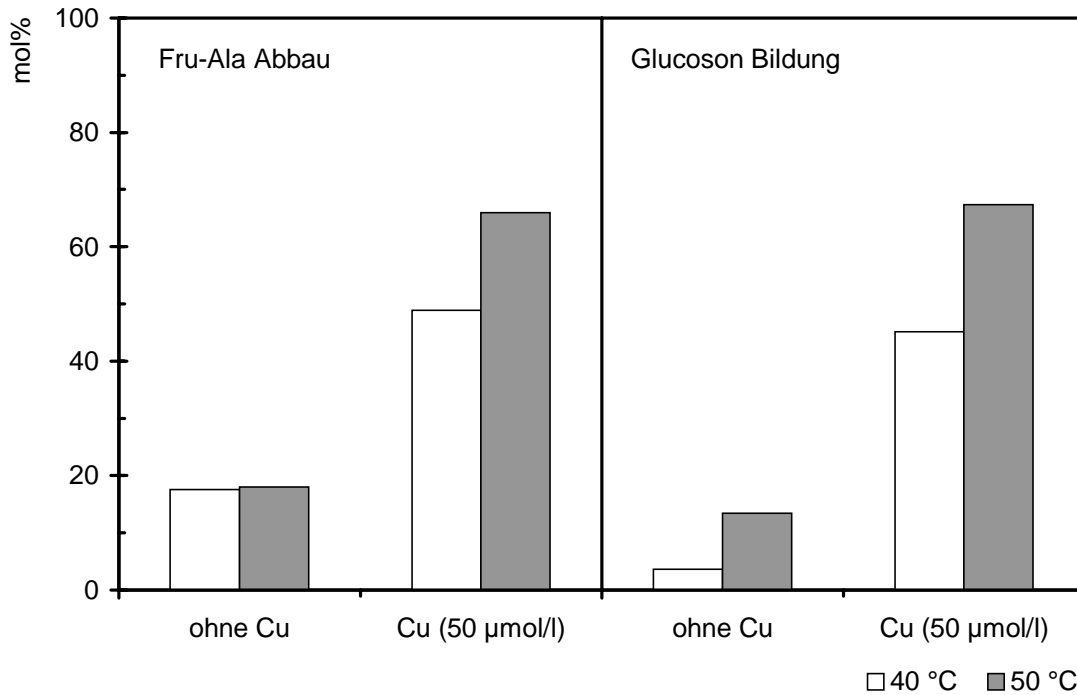
der Bildungsrate bei 80 °C - hier sind bereits 75 mol% zum Glucoson umgesetzt. Mit zunehmender Temperatur nimmt der Gehalt an Glucoson auch bei Anwesenheit von Kupferionen ab.



**Abbildung 43:** Bildung des Glucosons aus Fru-Ala in Abhängigkeit von der Temperatur bei Modellen mit und ohne Kupfer-Katalyse (pH 7,0 / Erhitzungsdauer: 6 h)

Interessant ist jedoch die Steigerung der Bildungsrate bei niedrigeren Temperaturen. Bei 40 °C ist die Zugabe von Kupferionen ausschlaggebend für die Bildung des Glucosons. Während die Autoxidation ohne Kupfer-Katalyse bei dieser Temperatur praktisch keine Rolle spielt, bilden sich unter Kupfer-Katalyse schon innerhalb von 6 h 30 mol% Glucoson. Wie relevant die Autoxidation beim Abbau der Amadori-Verbindung gerade bei den niedrigeren Temperaturen ist, zeigt sich im direkten Vergleich der Abbaurate mit der Bildungsrate des Glucosons bei 40 °C und 50 °C (Abbildung 44).

Ohne Kupferionen werden in den Modellen bei beiden Temperaturen in 24 h nur ca. 19 mol% der Amadori-Verbindung abgebaut. Dementsprechend bilden sich hier auch verhältnismäßig geringe Gehalte an Glucoson - die Desoxyosone werden bei diesen Modellen noch gar nicht gebildet. Bei Anwesenheit von Kupferionen steigt die Abbaurate der Amadori-Verbindung drastisch an. Bei 40 °C werden bereits ca. 50 mol% des Fructose-Alanins abgebaut, bei einer Temperatur von 50 °C sind es dann schon 68 mol%. Die Steigerung der Abbaurate bei Zugabe von Kupferionen resultiert bei diesen Temperaturen allein aus einem Anstieg der Autoxidation. So bildet sich bei 40 °C 45 mol% Glucoson über diesen Abbauweg während bei 50 °C sogar 67 mol% der Amadori-Verbindung umgesetzt werden (Abbildung 44). Damit läuft über 90 % des gesamten Abbaus bei diesen Reaktionsbedingungen über die Autoxidation ab.



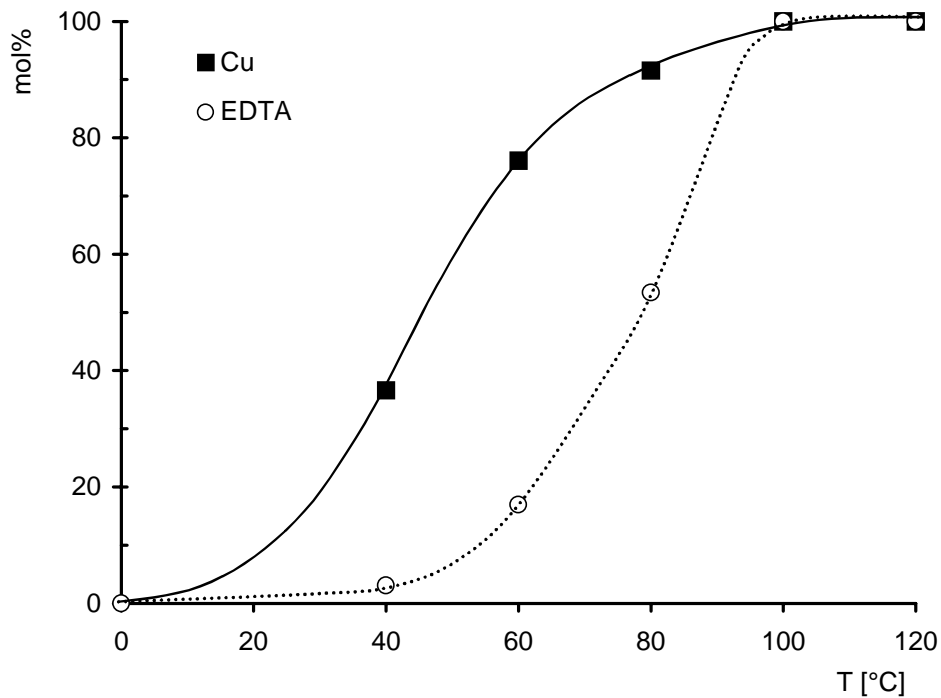
**Abbildung 44:** Bildung des Glucosons und Abbau des Fructose-Alanins in den Modellen mit niedrigen Temperaturen (pH 7,0 / Erhitzungsdauer 24 h)

### 3.3.2.4 Abbau des Fructose-Alanins

Der Abbau der Amadori-Verbindung steigt natürlich mit zunehmender Temperatur an (Abbildung 45).

In den Modellen ohne Kupferionen kommt der Abbau erst bei Temperaturen ab 60 °C in Gang. Während bei 40 °C nur 3 mol% abgebaut werden, sind es hier schon 17 mol%. Der bevorzugte Abbauweg ist hier noch die Autoxidation. Bei einer Temperatur von 80 °C werden schon 53 mol% der Amadori-Verbindung abgebaut. Zum einen durchläuft die Autoxidation bei dieser Temperatur ihr Maximum, zum anderen gewinnen die Enolisierungsreaktionen bei den steigenden Temperaturen an Bedeutung. Bei Temperaturen ab 100 °C wird das Fructose-Alanin während eines Erhitzungszeitraumes von 6 h komplett abgebaut. Die Konkurrenz der Enolisierungsreaktionen mit der Autoxidation wächst; das Verhältnis der Abbauraten wird etwas zu Gunsten des 1-Desoxyosons verschoben.

Bei Anwesenheit von Kupferionen verschiebt sich der Beginn des Abbaus der Amadori-Verbindung zu niedrigeren Temperaturen hin. Hier werden bei 40 °C nach 6 h bereits 37 mol% des Fructose-Alanins abgebaut. Die kupferkatalysierte Autoxidation ist hier für den Anstieg der Abbaurate verantwortlich, denn die hierbei gebildete Menge an Glucoson beträgt bereits ca. 30 mol%.



**Abbildung 45:** Abbau des Fructose-Alanins in Abhängigkeit von der Temperatur bei Modellen mit und ohne Kupfer-Katalyse (pH 7,0 / Erhitzungsdauer: 6 h)

Dieser ansteigende Trend bei Kupferionen-Zugabe verstärkt sich mit steigenden Temperaturen zunehmend. Bei 80 °C - dem Optimum der Autoxidation - werden schon 92 mol% der Amadori-Verbindung abgebaut und 75 mol% Glucoson gebildet. Bei Temperaturen ab 100 °C ist die Amadori-Verbindung auch in den Modellen mit Kupferionen komplett umgesetzt worden.

### 3.4 Die Kupfer-Katalyse bei der autoxidativen Glucoson-Bildung

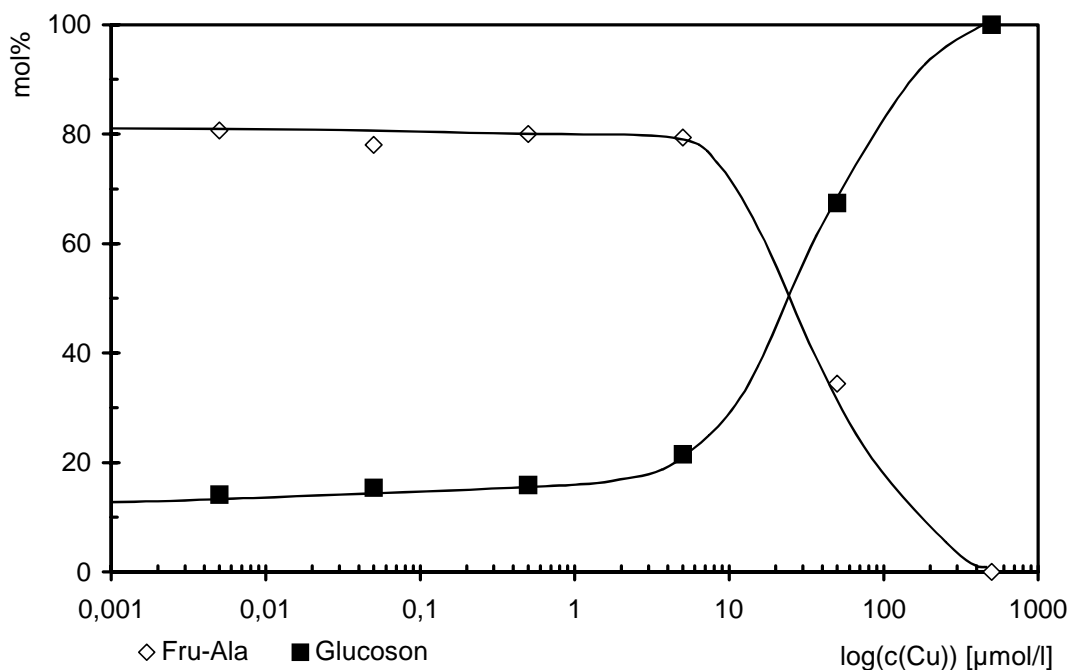
Wie bereits die vorangegangenen Modellversuchen belegten, bildet sich das Glucoson beim Abbau der Amadori-Verbindung bevorzugt bei Anwesenheit von Kupferionen. Es sollte nun geklärt werden, inwieweit die Kupfer-Katalyse von der Kupferionen-Konzentration abhängig ist. Interessant ist hierbei jedoch auch die Frage nach den anderen Inhaltsstoffen der Modelle, wie etwa der Citronensäure oder dem EDTA. Denn diese Verbindungen können in ihrer Eigenschaft als Komplexbildner oder Synergisten sowohl prooxidativ als auch antioxidativ auf katalytische Reaktionen wirken.

Angesetzt wurden Modelle mit einem pH-Wert von 7,0, die für 24 h bei 50 °C erhitzt wurden. Wie die vorangegangenen Untersuchungen zeigten (vergl. Abbildung 44), kann man bei diesen Bedingungen die Autoxidation noch als alleinigen Abbauweg der Amadori-Verbindung beobachten.



### 3.4.1 Einfluß unterschiedlicher Kupferionen-Konzentrationen auf die Bildung des Glucosons

Der Einfluß unterschiedlicher Kupferionen-Konzentrationen auf die Bildung des Glucosons ist in Abbildung 46 dargestellt. Es zeigt sich, daß unterhalb einer Kupferkonzentration von ca. 1  $\mu\text{mol/l}$  keine Proportionalität zwischen dem Kupfergehalt und der Bildung des Glucosons besteht. Zwar bildet sich das Glucoson bei den gegebenen Reaktionsbedingungen (50 °C / 24 h / pH 7,0) zu ca. 13-15 mol%, doch hat eine Veränderung der Kupferkonzentration unterhalb dieser Schwelle keinen signifikanten Einfluß auf die gebildete Menge. Ebenso verhält es sich mit dem Abbau der Amadori-Verbindung. Einheitlich werden über diesen Konzentrationsbereich ca. 20 mol% des Fructose-Alanins abgebaut.



**Abbildung 46:** Abbau des Fructose-Alanins und Bildung des Glucosons in Modellen mit Citrat-Pufferung in Abhängigkeit von der Kupferionen-Konzentration (pH 7,0 / 50 °C / 24 h)

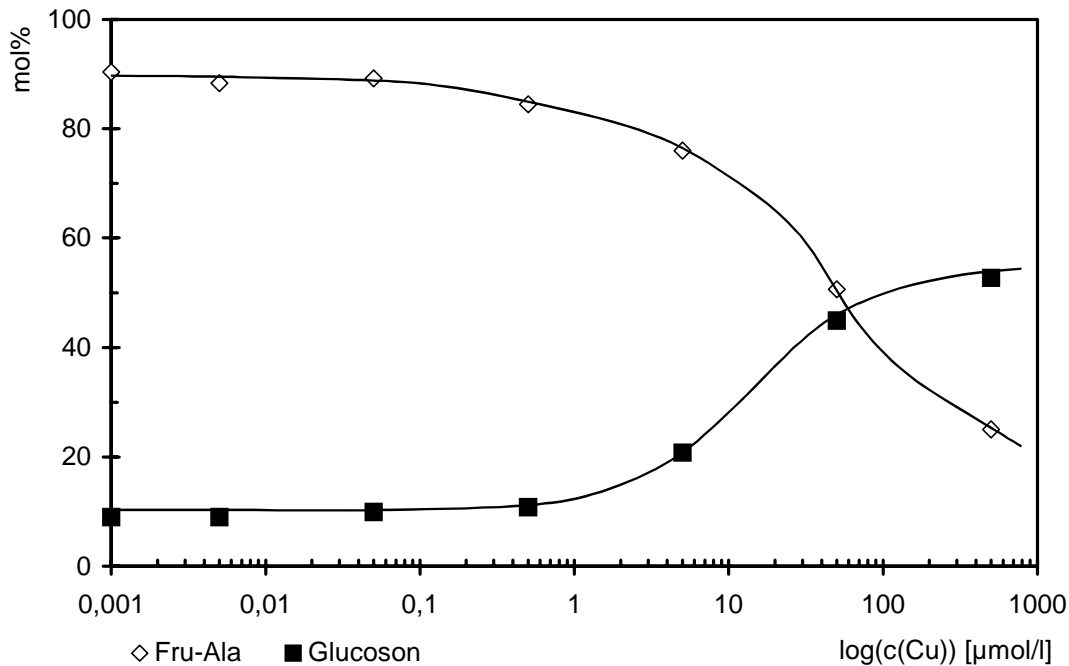
Erst wenn die Kupferkonzentration einen Wert von 5  $\mu\text{mol/l}$  überschreitet, vergrößert sich die Abbaurate des Fructose-Alanins und die Bildungsrate des Glucosons. Bei einer Kupferkonzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  (entspricht den Modellen aus 3.1) werden bereits 65 mol% des Fructose-Alanins zum Glucoson abgebaut. Bei einer weiteren Verzehnfachung der Kupferkonzentration ist die Amadori-Verbindung dann vollständig abgebaut worden. Parallel dazu steigt in den Modellen mit höheren Kupferkonzentrationen auch die Menge des gebildeten Glucosons logarithmisch an, bis bei dem Modell mit 500  $\mu\text{mol/l}$  Kupferionen die Bildungsrate 100 mol% der Ausgangsverbindung erreicht hat.

Für den Einfluß der Kupferkonzentration auf die Bildung des Glucosons ergibt sich somit ein Schwellenwert von 5  $\mu\text{mol/l}$ , oberhalb dessen eine Erhöhung des Kupfergehaltes zu einer erhöhten Bildung des Glucosons führt.

### 3.4.2 Einfluß von Puffersubstanzen auf die Bildung des Glucosons

Die Bildung der verschiedenen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen ist stark vom pH-Wert des jeweiligen Mediums abhängig. Aussagen über diese Abhängigkeit kann man nur machen, wenn der pH-Wert des Mediums verlässlich eingestellt wird. Um zu gewährleisten, daß sich der pH-Wert während der Erhitzung durch die ablaufenden Reaktionen nicht verändert - und somit das Ergebnis verfälscht wird - müssen die Modelle gepuffert werden. Als Puffersubstanz wird in diesem Fall das Natriumsalz der Citronensäure eingesetzt. Das Pufferungsvermögen der Citronensäure reicht über dem untersuchten pH-Bereich aus. Des weiteren ist Citronensäure die organische Säure, die auch in Lebensmitteln mit Abstand am häufigsten und in den größten Mengen auftritt. Aus der Verwendung von Citronensäure als Puffersubstanz ergibt sich jedoch ein Problem. Citronensäure neigt dazu, Schwermetall-Komplexe auszubilden. Es ist somit zu erwarten, daß sich auch in den Modellen Kupfer-Citrat-Komplexe ausbilden, zumal die Citronensäure in den Modellen bezogen auf den Gehalt an Kupfer in einem vierhundertfachen Überschuß vorliegt. Die Ergebnisse der wäßrigen Modelle zeigten jedoch, daß die kupferkatalysierte Oxidation der Amadori-Verbindung durch die Anwesenheit von Citronensäure nicht gehemmt wird. Es sollte geklärt werden, ob die Anwesenheit von Citrat als Puffersubstanz grundsätzlich einen Einfluß auf den Abbau des Fructose-Alanins hat. Von Interesse war vor allem, ob der nachgewiesene Schwellenwert für die Kupfer-Katalyse von 5  $\mu\text{mol/l}$  im Zusammenhang mit der Bildung von Kupfer-Citrat-Komplexen in Erscheinung tritt. Der Einfluß der Kupferkonzentration auf die Bildung des Glucosons wurde deshalb auch in ungepufferten Systemen untersucht.

Wie aus Abbildung 47 hervorgeht, stellt sich auch in den Modellen ohne Puffersubstanzen ebenfalls bei einer Kupferkonzentration von ca. 5  $\mu\text{mol/l}$  ein Schwellenwert für die Kupferkatalyse ein. Erst oberhalb dieser Konzentration kommt es zu einem erhöhten Abbau der Amadori-Verbindung. Die Abbaurate ist aber verglichen mit den citratgepufferten Modellen etwas geringer. So bildet sich das Glucoson bei einer Kupferkonzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  zu 45 mol% (in den gepufferten Systemen waren es hier schon 65 mol%). Steigt die Kupferkonzentration auf den zehnfachen Wert an, so flacht die Kurve ab. Während die Amadori-Verbindung bei dieser Kupferkonzentration in den gepufferten Systemen vollständig zum Glucoson umgesetzt wird (Abbildung 46), bilden sich in dem ungepufferten System nur 53 mol%.



**Abbildung 47: Abbau des Fructose-Alanins und Bildung des Glucosons in Modellen ohne pH-Pufferung in Abhängigkeit von der Kupferionen-Konzentration (pH 7,0 / 50 °C / 24 h)**

Es ist bekannt, daß Citronensäure bzw. Citrat auf den Abbau von Amadori-Verbindungen einen katalytischen Effekt hat [25]. In den untersuchten wäßrigen Modellen scheint sich dies in einem gewissen Maße zu bestätigen. Interessant ist jedoch vor allem der Einfluß, den die Citronensäure als potentieller Komplexbildner auf die Kupfer-Katalyse hat.

Inwieweit das Kupfer durch die Citronensäure komplex gebunden vorliegt, hängt von der Stabilitätskonstante des jeweiligen Komplexes bei gegebenem pH-Wert ab. Kupfer bildet in wäßrigen Lösungen im Bereich von pH 2,6 bis pH 11 Komplexe mit Citronensäure aus. Je nachdem, in welcher Form die dreiprotonige Säure bei dem jeweiligen pH-Wert vorliegt, bilden sich unterschiedliche Komplexe mit unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten.

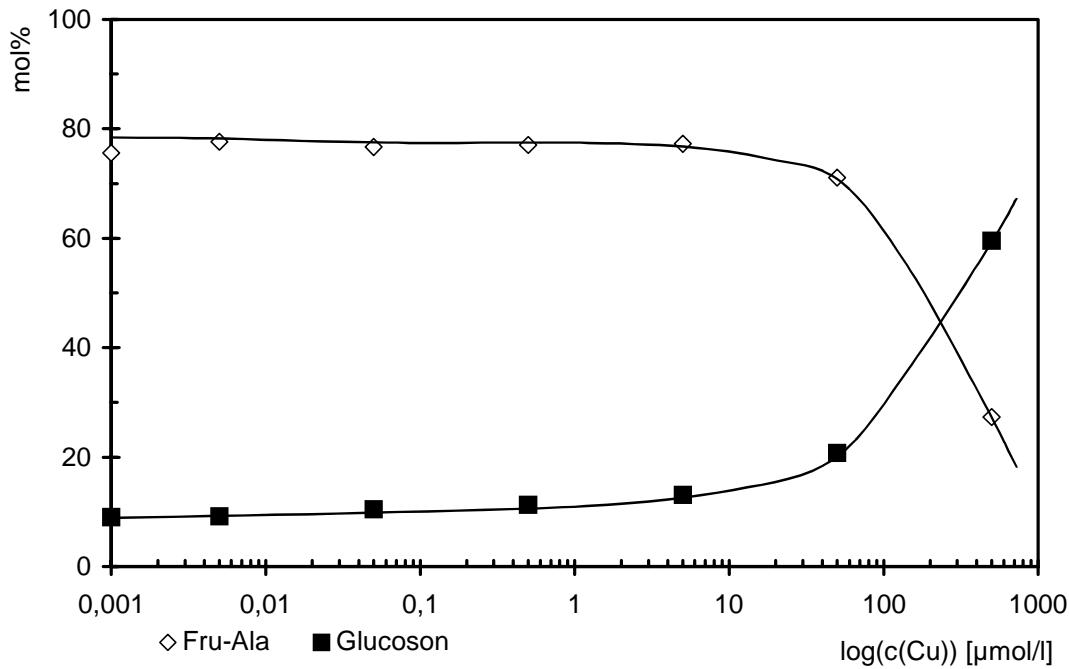
Unter Berücksichtigung der pK-Werte für die Protonierung der Citronensäure ( $pK_1=3,09$  /  $pK_2=4,74$  /  $pK_3=5,41$ ) kann man davon ausgehen, daß bei den drei untersuchten pH-Werten die in Tabelle 4 dargestellten Komplexe vorliegen können, die jedoch unterschiedlich stabil sind [88][89].

**Tabelle 4: pK-Werte von möglichen Kupfer-Citrat-Komplexen bei unterschiedlichen pH-Werten**

| pH  | mögliche Kupfer-Komplexe   | pK-Wert |
|-----|--|---------|
| 3,0 | $\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{Citrat}^- \leftrightarrow \text{CuH}_2\text{Citrat}^+$ | 2,26    |
| 5,0 | $\text{Cu}^{2+} + \text{HCitrat}^{2-} \leftrightarrow \text{CuHCitrat}$                  | 3,42    |
| 7,0 | $2 \text{Cu}^{2+} + \text{Citrat}^{3-} \leftrightarrow \text{Cu}_2\text{Citrat}^+$       | 8,10    |

Allgemein gilt, daß Schwermetall-Komplexe keine Rolle spielen, wenn der pK-Wert unterhalb von drei liegt [90]. Daraus folgt für die Modelle, daß der bei pH-Wert 3,0 angegebene Kupfer-Citrat-Komplex nicht stabil genug ist, und es so zu keiner Komplexbildung durch die Citronensäure kommt. Ebenso kann eine Komplexbildung bei einem pH-Wert von 5,0 weitgehend ausgeschlossen werden. Nur der Komplex bei pH 7,0 ist stabil genug, um das Kupfer zu binden. Demnach könnte man erwarten, daß bei diesem pH-Wert die Kupferzugabe ohne Wirkung bleibt bzw. eine geringere Wirkung ausübt, da das Kupfer als Citrat-Komplex vorliegt und nicht katalytisch wirken kann. Die Untersuchungen an den wäßrigen Medien ergeben jedoch, daß die Citronensäure als Puffersubstanz keineswegs die Kupfer-Katalyse behindert. Vielmehr werden die Kupferionen durch die Citronensäure bei diesem pH-Wert in Lösung gehalten. Dies sieht man sehr gut im Vergleich zu den ungepufferten Systemen. Bei einer Kupferkonzentration von 500 µmol/l konnte man erkennen, daß ein Teil des Kupfers bereits als Hydroxid ausfiel. Als Folge davon erreicht die Abbaurate der Amadori-Verbindung hier nicht den Wert des gepufferten Systems (Abbildung 47). Bei Anwesenheit von Citronensäure jedoch wird diese hohe Kupferkonzentration in dem Modell in Lösung gehalten und es kommt so zu einem vollständigen Abbau der Amadori-Verbindung unter Bildung des Glucosons.

Die katalytische Wirkung der Citronensäure bzw. Citrat auf den Abbau der Amadori-Verbindung wird noch einmal deutlich, wenn man Phosphat als alternative Puffersubstanz verwendet. Auch Phosphationen wird ein katalytischer Effekt auf die Maillard-Reaktion nachgesagt, in dem es als relativ kleines Anion in der Lage ist, bei der Amadori-Umlagerung gleichzeitig als Protonendonator und -akzeptor zu fungieren [91]. Doch die eigenen Untersuchungen zeigen, daß das Phosphat auf den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung keinen verstärkenden Effekt auswirkt, denn die Abbaurate steigt in den untersuchten Modellen ebenfalls erst bei einer Kupferkonzentration von 20 - 50 µmol/l an (Abbildung 48). Und selbst bei einem Kupfergehalt von 500 µmol/l bildet sich das Glucoson nur zu 60 mol%. Zwar kann das Kupfer hier durch die Komplexbildung des Phosphats in Lösung gehalten werden, doch geht die katalytische Wirksamkeit der Kupferionen verglichen mit den Gegebenheiten im Citratpuffer etwas zurück.



**Abbildung 48:** Abbau des Fructose-Alanins und Bildung des Glucosons in Modellen mit Phosphat-Pufferung in Abhängigkeit von der Kupferionen-Konzentration (pH 7,0 / 50 °C / 24 h)

Neben den Puffersubstanzen können auch Amadori-Verbindungen und weitere Maillard-Reaktionsprodukte (MRP) zur Komplexierung der Kupferionen beitragen. Untersucht wurde das an Systemen mit Fructose-Glycin und Maillard-Reaktionsprodukten, die nicht weiter charakterisiert wurden [92]. Für die eigenen Modelle haben diese Komplexierungen jedoch keinen negativen Effekt. Denn eine Komplexierung der Übergangsmetallionen durch die Amadori-Verbindung stellt keine Behinderung des autoxidativen Abbaus dar. Es sind gerade diese Komplexe, über die die eigentliche Autoxidation als Zwischenstufe abläuft und die für die oxidative Schädigung von körpereigenen Proteinen verantwortlich sind [23]. Eine Komplexierung des Kupfers über die MRPs hingegen kann in den eigenen Modellen ausgeschlossen werden, da die Maillard-Reaktion durch die Chinoxalin-Bildung auf der Stufe der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aufgehalten wird.

### 3.4.3 Einfluß des EDTA-Gehaltes auf die Bildung des Glucosons

Das Komplexierungsvermögen einer Verbindung wie EDTA (die für sich eine vierprotonige Base darstellt) und die Stabilität des daraus resultierenden Metallkomplexes hängen maßgeblich von dem pH-Wert ab. Um eine ausreichende Komplexierung zu gewährleisten, muß der pK-Wert des jeweiligen Komplexes bei dem entsprechenden pH-Wert genügend hohe Werte annehmen. Allgemein gilt, daß der pK-Wert eines Komplexes größer als sieben sein muß, um das Metallion vollständig zu binden [90]. Für den Kupfer-EDTA-Chelatkomplex

ergibt sich in Abhängigkeit von dem jeweiligen pH-Wert eine effektive Stabilität (effektive Komplexbildungskonstante), die sich nach Gleichung 3 berechnet.

Gleichung 3:

$$pK' = pK - \lg \alpha_H$$

Damit ergeben sich für die untersuchten pH-Werte folgende Werte (Tabelle 5) für die effektive Komplexbildungskonstante  $pK'$  des Kupfer(II)-EDTA-Komplexes.

**Tabelle 5: Effektive Komplexbildungskonstante ( $pK'$ ) für die Kupfer(II)-EDTA-Komplexe in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung**

| pH  | $\lg \alpha_H$ | $pK'$        |
|-----|----------------|--------------|
| 3,0 | 10,6           | <b>8,2</b>   |
| 5,0 | 6,45           | <b>12,35</b> |
| 7,0 | 3,32           | <b>15,48</b> |

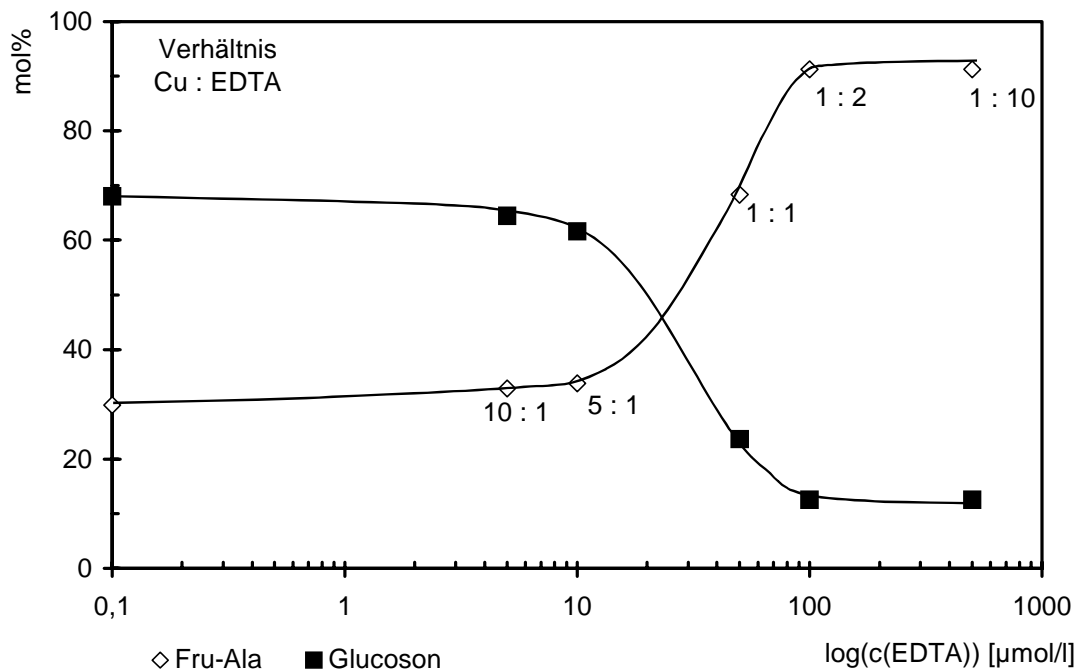
für  $\text{Cu}^{2+}$ -EDTA gilt:  $pK = 18,8$

Somit ist die Komplexbildungskonstante für die Kupfer(II)-EDTA-Komplexe über den gesamten pH-Bereich groß genug um eine ausreichende Bindung der Kupfer-Kationen in den Modellen zu gewährleisten. In den Modellen, an denen der Ablauf der Reaktion ohne Kupfer-Katalyse betrachtet werden soll, werden also eventuell auftretende Kupferspuren durch den Zusatz von EDTA wirkungsvoll komplexiert.

Teilweise ist aber auch das molare Verhältnis von EDTA zu dem komplex gebundenen Schwermetall-Kation ausschlaggebend für die antioxidative Wirkung. So konnte für die Lipidoxidation nachgewiesen werden, daß ein Eisen(II)-EDTA-Komplex sogar prooxidativ wirken kann, sofern die Komplexpartner in den gleichen molaren Mengen vorliegen. Erst bei einem Überschuß an EDTA kommt der antioxidative Effekt des Komplexbildungsreagenzes zur Geltung [93][94]. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen dem Gehalt an EDTA und dem autoxidativen Abbau der Amadori-Verbindung durch die Kupfer-Katalyse konnte in den eigenen untersuchten Modellen nicht nachgewiesen werden.

Wie Abbildung 49 zeigt, unterdrückt ein doppelt molarer Überschuß an EDTA, bezogen auf den Kupfergehalt (50  $\mu\text{mol/l}$ ), die Autoxidation der Amadori-Verbindung wirksam. Steigert man den Überschuß an EDTA (10 : 1), so wird die Abbaurate dadurch nicht weiter beeinflusst. Ein geringer Gehalt an Glucoson bildet sich auch bei einem deutlichen Überschuß an EDTA. Die Autoxidation läuft hier in dem gleichen Maße ab, wie dies in den Modellen ohne Kupfer-Katalyse der Fall ist (vergl. 3.4.1). Bei einem molaren Verhältnis von Kupferionen zu EDTA von 1 : 1 kommt es keineswegs zu einer prooxidativen Wirkung des gebildeten Kom-

plexes. Die Abbaurrate der Amadori-Verbindung wird auch hier verglichen mit dem Modell ohne EDTA stark herabgesetzt.



**Abbildung 49: Abbau des Fructose-Alanins und Bildung des Glucosons in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration bei gleichbleibender Kupfer-Konzentration (Cu 50 µmol)**

Bei einem fünffachen Überschuß an Kupferionen (bezogen auf die EDTA-Menge) hat die EDTA-Komplexierung dann keine antioxidative Wirkung mehr auf die Autoxidation der Amadori-Verbindung. Hier kommt es zu einer Abbaurrate, die mit ca. 60 - 65 mol% den Gegebenheiten in den vergleichbaren Modellen (Cu<sup>2+</sup> 50 µmol/l, siehe: 3.4.1) ohne EDTA-Zusatz entspricht.

### 3.5 Die Autoxidation von reduzierenden Zuckern im Vergleich zur Amadori-Verbindung

Die Bildung des Glucosons in den untersuchten Modellen (3.1) beruhte auf dem radikalischen Abbau der eingesetzten Amadori-Verbindung. Neben den Amadori-Verbindungen können aber auch reduzierende Zucker eine Autoxidation durchlaufen.

Für reduzierende Zucker ist die Autoxidation unter prooxidativen Bedingungen verschiedentlich nachgewiesen worden [28]. Dabei geht man auch hier von einer metallkatalysierten Oxidation der Glucose aus, durch die reaktive  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen entstehen.

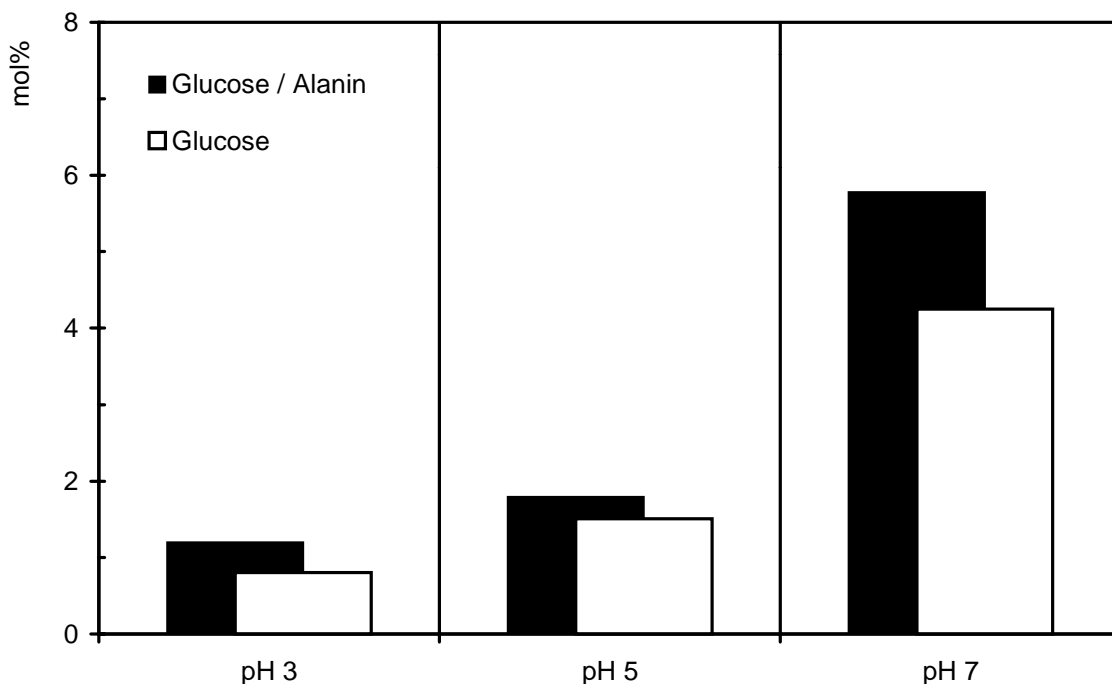
Das mögliche Reaktionsschema (1.1.4.1) geht von einer radikalischen Zwischenstufe aus und impliziert geradezu, daß das Glucoson die relevante  $\alpha$ -Dicarbonylverbindung bei der Autoxidation von Glucose darstellt.

In Systemen, in denen die nicht-enzymatische Bräunung abläuft und in denen parallel dazu Reaktionsbedingungen vorliegen, die die radikalischen Prozesse begünstigen, muß deshalb ebenfalls mit der Bildung von Autoxidationsprodukten wie dem Glucoson gerechnet werden. Somit kann das Glucoson in solchen Systemen zum einen aus der Glucose direkt gebildet werden, zum anderen ist es erwiesen, daß im Zuge der Maillard-Reaktion gebildete Amadori-Verbindungen zum Glucoson umgesetzt werden.

Um die Bedeutung der Amadori-Verbindung bei der radikalischen Bildung des Glucosons abschätzen zu können, wurden vergleichend auch Modelle mit reduzierenden Zuckern und der entsprechenden Aminosäure untersucht und der Glucoson-Gehalt als Maß für die Autoxidation bestimmt.

### 3.5.1 Einfluß der Amino-Verbindung auf die Bildung des Glucosons

Es wurden Modelle angesetzt, die zum einen D(+)-Glucose und zum anderen äquimolare Mengen an D(+)-Glucose und L-Alanin enthalten. Ansonsten entsprechen diese Modelle denen, die die korrespondierende Amadori-Verbindung enthalten (Citratpuffer / Kupferionengehalt 50 µmol/l).



**Abbildung 50:** Bildung des Glucosons bei der Autoxidation von Glucose in An- und Abwesenheit von Alanin bei unterschiedlichen pH-Werten (80°C / 6 h / Cu 50 µmol/l)

Wie aus Abbildung 50 hervorgeht, kommt es in den Modellen nach dem Erhitzen auf 80 °C für insgesamt 6 h auch in Abwesenheit der Aminosäure zur radikalischen Bildung des



Glucosons. Ähnlich wie in den Modellen mit der Amadori-Verbindung (3.3.1.3) ist auch in den Glucose-Modellen die Bildung des Glucosons abhängig vom pH-Wert.

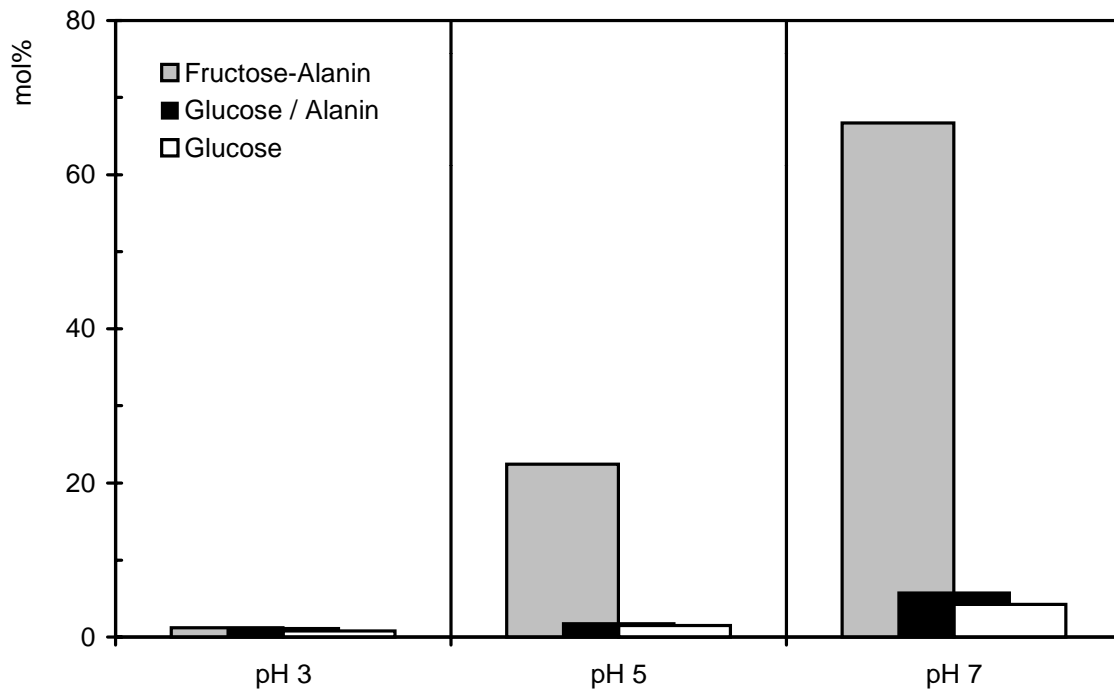
In den reinen Glucose-Systemen bildet sich das Glucoson bei pH 3,0 nur zu 0,8 mol%. Mit zunehmendem pH-Wert steigt der Gehalt an Glucoson. Bei einem pH-Wert von 5,0 bilden sich bereits 1,5 mol% Glucoson, bei pH 7,0 sind es 4,2 mol%. Bei Anwesenheit von Alanin als Aminokomponente in dem Modell erhöhen sich die Gehalte an Glucoson. Bei pH 3,0 und pH 5,0 ist dieser Anstieg zwar minimal, doch bei einem pH-Wert von sieben werden in dem Glucose/Alanin-Modell mit 5,8 mol% deutlich höhere Gehalte an Glucoson gebildet.

Die Anwesenheit von Aminosäuren hat damit einen verstärkenden Effekt auf die Autoxidation von reduzierenden Zuckern. Auch die klassischen Reaktionsprodukte der Amadori-Verbindung, wie die über die Enolisierung entstehenden Desoxyosone, können in geeigneten Systemen direkt aus den reduzierenden Zuckern gebildet werden. So gilt das als Folgeprodukt aus dem 3-Desoxyoson gebildete 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) als Indikator für das Erhitzen saurer Lebensmittel. Hier kann das HMF direkt aus der Glucose ohne den Umweg über die Amadori-Verbindung gebildet werden. Allgemein gilt jedoch, daß diese Reaktionen bei Abwesenheit von Aminen nur unter drastischen Bedingungen (sehr hohe Temperaturen bzw. pH-Werte unter 3,0 und über 8,0) ablaufen. Die Bedeutung der Amine bei der Bildung der Desoxyosone aus Hexosen liegt also darin, daß sie den Zuckerabbau gewissermaßen katalysieren, so daß diese Reaktionen bei für Lebensmittel und physiologische Systeme üblichen pH-Werten von 4,0 - 7,0 ablaufen [6].

Wie die Ergebnisse zeigen, ergibt sich ganz offensichtlich analog dazu auch auf die Autoxidation und die Bildung von Osonen ein katalytischer Effekt, der aus der Anwesenheit von Aminosäuren resultiert.

### **3.5.1.1 Die Bedeutung der Amadori-Verbindung für die Bildung des Glucosons**

Wie man bereits in Abbildung 50 erkennen konnte, erhöht sich die Bildungsrate des Glucosons aus Glucose bei Anwesenheit von Aminosäuren. Vergleicht man aber die Glucoson-Gehalte in den beiden Glucose-Modelle mit denen in den entsprechenden Systemen, die die Amadori-Verbindung enthalten, so wird die Bedeutung der Amadori-Verbindung für die Glucosonbildung deutlich (Abbildung 51). Bei einem pH-Wert von 3,0 spielt unabhängig von den Ausgangsverbindungen die Glucoson-Bildung noch kaum eine Rolle. Auch in dem Modell, das die Amadori-Verbindung enthält, werden lediglich 1,2 mol% zum Glucoson umgesetzt. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Bedeutung der Autoxidation als Abbaureaktion der Amadori-Verbindung zu. Bei pH 5,0 sind 22 mol% zum Glucoson umgesetzt worden, bei pH 7,0 sogar 66 mol%. Demgegenüber bleibt die Bildung des Glucosons in den Modellen, die nur Glucose bzw. zusätzlich die Aminosäure enthalten, auch bei den höheren pH-Werten immer unter einem Wert von 6 mol%.



**Abbildung 51: Bildung des Glucosons in Abhängigkeit von den Ausgangsverbindungen bei unterschiedlichen pH-Werten (80°C / 6 h / Cu<sup>2+</sup> 50 µmol/l)**

Die Autoxidation der Glucose führt zwar zum Glucoson, die Bildungsrate bleibt aber deutlich unter den Gehalten, die in den Modellen mit der Amadori-Verbindung erreicht werden.

Die besondere Bedeutung der Amadori-Verbindung für die Maillard-Reaktion ist bereits verschiedentlich untersucht worden. Nimmt man zum Beispiel die Bräunung ( $E_{430\text{ nm}}$ ) als Maß für den Verlauf der Maillard-Reaktion, so steigt der Grad der Bräunung in Modellen mit der entsprechenden Amadori-Verbindung gegenüber den Modellen, die nur den Zucker und die Aminosäure enthalten, drastisch an [95].

Des weiteren ergibt sich aus den Ergebnissen, daß Amadori-Verbindungen zwar relativ stabile Intermediärprodukte der Maillard-Reaktion darstellen, es sich bei diesen Verbindungen jedoch keineswegs um eine Sackgasse für den weiteren Verlauf der Reaktion oder der Bildung von Radikalen handelt.

Man kann davon ausgehen, daß auch die Autoxidation der Zuckerkomponente durch den Zwischenschritt über die Amadori-Verbindung - analog zu den Gegebenheiten bei der nicht-enzymatischen Bräunung - beschleunigt bzw. katalysiert wird.

Somit läßt sich auch die Steigerung der Bildungsrate des Glucosons in den Glucose/Aminosäure-Modellen gegenüber den reinen Glucose-Modellen mit der Bildung der Amadori-Verbindungen als reaktive Zwischenstufen auf dem Weg der nicht-enzymatischen Bräunung und der radikalischen Autoxidation erklären.

### 3.5.2 Einfluß unterschiedlicher Zucker auf die Bildung des Glucosons

Auch der Einsatz unterschiedlicher Zuckerkomponenten wirkt sich auf die Bildungsrate des Glucosons aus. Es wurden Modelle angesetzt, die Fructose, Glucose oder Maltose als reduzierenden Zucker und einen äquimolaren Gehalt an L-Alanin enthielten. Die Modelle enthielten Kupferionen (50  $\mu\text{mol/l}$ ) und wurden mit Citrat auf pH 3,0, 5,0 und 7,0 gepuffert.

Bei der Autoxidation der beiden Monosaccharide erkennt man wieder die typische pH-Wert-Abhängigkeit der Autoxidation (Abbildung 52). Bei pH 3,0 werden aus beiden Monosacchariden gleiche Mengen an Glucoson gebildet; hier sind ca. 1,2 mol% der jeweiligen Zuckerkomponente zum Glucoson umgesetzt worden. Auch bei pH 5,0 verhalten sich die beiden Zucker bezüglich der Bildungsrate des Glucosons noch einheitlich. Über den autoxidativen Abbauweg werden jeweils ca. 2 mol% der Monosaccharide zum Glucoson umgesetzt.

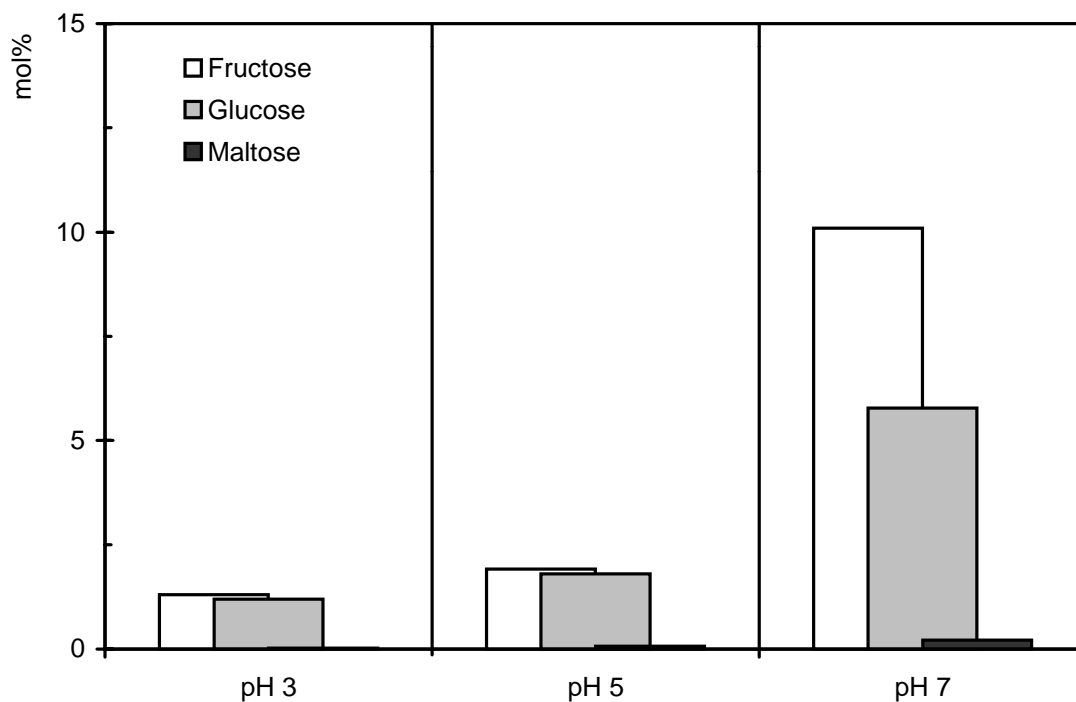


Abbildung 52: Bildung des Glucosons in Modellen mit unterschiedlichen reduzierenden Zuckern als Ausgangsverbindung (Modelle mit Alanin und Kupfer(II) 50  $\mu\text{mol/l}$  / 80 °C / 6 h)

Erst bei einem pH-Wert von 7,0 steigt die Bildungsrate des Glucosons merklich an. Des Weiteren ist bei diesem pH-Wert auch zum ersten Mal ein Unterschied in der Bildungsrate in Abhängigkeit von dem eingesetzten Monosaccharid zu erkennen. Während beim Glucose-Abbau bei diesem pH-Wert schon ca. 6 mol% zum Glucoson umgesetzt worden sind, sind es parallel dazu bei der Autoxidation der Fructose sogar 10 mol%. Bei dem optimalen pH-Wert für die Autoxidation (pH 7,0) ist somit die Geschwindigkeit der Bildung des Glucosons aus der Fructose deutlich höher als aus der Glucose. In Systemen, in denen beide Monosaccha-

ride vorliegen, ist demnach die Fructose anfälliger für den oxidativen Abbau als die Glucose. Dies liegt zum einen daran, daß die Fructose allgemein eine größere reduzierende Wirkung als die Glucose besitzt. Bei der Bildung des Glucosons aus den beiden isomeren Hexosen läßt sich dies aber auch direkt am Reaktionsmechanismus belegen. Da die Bildung des Glucosons über die Zwischenstufe des 1,2-Endiols verläuft, erklärt sich die größere Reaktivität der Fructose aus der im Vergleich zur Glucose leichter verlaufenden Enolisierung [96].

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Maltose als reduzierendem Disaccharid. Bei den beiden niedrigen pH-Werten bildet sich das Glucoson nicht in signifikanten Mengen (unter 0,1 mol%). Zwar wird der Gehalt mit steigendem pH-Wert erhöht, doch selbst bei pH 7,0 bilden sich lediglich 0,2 mol% Glucoson aus der Maltose.

Im Verlauf der Maillard-Reaktion durchläuft die Maltose die gleichen Reaktionsmechanismen wie die Monosaccharide. Über die Enolisierungsreaktionen bilden sich analog Desoxyosone, die entsprechend der Ausgangsverbindung am vierten Kohlenstoffatom der Desoxyosoneinheit noch den  $\alpha$ -glykosidisch gebundenen Glucose-Rest aufweisen. Eine Spaltung der glykosidischen Bindung erfolgt also nicht von der Amadori-Verbindung ausgehend, sondern erst im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion - etwa bei der Bildung von Furan- und Maltol-Derivaten [53]. Charakteristisch für den Abbau von Amadori-Verbindungen der Maltose ist somit die Bildung von Glucosyldesoxyosonen, die noch den  $C_{12}$ -Grundkörper der Ausgangsverbindung aufweisen. Lediglich bei der Bildung des 1,4-Didesoxyosons wird der  $\alpha$ -Glucopyranosyl-Rest bereits bei der Enolisierung abgespalten [73]. Das 1,4-Didesoxyoson bildet sich in Reaktionsgemischen mit Maltose in größerem Maße als in Gemischen mit Glucose, da der  $\alpha$ -Glucopyranosyl-Rest der Maltose eine bessere Abgangsgruppe als die Hydroxylgruppe der Glucose darstellt.

Auch für eine mögliche Autoxidation der Maltose scheinen ähnliche Gesetzmäßigkeiten zu gelten. Aus Maltose werden nur minimale Gehalte an Glucoson gebildet. Auch unter oxidativen Reaktionsbedingungen scheint die glykosidische Bindung der Maltose kaum gespalten zu werden. Denkbar wäre es natürlich, daß sich aus der Maltose analog zum Glucoson eine oxidierte Form des Disaccharids bildet, die am vierten Kohlenstoffatom noch über den  $\alpha$ -Glucopyranosyl-Rest verfügt. Das entsprechende Chinoxalinderivat dieser Verbindung konnte jedoch in den eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Das muß jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, daß die Maltose an sich keinen autoxidativen Prozessen unterliegt, denn denkbar wäre natürlich, daß sich völlig andere Oxidationsprodukte - wie etwa das Glyoxal etc. [86] bilden. Doch auch Cämmerer et al. [60] konnten in ähnlichen Maltose/Glycin-Modellen mittels der DPPH-Methode keine Radikale beim Abbau des Disaccharids nachweisen. Offensichtlich spielt die radikalische Autoxidation beim Abbau der Maltose tatsächlich keine Rolle. Wichtig ist dies bezüglich der eigenen Untersuchungen an Maischen und Würzen, da hier die Maltose die Hauptkomponente unter den reduzierenden

---

Zuckern darstellt; für die Bildung des Glucosons in den Maischen und Würzen kann die Maltose also nicht verantwortlich sein.

## 4 Untersuchungen an wasserarmen Modellsystemen

### 4.1 Vorüberlegungen zu den wasserarmen Modellsystemen

Die nicht-enzymatische Bräunung spielt insbesondere in wasserarmen Lebensmitteln eine wichtige Rolle. Gerade bei den sogenannten *Intermediate Moisture Foods*, die aufgrund ihres niedrigen Wassergehaltes gegenüber mikrobiologischen Verderb weitgehend stabil sind, steigt der Einfluß der chemischen Reaktionen - wie etwa der Maillard-Reaktion - bei den Veränderungen des Lebensmittels während der Lagerung und Verarbeitung. Dementsprechend sind bei Trocknungsprozessen starke chemische Veränderungen zu erwarten, da im Verlauf der Trocknung ein vom Wassergehalt abhängiges Maximum der Maillard-Reaktion durchlaufen wird.

In den eigenen Untersuchungen sollte nun geklärt werden, inwieweit die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori-Verbindungen in wasserarmen Systemen den vorherrschenden Reaktionsbedingungen unterliegt. Von Interesse war hierbei vor allem die Konkurrenz zwischen den Enolisierungsreaktionen und der Autoxidation bei den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. Das Hauptaugenmerk sollte auf der Abhängigkeit der unterschiedlichen Reaktionswege von dem eingestellten Wassergehalt und dem pH-Wert liegen. Deswegen wurden die unterschiedlichen Proben jeweils für vier Stunden bei 80°C erhitzt, da in den wäßrigen Systemen bei dieser Temperatur gleichermaßen Enolisierungsreaktionen und autoxidative Prozesse ablaufen (3.3.2). Die Modelle wurden jeweils - wie schon bei den wäßrigen Systemen - mit und ohne Kupferionen angesetzt, um zusätzlich den Einfluß der Kupfer-Katalyse auf die einzelnen Reaktionswege untersuchen zu können. Für die Abfangreaktion der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen enthielten die Modelle wieder o-Phenylendiamin.

Bei den eingesetzten wasserarmen Modellen handelt es sich um Systeme auf Basis von Avicel als Trägermatrix. Avicel ist mikrokristalline Cellulose, die aufgrund ihrer Struktur ein völlig unlösliches Polymer darstellt. Bei zunehmenden Wassergehalten kommt es so nur zu einer geringfügigen Quellung des Avicels, wodurch die Viskosität und damit auch der Diffusionswiderstand in den Modellen nicht übermäßig erhöht wird [97]. Des weiteren ist das Avicel bei den gewählten Reaktionsbedingungen weitestgehend inert und spielt bei den zu untersuchenden Reaktionen keine Rolle.

Maßgeblich für die Reaktionsgeschwindigkeit ist in wasserarmen Systemen häufig jedoch nicht direkt der Wassergehalt, sondern die hiermit verknüpfte Wasseraktivität. Gemäß Gleichung 4 berechnet sich die Wasseraktivität als Quotient aus dem Wasserdampfpartialdruck im Lebensmittel und dem Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers bei gegebener Temperatur.

Gleichung 4:

$$a_w = \frac{p}{p_0} = \frac{\varphi}{100}$$

$a_w$ : Wasseraktivität

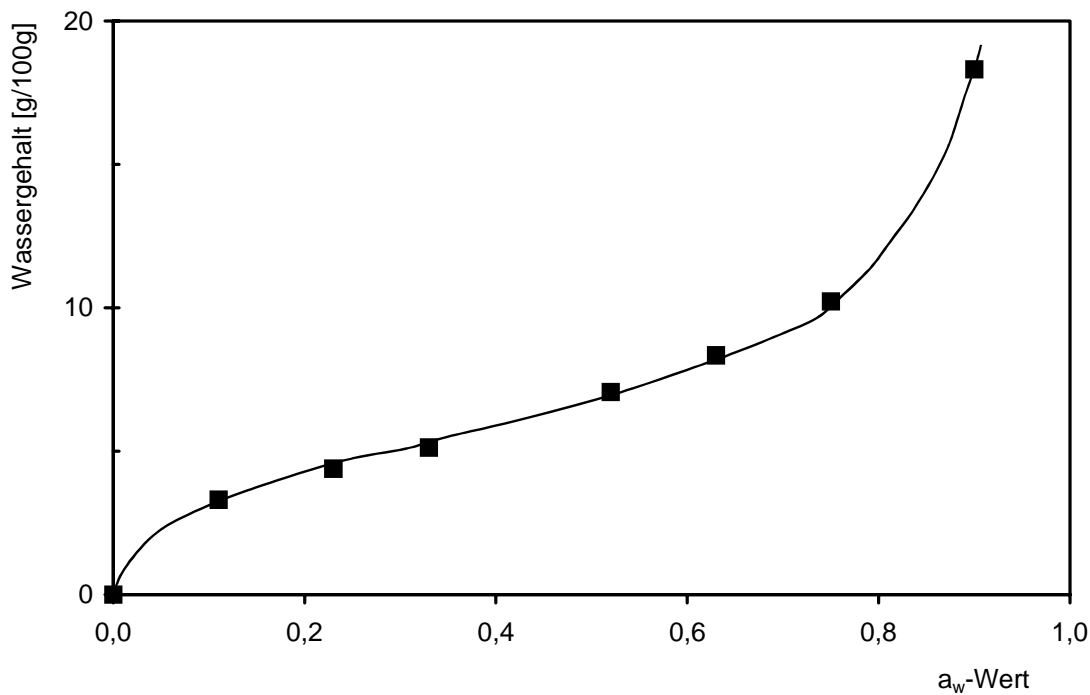
$p$ : Wasserdampfpartialdruck im Lebensmittel

$p_0$ : Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers

$\varphi$ : Gleichgewichtsfeuchte

Die Beziehung zwischen dem Wassergehalt und der Wasseraktivität eines Lebensmittels bei einer konstanten Temperatur ist durch die Sorptionsisotherme gekennzeichnet.

Bei wasserarmen Systemen haben kleine Änderungen des Wassergehaltes meist starke Veränderungen in der Wasseraktivität zur Folge. Schon allein deshalb ist es sinnvoll, bei den Avicelmodellen eine feste Wasseraktivität und nicht etwa den Wassergehalt vorzugeben.



**Abbildung 53:** Sorptionsisotherme für das verwendete Avicelmodell mit Citratpuffer bei pH-Wert 7,0 (Raumtemperatur)

In Abbildung 53 ist die Sorptionsisotherme für die eingesetzten Avicelmodelle bei Raumtemperatur dargestellt. Man erkennt den für viele Lebensmittel typischen sigmoiden Verlauf. Zur besseren Übersicht ist zwar nur die Sorptionsisotherme für die Modelle mit einem pH-Wert von 7,0 eingezeichnet, doch haben die eigenen Untersuchungen ergeben, daß der pH-Wert keinen Einfluß auf den Verlauf und die Lage der Kurve hat. Es ist allgemein schwierig, bei den wasserarmen Systemen einen pH-Wert anzugeben. Bei den eigenen Modellen ent-

spricht der angegebene pH-Wert deshalb immer dem pH-Wert der Lösung, die vor dem Gefriertrocknen beim Ansatz der Avicelmodelle verwendet wurde.

Die Wasseraktivität in den Avicelmodellen wird durch Lagerung der gefriergetrockneten Proben in Exsikkatoren über gesättigten Salzlösungen, denen über das Löslichkeitsprodukt verschiedene Gleichgewichtsfeuchtigkeiten zugeordnet werden können, eingestellt, da die Wasseraktivität ( $a_w$ ) über die Gleichung 4 mit der relativen Gleichgewichtsfeuchte ( $\varphi$ ) verbunden ist [98].

## **4.2 Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus Amadori-Verbindungen über die Enolisierungsreaktionen**

### **4.2.1 Bildung des 1-Desoxyosons**

#### **4.2.1.1 Abhängigkeit der Bildung vom pH-Wert**

Wie aus Abbildung 54 hervorgeht, zeigt die Bildung des 1-Desoxyosons in den wasserarmen Modellen unabhängig von der eingestellten Wasseraktivität eine eindeutige Abhängigkeit vom pH-Wert des jeweiligen Modells.

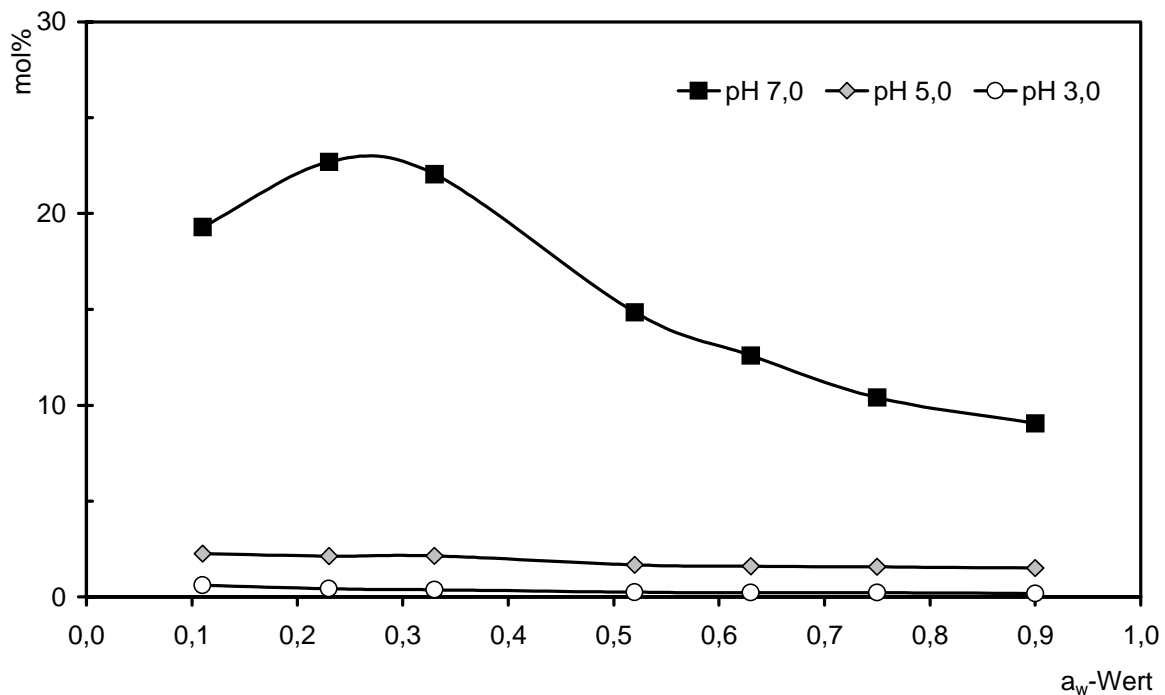
Die Bildung des 1-Desoxyosons ist demnach nicht über den gesamten pH-Bereich von Bedeutung. Bei einem pH-Wert von 3,0 bildet sich das 1-Desoxyoson kaum. Bei allen Wasseraktivitäten bleibt die Bildung hier unter einem mol% bezogen auf die eingesetzte Menge an Fructose-Alanin. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Bildung des 1-Desoxyosons dann zuerst nur wenig zu. Bei einem pH-Wert von 5,0 werden über den gesamten  $a_w$ -Wert-Bereich noch weniger als 2,5 mol% der eingesetzten Amadori-Verbindung zum 1-Desoxyoson abgebaut. Erst bei pH 7,0 steigt die Bildungsrate des 1-Desoxyosons merklich an. Abhängig von der Wasseraktivität des jeweiligen Modells werden hier 10 - 23 mol% der Amadori-Verbindung in das 1-Desoxyoson überführt.

Die pH-Wert-Abhängigkeit der Bildung des 1-Desoxyosons in den wasserarmen Modellen entspricht somit den Gegebenheiten in den wässrigen Modellen.

#### **4.2.1.2 Abhängigkeit der Bildung von der Wasseraktivität**

Da die Bildung des 1-Desoxyosons vor allem bei dem pH-Wert 7,0 von Bedeutung ist, wird auch die Abhängigkeit seiner Bildung von der Wasseraktivität des Systems gerade bei diesem pH-Wert besonders deutlich.





**Abbildung 54:** Bildung des 1-Desoxyosons in den wasserarmen Modellen ohne Kupfer-Katalyse in Abhängigkeit vom pH-Wert (80°C, 4h)

Wie aus Abbildung 54 hervorgeht, durchläuft die Bildung des 1-Desoxyosons im Bereich eines  $a_w$ -Wertes von 0,25 - 0,40 ein Maximum. Hier sind 23 mol% der Amadori-Verbindung zum 1-Desoxyoson abgebaut worden. Zu den höheren  $a_w$ -Werten hin nimmt die Bildung des 1-Desoxyosons ab. So bilden sich bei einem  $a_w$ -Wert von 0,90 nur noch 10 mol% 1-Desoxyoson. Aber auch zu niedrigeren Wasseraktivitäten hin nimmt die Bildungsrate wieder ab; bei einem  $a_w$ -Wert von 0,11 beträgt der Gehalt des gebildeten 1-Desoxyosons nur noch 19 mol% der eingesetzten Amadori-Verbindung.

Für die Abhängigkeit der Maillard-Reaktion von der Wasseraktivität sind bereits verschiedentlich ähnliche Zusammenhänge gefunden worden. Für die aus der Maillard-Reaktion resultierende Bräunung wird in wasserarmen Medien allgemein ein Maximum bei  $a_w$ -Werten zwischen 0,65 und 0,78 angegeben [97]. Für die Reaktionen der frühen Phase - wie etwa den Abbau der Amadori-Verbindungen - gab Wittmann [25] ein Maximum bei einem  $a_w$ -Wert von 0,40 an. Da es sich bei den einzelnen Reaktionsschritten in der Maillard-Reaktion (Abbau der Amadori-Verbindung, Bildung des 1-Desoxyosons, Ausbildung der Bräunung) um völlig unterschiedliche Reaktionen handelt, sind die unterschiedlichen Lagen der Maxima nicht weiter verwunderlich. Allen gemein ist jedoch, daß abhängig von der Wasseraktivität ein Maximum durchlaufen wird.

Mit steigender Wasseraktivität nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zuerst zu, da sich durch das anwesende Wasser die Diffusionsbereitschaft der Reaktanden erhöht; teilweise gehen

einzelne Verbindungen auch erst bei einem bestimmten Wassergehalt in Lösung und stehen erst dann der eigentlichen Reaktion zur Verfügung. Zum anderen verändert sich aber auch die Struktur der Matrix durch den steigenden Wassergehalt; so beginnen Polymere wie etwa die Polysaccharide zu quellen. Insgesamt konnte bei zunehmender Wasseraktivität eine Abnahme der Viskosität festgestellt werden, wodurch die Mobilität der gelösten Substanzen verbessert wird [99]. Dadurch erklärt sich der erste Anstieg der Reaktionsrate bei steigender Wasseraktivität. Bei steigenden Wasseraktivitäten liegt immer mehr Wasser in der freien, ungebundenen Form vor. Schließlich ergibt sich ein Verdünnungseffekt der gelösten Substanzen, der der zunehmenden Mobilisierung entgegenwirkt und die Reaktionsgeschwindigkeit verringert; durch zunehmenden Wassergehalt verschiebt sich darüber hinaus das Gleichgewicht der primären Reaktionsstufe entsprechend dem Massenwirkungsgesetz in Richtung der Edukte.

## 4.2.2 Bildung des 3-Desoxyosons

### 4.2.2.1 Abhängigkeit der Bildung vom pH-Wert

Der Bildungsweg des 3-Desoxyosons über die 1,2-Enolisierung zeigt grundsätzlich eine von der Bildung des 1-Desoxyosons verschiedene Abhängigkeit vom pH-Wert (Abbildung 55).

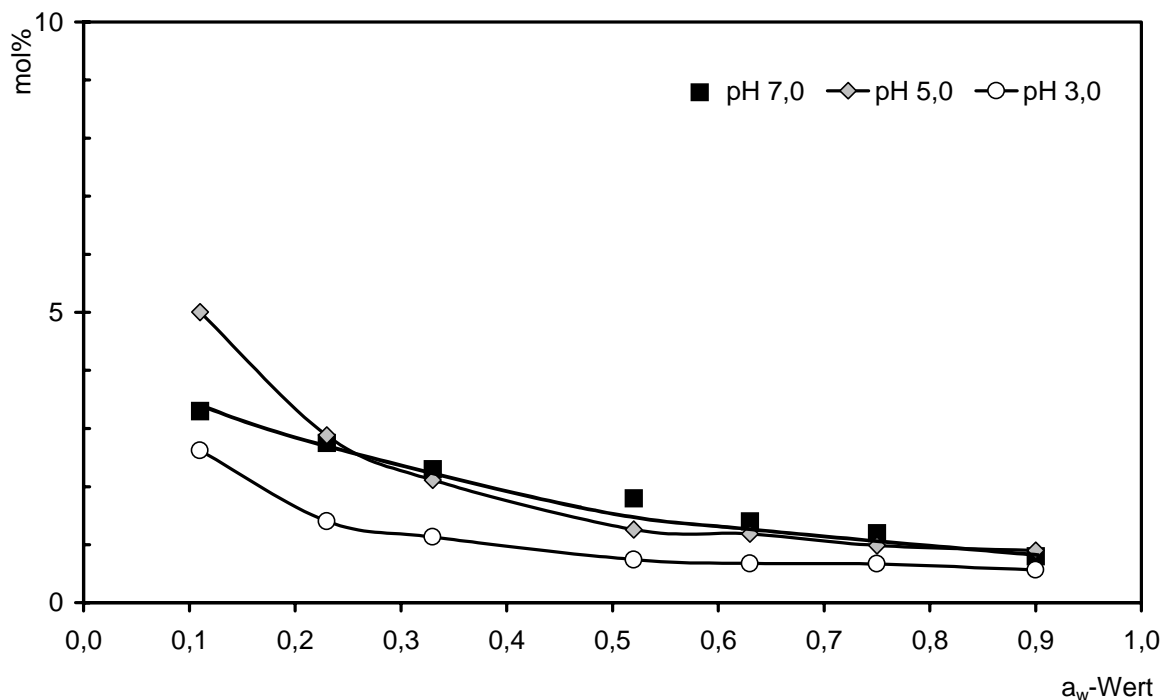


Abbildung 55: Bildung des 3-Desoxyosons in den wasserarmen Modellen ohne Kupfer-Katalyse in Abhängigkeit vom pH-Wert (80°C, 4h)

Dies zeigt sich besonders bei unterhalb von 0,30. Dort erreicht die Bildungsrate bei pH-Wert 5,0 einen Maximalwert. Bei einem  $a_w$ -Wert von 0,11 werden unter diesen Bedingungen ca. 5 mol% der eingesetzten Amadori-Verbindung über die 1,2-Enolisierung abgebaut.

Sowohl bei pH 3,0 als auch bei pH 7,0 nimmt die Menge des gebildeten 3-Desoxyosons demgegenüber ab. Bei einer Wasseraktivität von 0,11 werden bei diesen beiden pH-Werten nur etwa 3,0 mol% gebildet.

Somit spielt dieser Abbauweg bei den beiden niedrigen pH-Werten eine größere Rolle als die 2,3-Enolisierung, die zum 1-Desoxyoson führt (vergl. 4.2.1.1).

Die pH-Abhängigkeit der Bildung des 3-Desoxyosons wird dann mit zunehmender Wasseraktivität immer geringer. Bei den Proben höherer Wasseraktivität ( $> 0,6$ ) kann kein signifikanter Unterschied in der Bildung bei den verschiedenen pH-Werten ausgemacht werden.

Insgesamt ist der Abbauweg über die 1,2-Enolisierung nicht bei einem einzigen pH-Wert bevorzugt - wie dies etwa bei der 2,3-Enolisierung der Fall ist - vielmehr spielt die Bildung des 3-Desoxyosons bei den höheren  $a_w$ -Werten über einen weiten pH-Bereich eine ziemlich gleichbleibende Rolle.

Die Abhängigkeit der Bildung des 3-Desoxyosons vom pH-Wert in den wasserarmen Modellen verhält sich damit analog zu den Gegebenheiten in den wässrigen Systemen, die ebenfalls bei 80 °C erhitzt wurden. In den wässrigen Modellen bildet sich das 3-Desoxyoson über den gesamten pH-Bereich in der gleichen Größenordnung. Die Bildung des 1-Desoxyosons ist demgegenüber auch in den wässrigen Systemen - ähnlich wie in den wasserarmen Medien - mit steigendem pH-Wert bevorzugt (3.3.1.1). Die Abhängigkeit der beiden Enolisierungsreaktionen vom pH-Wert unterliegt demnach sowohl in den wässrigen als auch in wasserarmen Systemen den gleichen Gesetzmäßigkeiten.

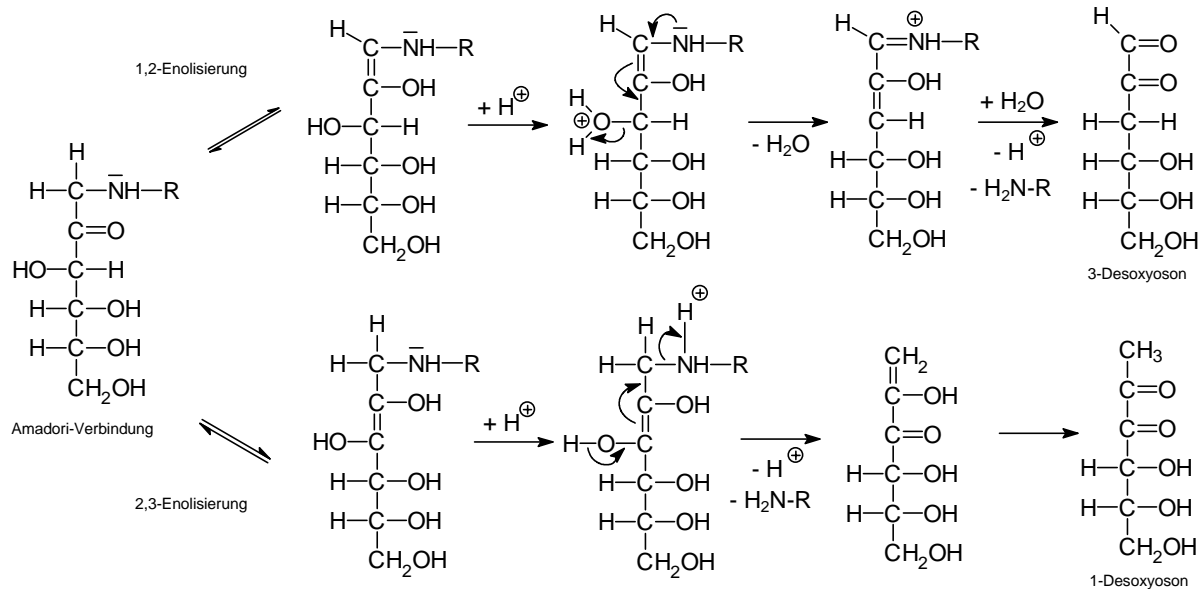
#### **4.2.2.2 Abhängigkeit der Bildung von der Wasseraktivität**

Wie Abbildung 55 zeigt, besitzt die Abhängigkeit der Bildung des 3-Desoxyosons von der Wasseraktivität über den gesamten pH-Bereich einen einheitlichen Verlauf. So bildet sich bei einem  $a_w$ -Wert von 0,11 bei allen drei pH-Werten der größte Gehalt an 3-Desoxyoson. Mit zunehmenden  $a_w$ -Werten nimmt der Gehalt des gebildeten 3-Desoxyosons immer mehr ab. Schließlich verliert auch die pH-Abhängigkeit der 1,2-Enolisierung mit zunehmender Wasseraktivität immer mehr an Bedeutung. Bei den Proben höherer Wasseraktivität ( $> 0,6$ ) ist kein signifikanter Unterschied in der Bildung bei den verschiedenen pH-Werten erkennbar (Abbildung 55).

Damit zeigt sich bei der Abhängigkeit von der Wasseraktivität ein grundsätzlich anderer Verlauf als dies bei der Bildung des 1-Desoxyosons der Fall ist (vergl. 4.2.1.2). Während die Bildungsrate hier ein Maximum bei einem  $a_w$ -Wert-Bereich von 0,25 - 0,40 durchläuft, bildet sich das 3-Desoxyoson mit abnehmender Wasseraktivität in höherem Maße. Grundsätzlich kann man die Abnahme der Bildung des 3-Desoxyosons mit dem zunehmenden Gehalt an

freiem Wasser natürlich auch mit dem auftretenden Verdünnungseffekt erklären. Der Unterschied in der  $a_w$ -Wert-Abhängigkeit der Bildungsrate der beiden Desoxyosone bei den Modellen mit sehr niedrigen  $a_w$ -Werten ( $> 0,25$ ) muß jedoch in den unterschiedlichen Reaktionswegen begründet sein.

Natürlich handelt es sich bei den beiden Enolisierungswegen um Reaktionsfolgen, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegen (Abbildung 56).



**Abbildung 56: Die Bildung der Desoxyosone über die Enolisierungsreaktionen**

Bei der 1,2-Enolisierung, die zum 3-Desoxyoson führt, handelt es sich um eine säurekatalysierte Reaktion. Sie läuft über die Endiolform der Amadori-Verbindung ab, aus der in einem ersten Schritt ein Molekül Wasser abgespalten wird [13][10]. Somit ist dieser erste Reaktionsschritt unter Wasserabspaltung gemäß dem Massenwirkungsgesetz natürlich in Medien mit einem sehr niedrigen Wassergehalt bevorzugt. Erst danach kommt es zur hydrolytischen Abspaltung der Aminokomponente. Doch diese zweite Reaktion scheint nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu sein, zumal das daraus entstehende reaktive Desoxyoson direkt weiter reagiert - entweder zu den vielfältigen Folgeprodukten oder wie hier in der Abfangreaktion zum Chinoxalin - und somit dem Gleichgewicht entzogen wird. Demgegenüber wird bei der 2,3-Enolisierung die Aminokomponente direkt aus der Endiolform der Amadori-Verbindung abgespalten. Natürlich ist auch das letztendlich entstehende 1-Desoxyoson sehr reaktiv und entzieht sich durch weitere Folgereaktionen dem Gleichgewicht, doch hat hier der Wassergehalt des Mediums keinen direkten Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit der 1-Desoxyoson-Bildung.

### 4.2.3 Einfluß der Kupfer-Katalyse auf die Enolisierungsreaktionen

Die Anwesenheit von Kupferionen in den wasserarmen Modellen zeigt unterschiedliche Auswirkungen auf die Bildungsrate der einzelnen Desoxyosone (Abbildung 57).

Auf die Bildung des 3-Desoxyosons (3-DHQ) scheint die Zugabe von Kupferionen zum System bei den untersuchten Bedingungen keinen signifikanten Einfluß zu haben. Das 3-Desoxyoson bildet sich in den Modellen unter Kupfer-Katalyse im gleichen Maße wie in den Modellen, in denen die Schwermetallkatalyse durch Zugabe von EDTA unterbunden wird. Dargestellt ist dies in Abbildung 57 für den pH-Wert 7,0, grundsätzlich gilt dies aber für das 3-Desoxyoson über den gesamten pH-Bereich. Damit verhält sich die Bildung des 3-Desoxyosons in den wasserarmen Medien ähnlich zu den wäßrigen Modellen. Hier verläuft dessen Bildung über die 1,2-Enolisierungsreaktion bei einer Erhitzungstemperatur von 80 °C sowohl bei Kupfer-Katalyse als auch ohne die Zugabe von Kupferionen in der gleichen Größenordnung.

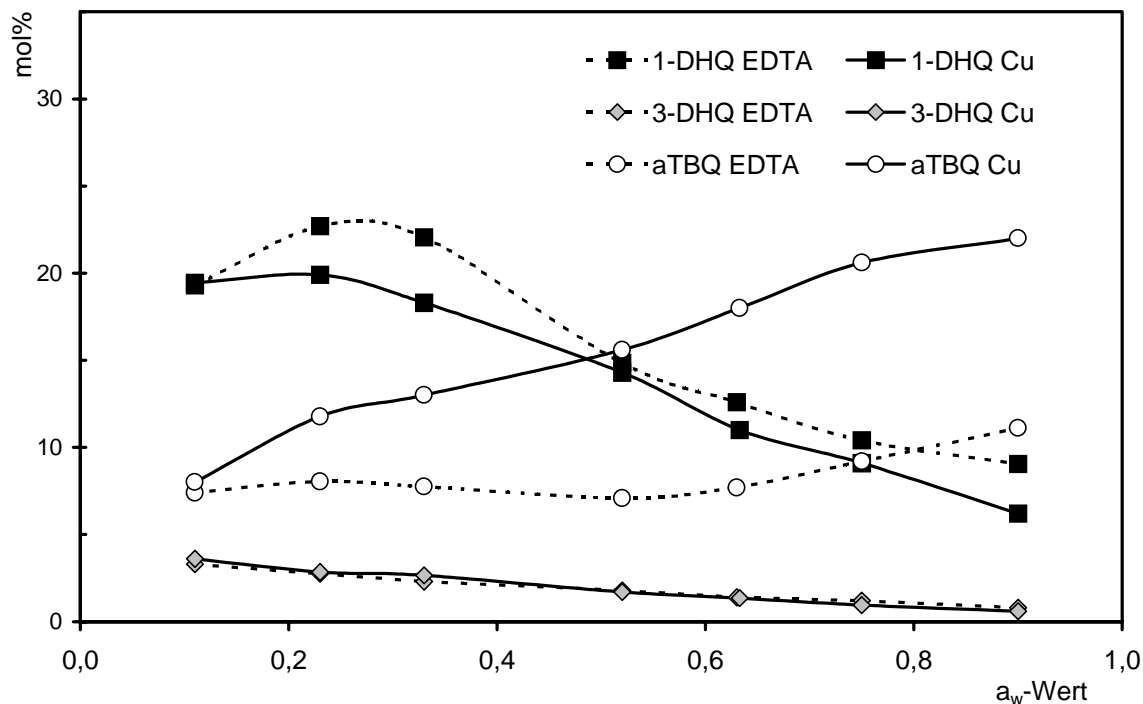


Abbildung 57: Einfluß der Kupfer-Katalyse auf die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus Fru-Ala bei pH 7,0 (gestrichelt: ohne  $\text{Cu}^{2+}$  / durchgezogen: mit  $\text{Cu}^{2+}$  / Abk.: s. Anhang)

Etwas anders sieht der Einfluß der Kupferionen auf die 2,3-Enolisierungsreaktion, die zum 1-Desoxyoson führt, aus. Bei den niedrigen pH-Werten (pH 3,0 und pH 5,0) bildet sich das 1-Desoxyoson unabhängig von der Anwesenheit von Kupferionen im gleichen Maße, grundsätzlich hat die Kupfer-Katalyse bei diesen pH-Werten keinen Einfluß auf den Verlauf der 2,3-Enolisierungsreaktion. Erst bei pH 7,0 macht sich die Kupfer-Katalyse bemerkbar und beeinflusst die Bildungsrate des 1-Desoxyosons. Das Maximum für die Bildung des

1-Desoxyosons im  $a_w$ -Wert-Bereich 0,25 - 0,40 flacht bei der Anwesenheit von Kupferionen deutlich ab, parallel zu dem Anstieg der Glucoson-Bildung (aTBQ, Abbildung 57).

Mit steigender Wasseraktivität nimmt dann die Bildung des 1-Desoxyosons (1-DHQ) bei Kupferzugabe etwas stärker ab als in den Modellen ohne Kupferionen. Im Vergleich dazu steigt die Glucoson-Bildung in Gegenwart von Kupferionen stark an. Man kann also davon ausgehen, daß die Abnahme der Bildungsrate des 1-Desoxyosons bei Kupferanwesenheit vor allem in der wachsenden Konkurrenz zwischen der 2,3-Enolisierungsreaktion und der oxidativen Glucoson-Bildung - die kupferkatalysiert abläuft - begründet liegt. Einzig bei  $a_w$ -Werten unterhalb des BET-Punktes (hier:  $a_w$ -Wert 0,11) kann man keinen Einfluß der Kupferzugabe auf die 2,3-Enolisierungsreaktion feststellen, doch hat hier parallel dazu die Anwesenheit von Kupferionen auch noch keinen Einfluß auf die Glucoson-Bildung (vergl. 4.3.3). Ein Mindestmaß an Beweglichkeit der Kupferionen durch das Wasser im System scheint somit eine Grundvoraussetzung für die Kupfer-Katalyse zu sein.

### **4.3 Bildung des Glucosons über den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung**

#### **4.3.1 Abhängigkeit vom pH-Wert**

In den wasserarmen Modellen ist die Bildung des Glucosons über den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung stark vom pH-Wert des jeweiligen Mediums abhängig. Analog zu den wäßrigen Modellen bildet sich das Glucoson bevorzugt im neutralen Bereich bei einem pH-Wert von 7,0. Wie aus Abbildung 58 und Abbildung 59 hervorgeht, nimmt dann auch die Bildungsrate des Glucosons mit abnehmendem pH-Wert immer mehr ab. Trotzdem stellt das Glucoson bei den beiden niedrigen pH-Werten bei Ab- und Anwesenheit von Kupferionen über den gesamten  $a_w$ -Wert-Bereich das Hauptabbauprodukt der Amadori-Verbindung dar. Erst bei pH 7,0 kommt es dann zu einer echten Konkurrenz zwischen der Bildung des Glucosons und des 1-Desoxyosons (Abbildung 57). Bei diesem pH-Wert entscheidet die Wasseraktivität des Systems und die Anwesenheit von Kupferionen darüber, ob der Abbau der Amadori-Verbindung bevorzugt zu dem Glucoson oder alternativ dazu über die 2,3-Enolisierung zu dem 1-Desoxyoson führt.

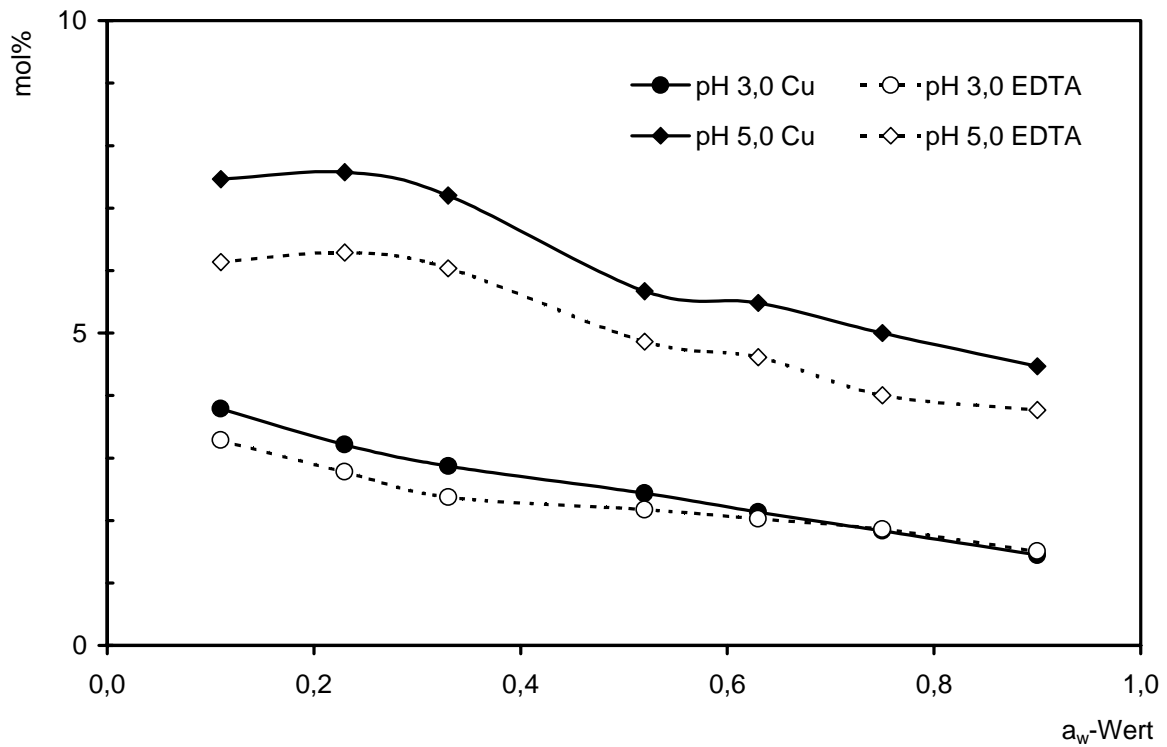


Abbildung 58: Bildung des Glucosons in den wasserarmen Modellen bei pH 3,0 und 5,0 (80°C, 4 h)

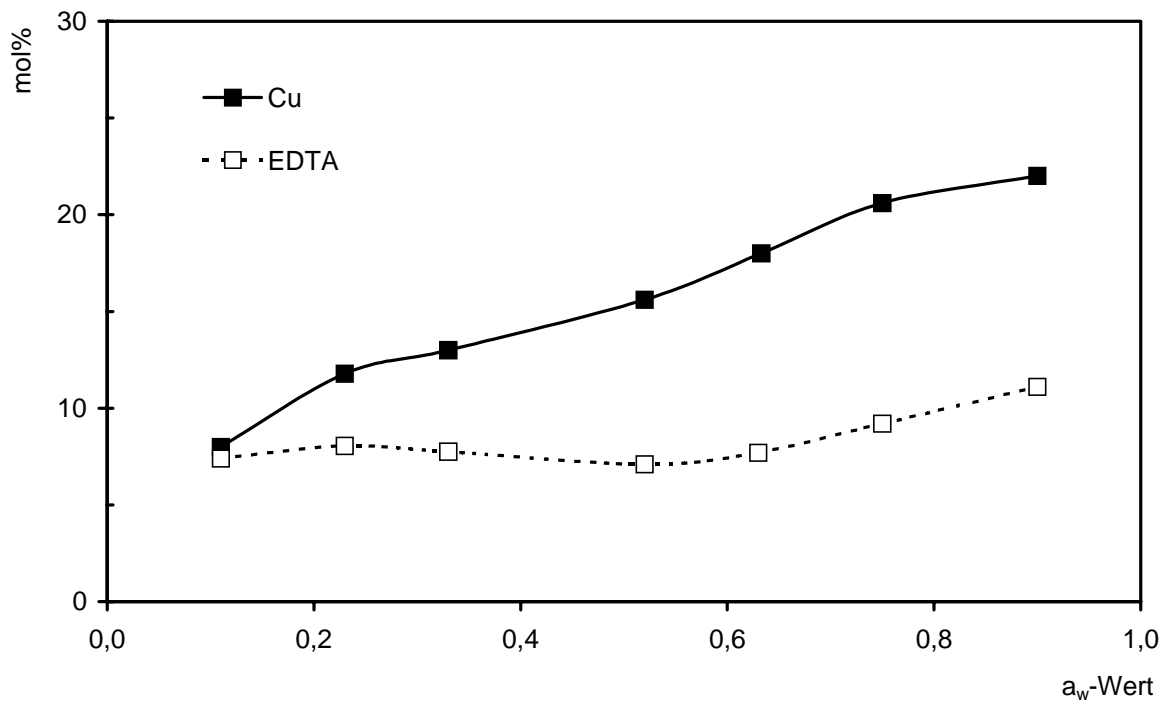


Abbildung 59: Bildung des Glucosons in den wasserarmen Modellen bei pH 7,0 (80°C, 4 h)

### 4.3.2 Einfluß der Kupfer-Katalyse

Der Einfluß der Kupfer-Katalyse auf die Bildung des Glucosons in den wasserarmen Modellen unterscheidet sich grundlegend von den Ergebnissen der wäßrigen Systeme. Hier wird die Bildung des Glucosons durch den Zusatz von Kupferionen (50  $\mu\text{mol/l}$ ) bei sämtlichen pH-Werten verstärkt - der Gehalt an gebildetem Glucoson bei Kupferzugabe steigt hier auf das Drei- bis Siebenfache.

In den wasserarmen Medien ist der Einfluß der Kupferionen stark vom pH-Wert des jeweiligen Modells abhängig. Bei einem pH-Wert von sieben wird die Bildung des Glucosons durch die Kupfer-Katalyse noch stark begünstigt, in zunehmendem Maße mit Steigerung der Wasseraktivität (Abbildung 59). Demgegenüber nimmt der Einfluß der Kupferionen mit abnehmendem pH-Wert mehr und mehr ab (Abbildung 58).

Bei pH 5,0 bilden sich durch die Kupferzugabe über den gesamten  $a_w$ -Wert-Bereich ca. 15 - 20 % höhere Gehalte an Glucoson. Bei pH 3,0 nimmt dieser positive Einfluß deutlich ab. Hier hat die Anwesenheit des Kupfers gerade bei Wasseraktivitäten oberhalb eines  $a_w$ -Wertes von 0,52 keinen signifikanten Einfluß mehr auf die Bildung des Glucosons.

Daß sich die Abhängigkeit der Kupfer-Katalyse von der jeweiligen Wasseraktivität je nach pH-Wert des vorliegenden Systems unterschiedlich darstellt, ist auf den ersten Blick ein überraschendes Ergebnis. Die Unterschiede des Einflusses der Kupferionen bei den einzelnen pH-Werten könnten daraus resultieren, daß die Kupferionen in den einzelnen Modellen abhängig vom pH-Wert in unterschiedlichen Formen vorliegen, die entscheidend für ihre katalytische Wirksamkeit sind. Eine mögliche Erklärung könnte in einer Komplexierung der Kupferionen durch das anwesende Citrat begründet liegen, die je nach pH-Wert unterschiedlich stark ausgeprägt ist und somit die Wirksamkeit des Kupfers beeinflusst.

Für die Bildung freier Radikale in wasserarmen Modellen und Lebensmitteln, die durch Schwermetallkatalyse begünstigt abläuft, ist bekannt, daß die Form, in der die Schwermetallionen in dem System vorliegen, entscheidend für die Bildungsrate der Radikale ist. Im allgemeinen nimmt die Bildungsrate radikalischer Reaktionen bei höheren Wasseraktivitäten ab, da die Schwermetallspuren von freiem Wasser komplexiert werden können und somit die Katalyse gehemmt wird [100]. Dies scheint sich in den Modellen bei einem pH-Wert von 3,0 auch zu bestätigen; der Einfluß der Kupfer-Katalyse ist bei  $a_w$ -Werten über 0,52 nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 58). Doch bei den Modellen mit höheren pH-Werten ist dies nicht mehr der Fall. Denkbar wäre es, daß die Hydratisierung der Kupferionen hier eine untergeordnete Rolle spielt, da das Kupfer durch andere Inhaltsstoffe - etwa die Citronensäure - komplexiert wird.

Die Modelle enthalten zur Pufferung Citronensäure, die in der Lage ist, Kupferionen zu komplexieren. Das Komplexierungsvermögen ist hierbei jedoch stark vom pH-Wert des Systems abhängig [88][89]. So ist die Stabilitätskonstante des Kupfer-Citrat-Komplexes bei einem



pH-Wert von 3,0 mit  $pK = 2,26$  noch sehr klein, so daß bei diesem pH-Wert keine stabile Komplexierung zu erwarten ist. Ebenso sollte bei pH 5,0 die Komplexierung durch die Citronensäure noch eine untergeordnete Rolle spielen (der  $pK$ -Wert beträgt hier 3,42). Erst bei einem pH-Wert von 7,0 ist der Citratkomplex relativ stabil ( $pK = 8,10$ ). Demnach könnte das Kupfer bei den Modellen bei pH 7,0 bevorzugt in der Form des Kupfer-Citrat-Komplexes und nicht als Kupfer-Hydrat-Komplex vorliegen. Doch diese Komplexierung durch die Citronensäure bedeutet in den vorliegenden wasserarmen Systemen nicht, daß die Kupferionen dadurch ihre katalytische Wirkung auf den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung verlieren. Vielmehr werden die Kupferionen durch die Komplexierung mit Citronensäure erst stabilisiert und sind somit besonders katalytisch wirksam. Dies gilt natürlich vornehmlich bei einem pH-Wert von sieben, wo der Kupfer-Citrat-Komplex am stabilsten ist. Dieser stabilisierende und damit die Autoxidation verstärkende Effekt der Citronensäure auf die Kupferionen trat bereits auch in den wäßrigen Modellen bei pH 7,0 auf. Ein ähnlicher verstärkender Effekt der Citronensäure auf die Kupfer-Katalyse scheint auch in den wasserarmen Modellen vorzuliegen.

Die unterschiedlichen Komplexe, in der die Kupferionen in den wasserarmen Modellen vorliegen, führen zwangsläufig zu einem unterschiedlichen Ausmaß, in dem die Kupferionen für eine Katalyse des oxidativen Abbaus zur Verfügung stehen. Bei den untersuchten wasserarmen Modellen ist die Kupfer-Katalyse somit abhängig vom pH-Wert. Allgemein steigt der Einfluß der Kupferzugabe auf den oxidativen Abbau der Amadori-Verbindung mit zunehmendem pH-Wert an. Am deutlichsten tritt die Kupfer-Katalyse dann bei pH 7,0 in Erscheinung (Abbildung 59).

### 4.3.3 Abhängigkeit von der Wasseraktivität

Die Abhängigkeit des oxidativen Abbaus von Fructose-Alanin von der Wasseraktivität des jeweiligen Mediums unterscheidet sich je nach pH-Wert gravierend.

Wie aus der Abbildung 58 hervorgeht, nimmt die Bildung des Glucosons bei einem pH-Wert von drei mit zunehmendem  $a_w$ -Wert immer mehr ab. Die zunehmende Verdünnung der Reaktanden durch das freie Wasser könnte hier der vorherrschende Effekt auf die Bildungsrate zu sein. Während bei einem  $a_w$ -Wert von 0,11 noch ca. 3,5 mol% der Amadori-Verbindung zum Glucoson umgesetzt werden, sind es bei einer Wasseraktivität von 0,9 nur noch 1,5 mol%. Die Bildung nimmt unter Anwesenheit von Kupferionen bei den niedrigen Wasseraktivitäten nur wenig zu. Sofern ab einem  $a_w$ -Wert von 0,5 freies Wasser zur Hydratisierung der Kupferionen zur Verfügung steht, findet keine Katalyse statt - das Kupfer verliert hier seine katalytische Wirksamkeit (vergl. 4.3.2).

Bei dem pH-Wert 5,0 ist über den gesamten Bereich der untersuchten Wasseraktivitäten ein ähnlicher Verlauf zu erkennen. Bei niedrigen Wasseraktivitäten bildet sich grundsätzlich

mehr Glucoson als bei höheren Wasseraktivitäten. Interessanterweise kommt es zur Ausbildung eines kleinen Maximums bei einem  $a_w$ -Wert von 0,25 - also bei dem BET-Punkt, der durch die monomolekulare Belegung der Matrix mit Wassermolekülen gekennzeichnet ist. Bei dem Modell mit Kupferionen bilden sich hier ca. 8 mol% Glucoson. Die Bildungsrate nimmt dann mit zunehmender Wasseraktivität ab, so daß sich das Glucoson bei einem  $a_w$ -Wert von 0,9 nur noch zu 4,5 mol% bildet. Auch hier sind es wieder zwei gegensätzliche Effekte, die mit der ansteigenden Wasseraktivität einher gehen und damit die Bildungsrate beeinflussen. Zum einen sinkt mit zunehmender Wasseraktivität durch das Quellen der Polymere die Viskosität der Matrix, wodurch die Reaktanden mobilisiert werden; dadurch würde die Reaktionsgeschwindigkeit steigen. Des weiteren werden viele Reaktanden erst durch ein Mindestmaß an freiem Wasser gelöst und stehen erst jetzt der Reaktion zur Verfügung. Doch je mehr freies Wasser in dem System zur Verfügung steht um so mehr tritt der gegenläufige Verdünnungseffekt und möglicherweise eine zunehmende, die Wirkung der Kupferkatalyse vermindernde Hydratisierung der Kupferionen in Erscheinung, wodurch die Reaktionsrate schließlich bei höheren  $a_w$ -Werten wieder abnimmt. Dieser grundsätzliche Verlauf der Bildungsrate des Glucosons über den Bereich der untersuchten Wasseraktivitäten verändert sich auch bei der Abwesenheit von Kupferionen nicht. Hier kommt es lediglich zu einer erniedrigten Bildung des Glucosons, welche jedoch über den gesamten  $a_w$ -Wert-Bereich in gleichem Maße erfolgt (vergl. 4.3.2).

Ganz anders verläuft die Bildung des Glucosons bei einem pH-Wert von sieben (Abbildung 59). Hier kommt es im Gegensatz zu den Modellen bei niedrigeren pH-Werten mit steigender Wasseraktivität zu einer Zunahme der Bildungsrate. In dem Modell mit Kupfer-Katalyse werden bei einem  $a_w$ -Wert von 0,11 erst ca. 8 mol% an Glucoson gebildet; damit unterscheidet sich die Bildungsrate bei dieser Wasseraktivität noch nicht von den Gegebenheiten bei pH 5,0. Danach nimmt der Gehalt an gebildeten Glucoson mit steigender Wasseraktivität fast linear zu, bis schließlich bei einem  $a_w$ -Wert von 0,75 schon 20 mol% der Amadori-Verbindung in das Glucoson überführt wurden. Lediglich zu noch höheren Wasseraktivitäten hin flacht die Kurve etwas ab; so bilden sich bei einem  $a_w$ -Wert von 0,9 aber immerhin noch ca. 22 mol% Glucoson.

Natürlich beeinflußt auch hier die Abnahme der Viskosität durch die steigende Wasseraktivität und die damit verbundene verbesserte Mobilität der Reaktanden die Bildungsrate des Glucosons positiv. Erst bei einer weiteren Erhöhung der Wasseraktivitäten ( $> 0,75$ ) ergibt sich keine weitere Verringerung der Viskosität im System, so daß hier der Verdünnungseffekt mehr und mehr zum Tragen kommt - folgerichtig flacht die Bildungskurve in diesem Bereich ab (Abbildung 59 [99]).

Die Abhängigkeit der Bildung des Glucosons von der Wasseraktivität ist je nach pH-Wert recht unterschiedlich. Während bei den niedrigen pH-Werten die Glucoson-Bildung mit

zunehmender Wasseraktivität abnimmt, steigt sie im neutralen Bereich leicht an; die Anwesenheit von Kupferionen verstärkt diesen Anstieg deutlich. Ein Erklärungsansatz hierfür, wurde bereits bei der Abhängigkeit der Kupfer-Katalyse vom pH-Wert (4.3.2) aufgestellt. Die verringerte Wirksamkeit des Kupfers nach Hydratisierung bei niedrigen pH-Werten bzw. dessen erhöhte Wirksamkeit nach Komplexbildung mit Citronensäure im neutralen Bereich könnte die Unterschiede erklären. Doch auch bei Abwesenheit von Kupferionen ist die Abhängigkeit der Glucosonbildung von der Wasseraktivität bei den einzelnen pH-Werten unterschiedlich.

Insgesamt zeigt die oxidative Bildung des Glucosons grundlegende Parallelen zu dem oxidativen Abbau der Ascorbinsäure [101][102][103]. So treten beide Oxidationsreaktionen bei höheren pH-Werten in den Vordergrund und werden durch Kupferionen in ähnlichem Maße katalysiert. Für die Abhängigkeit der Ascorbinsäure-Oxidation vom pH-Wert konnte gezeigt werden, daß nicht nur der pH-Wert an sich, sondern auch die vorliegende puffernde Substanz einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion hat. Daß sich analog dazu auch bei der Glucoson-Bildung die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Matrix und deren Struktur bei den verschiedenen pH-Werten verändert, kann aus den vorliegenden Ergebnissen der wasserarmen Systemen zwar abgeleitet werden, eine eindeutige Erklärung hierfür ist jedoch nicht möglich.

#### 4.4 Abbau des Fructose-Alanins

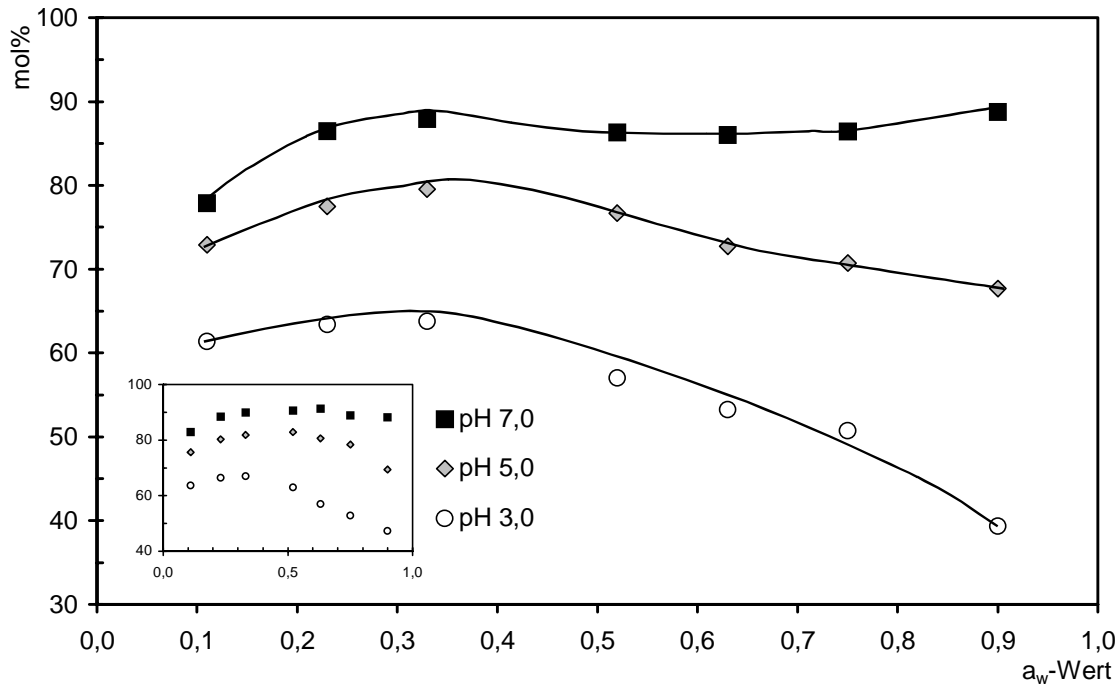
Wie aus Abbildung 60 hervor geht, ist der Abbau der Amadori-Verbindung in den wasserarmen Modellen von der Wasseraktivität und vom pH-Wert des jeweiligen Systems abhängig.

Wie schon in den wäßrigen Systemen nimmt auch hier die Abbaurate der Amadori-Verbindung mit steigendem pH-Wert zu.

Bei der Abhängigkeit von der Wasseraktivität erkennt man ein leichtes Maximum im Bereich eines  $a_w$ -Wertes von 0,3 - 0,4. In diesem Bereich liegt das vorhandene Wasser nicht nur in gebundener, sondern auch schon in einer diffusionsbereiten Form vor, was den Abbau durch gesteigerte Mobilität der Reaktionspartner begünstigt. Hingegen findet sich hier noch kein freies, kondensiertes Wasser, das die Reaktion durch Verdünnungseffekte behindert, was sich durch die Abnahme des Abbaus zu höheren Wasseraktivitäten hin zeigt. Diese zu erwartende Abnahme ist bei den eigenen Modellen allerdings nur in den Modellen bei pH 3,0 und 5,0 zu erkennen.

Der Zusatz von Kupfer hat auf den Abbau der Amadori-Verbindung kaum einen Einfluß (vergl. Abbildung 60, kleines Diagramm). Parallel dazu werden ja aber auch die Bildungsraten des Glucosons von der Anwesenheit der Kupferionen bei pH-Werten von 3,0 und 5,0 kaum beeinflusst. Daraus resultiert, daß sich die Abbaurate durch den Zusatz von Kupfer-

ionen nicht signifikant verändert. Nur bei dem Modell mit pH 7,0 scheint bei sehr hohen Wasseraktivitäten ( $> 0,75$ ) ein leichter Anstieg durch den oxidativen Abbau erkennbar zu sein; denn nur unter diesen Reaktionsbedingungen spielt auch die Kupfer-Katalyse bei der Bildung des Glucosons eine wichtige Rolle (Abbildung 60).



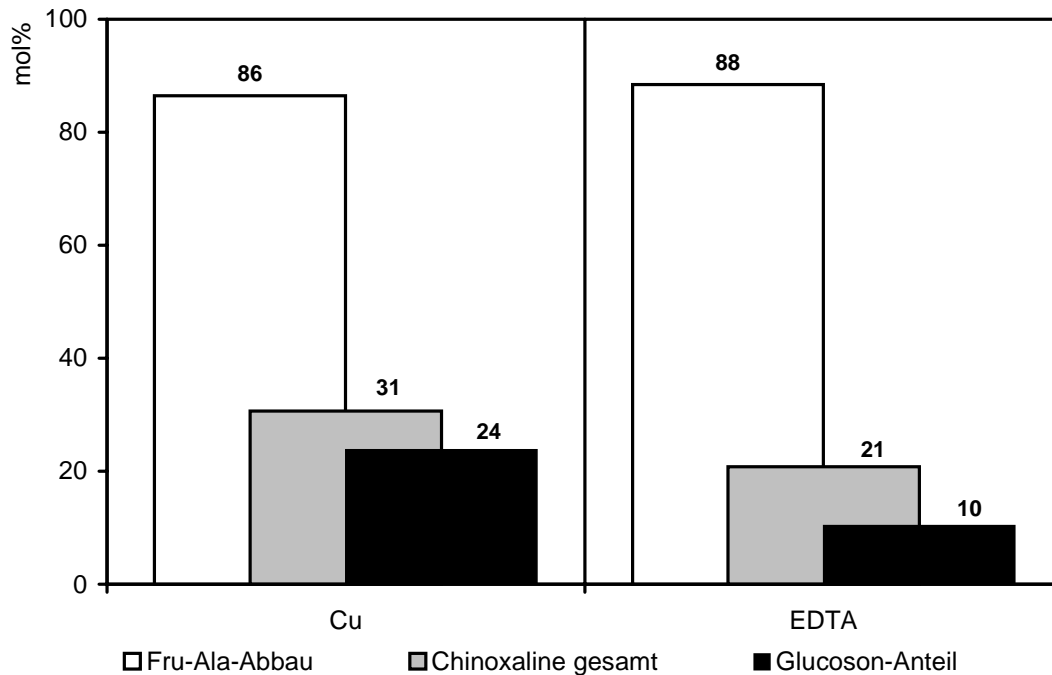
**Abbildung 60:** Abbau des Fructose-Alanins bei unterschiedlichen pH-Werten unter Kupfer-Katalyse. Der Abbau ohne Kupfer-Katalyse ist in dem kleinen Diagramm dargestellt.

Dies steht in einem klaren Gegensatz zu den Gegebenheiten in den wäßrigen Modellen. Hier war der Abbau der Amadori-Verbindung noch stark von der Anwesenheit von Kupferspuren abhängig. Bei Zusatz von Kupfer zu den Modellen erhöhte sich der Abbau der Amadori-Verbindung durch die Bildung des Glucosons teilweise um das Doppelte.

Grundsätzlich läßt sich somit feststellen, daß der Zusatz von Kupferionen zu den wasserarmen Systemen keinen signifikanten Einfluß auf die Menge der abgebauten Amadori-Verbindung hat. Doch die Anwesenheit von Kupferionen verschiebt zumindest die Verhältnisse der einzelnen Abbauewege zueinander; dies gilt natürlich nur in den Systemen, in denen das Kupfer überhaupt katalytisch wirksam ist.

In Abbildung 61 ist der Abbau der Amadori-Verbindung parallel zu der Bildung der Chinoxaline, die aus der Abfangreaktion der entstehenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit *o*-Phenylendiamin resultieren, für das System mit einer Wasseraktivität von 0,75 bei einem pH-Wert von 7,0 dargestellt. Der Einfluß der Kupfer-Katalyse zeigt sich hier nicht durch einen erhöhten Abbau des Fructose-Alanins, sondern durch eine Erhöhung der Glucoson-Bildung. Während bei dem Modell ohne Kupferzugabe nur 10 mol% zum Glucoson abgebaut werden, sind es bei Anwesenheit von Kupfer immerhin 24 mol%. Zum einen steigt dadurch der Anteil

des Glucosons an der Summe der als Chinoxaline nachgewiesenen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen; bei Kupferanwesenheit sind das drei Viertel der gebildeten Menge an  $\alpha$ -Dicarbonylen, während dies ohne Kupfer nur die Hälfte ist. Zum anderen werden durch die Kupferkatalyse an sich mehr  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau der Amadori-Verbindung gebildet. So stellt die Fraktion der Dicarbonyle ohne Kupfer-Katalyse nur ein Viertel der insgesamt abgebauten Menge an Fructose-Alanin. Sobald Kupferionen anwesend sind, machen die Dicarbonylverbindungen demgegenüber ein Drittel des Fructose-Alanin-Abbaus aus.



**Abbildung 61:** Anteil der Chinoxalin-Bildung am Abbau des Fructose-Alanins in Abhängigkeit von der Kupfer-Katalyse (pH 7,0 /  $a_w$ -Wert 0,75).

Diese positive Verschiebung zugunsten der nachgewiesenen Dicarbonylverbindungen resultiert jedoch einzig aus der Menge des gebildeten Glucosons, da die Desoxyosone als Konkurrenzprodukte bei diesen Bedingungen in etwas geringerem Maße gebildet werden.

#### 4.5 Zusammenfassung

In den wasserarmen Modellen steigt die Abbaurate der Amadori-Verbindung - wie erwartet - mit zunehmendem pH-Wert an. Bei allen untersuchten pH-Werten durchläuft der Abbau bei einer Wasseraktivität von 0,3 - 0,4 ein Maximum bzw. erreicht einen Maximalwert und fällt mit zunehmender Wasseraktivität ab, da hier das freie Wasser die Reaktionsgeschwindigkeit durch den auftretenden Verdünnungseffekt erniedrigt. Nur in dem Modell mit pH 7,0 steigt der Abbau zu den höheren  $a_w$ -Werten noch einmal an, denn unter diesen

Reaktionsbedingungen wird der oxidative Abbau, der zu dem Glucoson führt, begünstigt. Die Anwesenheit von Kupferionen beeinflusst den Abbau - anders als in den wäßrigen Systemen - mengenmäßig nicht. Es kommt lediglich bei den Modellen, in denen das Kupfer überhaupt katalytisch wirksam ist, zu einer Verschiebung der Abbauwege hin zum Glucoson. Insgesamt fällt auf, daß die katalytische Wirksamkeit der eingesetzten Menge an Kupferspuren stark von den jeweiligen Reaktionsbedingungen in den Modellen abhängig ist. So spielt die Kupfer-Katalyse bei einem pH-Wert von 3,0 gar keine Rolle, während bei pH 7,0 die größte Wirksamkeit bezogen auf die gebildete Menge an Glucoson nachgewiesen werden kann. Wichtig für die Wirksamkeit der Kupferionen ist ganz offensichtlich die Form, in der sie bei den unterschiedlichen pH-Werten in den Modellen vorliegen. So hat die als Puffersubstanz zugesetzte Citronensäure nur bei einem pH-Wert von 7,0 durch die Ausbildung eines Komplexes eine stabilisierende Wirkung, die die Kupfer-Katalyse positiv beeinflusst. Bei niedrigeren pH-Werten bildet sich ein entsprechender Kupfer-Citratkomplex nicht in dem gleichem Maße aus, so daß die Kupferionen durch die zunehmende Hydratisierung in ihrer katalytischen Wirkung gehemmt werden.

Dementsprechend hängt die Glucoson-Bildung in den wasserarmen Modellen stark vom pH-Wert des jeweiligen Systems ab. Die Kupfer-Katalyse hat in den Modellen mit einem pH-Wert kleiner als 5,0 nur einen geringen Einfluß auf die Bildung des Glucosons. Trotz der verringerten Kupfer-Katalyse stellt das Glucoson bei diesen pH-Werten in Gegenwart von Kupferionen das Hauptprodukt des Abbaus der Amadori-Verbindung dar.

Erst bei einem pH-Wert von 7,0 spielt die Kupfer-Katalyse eine große Rolle bei der Bildung des Glucosons. Mit zunehmender Wasseraktivität steigt hier die Bildungsrate fast linear an. Bei diesem pH-Wert kommt es zu einer ausgeprägten Konkurrenz zwischen der Bildung des Glucosons und der 2,3-Enolisierungsreaktion, die zum 1-Desoxyoson führt. Während bei  $a_w$ -Werten oberhalb von 0,5 das Glucoson in den Modellen mit Kupferionen das Hauptabbauprodukt der Amadori-Verbindung darstellt, ist bei den kleineren  $a_w$ -Werten der Abbauweg zum 1-Desoxyoson favorisiert. Somit kommt der oxidativen Glucoson-Bildung (mit und ohne Kupfer-Katalyse) in den wasserarmen Medien bei weitem nicht die Bedeutung zu, die dieser Abbauweg in wäßrigen Systemen hat.

Die Bildung des 1-Desoxyosons zeigt bei der Abhängigkeit von der Wasseraktivität mit der Ausbildung eines Maximums im Bereich von 0,3 - 0,4 die gleiche Charakteristik wie der Abbau der Amadori-Verbindung. Auch hier läßt sich das Durchlaufen eines Maximums mit der zuerst größer werdenden Mobilität der Reaktanden und dem schließlich zunehmenden Verdünnungseffekt erklären. Bei pH-Werten unter 5,0 spielt die 2,3-Enolisierung nur noch eine untergeordnete Rolle.

Die Bildung des 3-Desoxyosons läuft über dem gesamten pH-Bereich in der gleichen Größenordnung ab. Ein Bildungsmaximum läßt sich bei pH 5,0 erkennen, dies ist jedoch von

der Wasseraktivität des Systems abhängig. Auffällig ist, daß die Bildung des 3-Desoxyosons im Gegensatz zur Bildung des 1-Desoxyosons im Bereich der untersuchten Wasseraktivitäten kein Maximum durchläuft. Vielmehr bildet sich das 3-Desoxyoson in den Modellen mit dem geringsten Wassergehalt im größten Maße und nimmt dann mit zunehmender Wasseraktivität mehr und mehr ab. Dies läßt sich mit den unterschiedlichen Reaktionsmechanismen der beiden Enolisierungsreaktionen erklären, da das 3-Desoxyoson im ersten Schritt durch die Abspaltung eines Wassermoleküls in extrem wasserarmen Medien bevorzugt ablaufen sollte.

## 5 Untersuchungen zum Prozeß des Bierbrauens

### 5.1 Einleitung

Beim Prozeß des Bierbrauens spielt die Maillard-Reaktion eine wichtige Rolle. Durch die jeweilige Prozeßführung durchlaufen viele der Ausgangsstoffe Reaktionen im Sinne der nicht-enzymatischen Bräunung, wodurch eine Vielzahl von Produkten entstehen. Dabei handelt es sich durchaus um erwünschte Reaktionen. Die Maillard-Reaktion ist beim Brauprozeß mit verantwortlich für die Entwicklung des typischen Aromas. Auch die Färbung des Bieres ist weitgehend auf die Bildung von Melanoidinen aus der Maillard-Reaktion zurückzuführen. Bei den einzelnen Stufen des Brauprozesses wird die Maillard-Reaktion dabei durch unterschiedliche Erhitzungsphasen ganz bewußt gesteuert.

An dem Bierbrauprozeß soll gezeigt werden, inwieweit die Ergebnisse der wäßrigen Modelle auf reale Lebensmittel übertragbar sind. Die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen, die im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen, sollen bei den einzelnen Stufen des Brauprozesses abgefangen werden. Durch die unterschiedlichen Erhitzungsphasen während der Würzebereitung ergibt sich somit die Möglichkeit, unterschiedliche Reaktionsbedingungen zu untersuchen und zu bewerten.

#### 5.1.1 Die Grundstoffe für die Bierbereitung

Nach dem deutschen Reinheitsgebot von 1516 darf Bier lediglich aus Malz, Wasser, Hopfen und Hefe hergestellt werden. Trotz dieser Beschränkungen bei den Ausgangsstoffen ergeben sich eine Vielzahl verschiedener Bier-Typen und Sorten. Denn bereits die Verwendung von unterschiedlichen Malzen und Hefen prägt das fertige Produkt maßgeblich. Nicht zuletzt ist aber auch die Prozeßführung mit ausschlaggebend für das Aroma, die Farbe und den Alkoholgehalt des Bieres.

##### 5.1.1.1 Das Malz

Unter den Rohprodukten des Bieres nimmt das Braumalz aus Gerste die erste Stelle ein. Wenn auch - je nach Biertyp - noch andere stärke- und zuckerhaltige Rohstoffe eingesetzt werden (Weizenmalz, oder abweichend vom Reinheitsgebot Rohfrucht aus Mais oder Reis), so ist das Gerstenmalz an sich durch keine andere Getreidesorte zu ersetzen [104].

Neben einem Gehalt von 2,0 - 3,0 g/100g Tr. an niederen Kohlenhydraten enthält die Braugerste ca. 55 - 66 g/100g Tr. Stärke, die im Verlauf des Brauprozesses durch die eigenen Enzyme in die vergärbaren Kohlenhydrate umgewandelt wird. Daneben enthält die Braugerste noch ca. 10 g/100g Tr. Eiweißstoffe, wobei eiweißarme Gerste als feinere Braugerste für helle Biere Pilsener Art verwendet wird. Eiweißreiche Gerstensorten hingegen werden be-



vorzugt zur Herstellung von dunklen Spezialmalzen verwendet, da hier mehr Aminosäuren für die Bildung gefärbter Melanoidine zur Verfügung stehen [105].

Durch das sogenannte Mälzen wird aus der Braugerste das eigentliche Braumalz. In einem ersten Schritt wird der Braugerste beim Weichen das zur Keimung notwendige Wasser zugeführt. Nach dem Weichen hat das Korn einen Endwassergehalt von 42 - 46 g/100g. Nun wird das Korn bei guter Durchlüftung zum Keimen gebracht. Während dieses Vorgangs entwickelt sich der Keimling und es kommt durch die korneigenen Enzyme zu einer Umsetzung des Mehlkörpers. Während der sieben- bis neuntägigen Keimung werden ca. 20 % der vorhandenen Stärke durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen abgebaut. So entsteht zum einen Maltose, zum anderen aber auch Glucose und Saccharose, die über geeignete Enzymsysteme aus der Maltose gebildet werden [105].

Das Ergebnis der Keimung ist das sogenannte Grünmalz, das wegen seines hohen Wassergehaltes leicht verderblich ist. Deswegen schließt sich an die Keimung der Darrprozeß an, der über eine entsprechende Trocknung das Malz in eine lagerstabile Form überführt. Des Weiteren werden die chemisch-biologischen Umsetzungen gebremst bzw. zum Abschluß gebracht. Die Enzyme werden jedoch keineswegs vollständig inaktiviert. Gleichzeitig bilden sich über die Maillard-Reaktion bereits die ersten Aromastoffe und die braune Farbe des Malzes.

Das Darren unterteilt sich in mehrere Trocknungsstufen bei unterschiedlichen Temperaturen. Schließlich wird das Darrmalz wieder auf einen lagerstabilen Wassergehalt von 2 - 3 g/100g gebracht. Das Darrmalz wird abschließend von den anhaftenden Keimlingen befreit und poliert.

Für die eigenen Untersuchungen zum Brauprozeß stellt ein helles Darrmalz das Hauptausgangsprüdukt dar. Es enthält sämtliche Verbindungen, die für den Ablauf der nicht-enzymatischen Bräunung verantwortlich sind.

#### **5.1.1.2 Das Brauwasser**

Die Qualität des Brauwassers ist entscheidend für die Güte des Bieres, denn das Wasser ist Träger sämtlicher physiologischer Prozesse. Aber auch für die chemischen Reaktionen - wie etwa die nicht-enzymatische Bräunung - ist die Wasserqualität eine wichtige Größe. In erster Linie ist es der Gehalt an unterschiedlichen Ionen, die den Brauprozeß beeinflussen. So ist beispielsweise die Härte des Wassers mit ausschlaggebend dafür, daß sich ein Dortmunder Bier Pilsener Brauart so sehr von einem Ur-Pilsener unterscheidet [106]. Eine wichtige Kenngröße ist hierbei natürlich auch der pH-Wert des Brauwassers, wobei bereits kleinere pH-Wert-Änderungen eine deutliche Wirkung auslösen können. So kann sich beispielsweise eine zu hohe Restalkalität durch Bicarbonationen negativ auf die Enzymaktivität auswirken. Durch den daraus resultierenden, verminderten Stärkeabbau kommt es aber nicht nur zu einer Verringerung des vergärbaren Extraktes und somit zu einer verringerten Sudausbeute.

Ebenso können durch die erhöhte Viskosität der Würze technologische Probleme auftreten - etwa in Form einer langsameren Filtration beim Abläutern. Für großtechnische Brauprozesse kann deshalb eine Aufbereitung des Brauwassers notwendig sein.

### **5.1.1.3 Weitere Inhaltsstoffe**

#### ***Die Hefe***

Als Bierhefen werden ausschließlich Saccharomyces-Arten verwendet. Man unterscheidet obergärende Hefen, die während des Gärprozesses in Sproßverbänden durch anhaftende Kohlendioxidblasen an der Oberfläche schwimmen und untergärende Hefen, die sich im Gärungsverlauf am Boden des Gärbottichs absetzen. Auf die Hefen soll hier nicht weiter eingegangen werden, da sie für die untersuchte Maillard-Reaktion während der Würzebereitung keine Rolle spielen.

#### ***Der Hopfen***

Der Hopfen wird in Form der weiblichen Blütenstände mit den Vor- und Hochblättern beim Kochen der Würze zugesetzt. Durch die Bitterstoffe ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Bittersäuren) trägt der Hopfen maßgeblich zum typischen Biergeschmack bei. Bei den  $\alpha$ -Bittersäuren unterscheidet man das Humulon, Cohumulon und das Adhumulon, bei den  $\beta$ -Bittersäuren analog das Lupulon, Colupulon und das Adlupulon. Insgesamt handelt es sich hierbei um Verbindungen, die aufgrund ihres phenolischen Charakters und mehrerer Doppelbindungen sehr reaktiv sind und durch Isomerisierung oder Oxidationen zu zahlreichen Folgeprodukten führen können. Durch die zusätzlich enthaltenen Gerbstoffe bewirkt der Hopfen außerdem eine Fällung der Eiweißstoffe. Insgesamt wird durch die Hopfenzugabe die Haltbarkeit des Bieres erhöht.

## **5.1.2 Die Würzebereitung**

### **5.1.2.1 Das Schrotten des Malzes**

Das Malz als wichtigster Ausgangsstoff wird in einem ersten Schritt geschrotet. Dabei soll der Mehlkörper für eine bessere Extraktion optimal zerkleinert werden, die Spelzen jedoch nur wenig. So erreicht man hinterher eine schnellere Abtrennung des ausgelaugten Trebers, da der gequollene Mehlkörper durch den Anteil grober Spelzen eine nicht zu kompakte Masse bei der Filtration ergibt. Idealerweise sollte das geschrotete Malz einen zehnpromentlichen Spelzenanteil ( $> 1,27$  mm) enthalten. Der restliche Mehlkörper sollte sich aus Grießen und Mehlen mit einer Korngröße unter  $0,55$  mm zusammensetzen. Erreicht wird dies durch Schrotten des Malzes in Walzenmühlen, wobei die einzelnen Fraktionen Spelzen, Grieße und Mehle durch Siebböden voneinander getrennt werden. Zum Einmaischen werden die einzelnen Siebfractionen des Malzschrotes dann wieder vermengt [106].

### 5.1.2.2 Der Maischprozeß

Beim Einmaischen wird das geschrotete Malz mit dem Brauwasser vermischt. Das Mengenverhältnis ist je nach Biersorte unterschiedlich. Generell werden ca. 100 kg Malz mit 8 hl Wasser (Guß) angesetzt. Dabei unterscheidet man in Haupt- und Nachguß. Der Hauptguß (4 - 5 hl) ist die Wassermenge, die direkt beim Einmaischen verwendet wird. Der Nachguß (ebenfalls 4 - 5 hl) wird zum Auswaschen des Trebers nach dem eigentlichen Maischprozeß eingesetzt, um den Extraktgehalt zu erhöhen.

Der eigentliche Maischprozeß schließt sich direkt an das Einmaischen an. Hierbei wird die Maische direkt oder indirekt innerhalb einer gewissen Zeitspanne langsam auf eine Abmaischtemperatur von 75 - 78 °C erhitzt.

Eine der wichtigsten Reaktionen während des Maischprozesses ist der enzymatische Stärkeabbau zu den durch die Hefen vergärbaren Kohlenhydraten (Maltose, Glucose, Saccharose). Während der ersten Phase des Maischens kommt es zu einer Quellung des Stärkekorns. Mit steigender Temperatur verkleistert die Stärke zunehmend. Schließlich wird die Stärke durch malzeigene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen zu löslichen und vergärbaren Kohlenhydraten gespalten. Während der Aufheizphase stehen somit auch vermehrt reduzierende Zucker für die Maillard-Reaktion zur Verfügung. Als Folge davon bilden sich während des Maischens typische Aromastoffe und braungefärbte Melanoidine.

Der eigentliche Aufheizprozeß kann dabei in zwei unterschiedliche Verfahren, das Infusionsverfahren und das Dekoktionsverfahren eingeteilt werden [107].

Bei dem Infusionsverfahren wird die gesamte Maische direkt unter Einhaltung bestimmter Temperaturstandzeiten, die durch die Temperaturoptima der Enzyme bestimmt werden, auf die Abmaischtemperatur aufgeheizt.

Bei den Dekoktionsverfahren werden kleinere Teile der Maische bis zur Kochtemperatur erhitzt und dann zur Gesamtmaische gegeben, wodurch diese stufenweise erwärmt wird. Je nach Anzahl der gekochten Teilmaischen unterscheidet man Drei-, Zwei- und Einmaischverfahren.

Nach dem ca. zweistündigen Maischprozeß wird der als Treber bezeichnete, unlösliche Rückstand abfiltriert, mit dem Nachguß ausgewaschen und ausgepreßt. Durch diesen als Läutern bezeichneten Vorgang erhält man die Vorder- und Nachwürze, die zur Pfannenvollwürze vereinigt werden.

### 5.1.2.3 Das Kochen der Würze

Die Pfannenvollwürze wird unter Zugabe von Hopfen in den Würzpfannen gekocht. Die Würzpfannen bestehen heute meistens aus Stahl; früher benutzte man ausschließlich Kupferpfannen, da Kupfer die Wärme besser leitet.

Der Kochvorgang erfüllt dabei mehrere Zwecke. Zum einen wird überschüssiges Wasser verdampft, wodurch eine bestimmte Würzekonzentration erzielt wird. Durch das Kochen kommt es außerdem zu einer Zerstörung der Enzyme und zur Sterilisierung der gesamten Würze. Bei den hohen Temperaturen werden zusätzlich unerwünschte Eiweißstoffe denaturiert und ausgefällt. Schließlich soll es zu einem Lösen der wertgebenden Hopfenbestandteile kommen. In den Würzpfannen verdampft ca. 8 - 10 % der Flüssigkeit pro Stunde. Die Kochzeit der Würze beträgt hierbei insgesamt mindestens 100 - 120 Minuten. Während des Würzekochens kommt es zu einer Farbvertiefung, die zum einen in der zunehmenden Aufkonzentrierung der Inhaltsstoffe begründet ist, zum anderen von der parallel ablaufenden Maillard-Reaktion herrührt. Ebenfalls auf die Maillard-Reaktion zurückzuführen ist die Bildung von Reduktonen beim Würzekochen [107]. Bei diesen Reduktonen handelt es sich um Verbindungen, die über eine Endiol-Dicarbonyl-Struktur verfügen, aus der reduzierende Eigenschaften resultieren. Im Bereich der Brautechnologie werden diese Reduktone nicht weiter spezifiziert. Man unterscheidet lediglich Zuckerreduktone, die sich direkt aus den erhitzten niederen Kohlenhydraten bilden und die Melanoidine, die ebenfalls teilweise über Reduktonstrukturen verfügen. Bei den Reduktonen handelt es sich durchaus um erwünschte Verbindungen, da sie eine gewisse Schutzwirkung gegen oxidative Prozesse an den oxidationsempfindlichen Inhaltsstoffen der Würze ausüben.

Nach dem Abtrennen des Hopfens und des Eiweißbruchs wird die Würze gekühlt und vor der Gärung mit Wasser auf den gewünschten Extraktgehalt (6,5 - 18 % Malzextrakt) eingestellt.

### **5.1.3 Die Gärung**

Bei den unterschiedlichen Gärverfahren unterscheidet man in Abhängigkeit von den eingesetzten Hefen die Unter- und Obergärung [104].

Bei der Untergärung wird die gekühlte Würze bei 6 - 10 °C in sechs bis zehn Tagen durch die Hefen vergoren. Zur Nachgärung und Reifung wird das Jungbier anschließend ein bis zwei Monate bei 1 - 2 °C gelagert.

Die Obergärung wird bei 18 - 25 °C - also bei deutlich höheren Temperaturen - angesetzt. Dadurch kann die Gärdauer auf zwei bis sieben Tage verkürzt werden. Bei obergärigen Bieren entfällt die Nachgärung meist.

Schließlich wird die Hefe im Normalfall abgetrennt und das Bier in die unterschiedlichen Transportbehälter abgefüllt.

## **5.2 Der Brauprozess im Labormaßstab**

Bei den eigenen Untersuchungen sollte der Prozeß des Bierbrauens in einem kleineren Labormaßstab nachvollzogen werden. Da das Hauptaugenmerk auf der Bildung der unter-

schiedlichen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau der Amadori-Verbindungen lag, sollten auch nur die für die Maillard-Reaktion relevanten Schritte untersucht werden.

Ausgehend von einem Gerstenbraumalz wurden die einzelnen Stufen der Würzebereitung prozeßbegleitend untersucht. Aufgearbeitet wurden die Proben der einzelnen Stufen nach dem Schema in 2.1.3.

In einem ersten Schritt wird das Gerstenmalz mit einer Mikroschlagmühle geschrotet. Durch einen geeigneten Siebeinsatz der Maschenweite 1,2 mm erreicht man die gewünschte Trennung des feinen Mehlanteils von den noch relativ unbeschädigten Spelzen. Für den Brauprozess werden die Spelzen und der Mehlanteil wieder vereinigt und gut durchmischt.

Von dem geschroteten Malz wird eine Grundanalyse der einzelnen Inhaltsstoffe durchgeführt, um Aussagen über die Ausgangsbedingungen für den anschließenden Brauprozess machen zu können.

Die Würzebereitung im Labormaßstab gliedert sich in zwei Hauptstufen: den Maischprozeß und das Würzekochen. Bei beiden Prozessen spielt die nicht-enzymatische Bräunung eine große Rolle. Die Reaktionsbedingungen bei diesen Stufen sind - was Ausgangsverbindungen, Temperatur und Erhitzungsdauer angeht - deutlich unterschiedlich, so daß auch im Verlauf der Maillard-Reaktion mit unterschiedlichen Produkten zu rechnen ist.

Für die Würzebereitung werden 20 g Malz mit 100 ml Wasser eingemaischt. Das entspricht einem großtechnisch üblichen Hauptguß von 5 hl auf 100 kg Malz. Zum Einmaischen wird destilliertes Wasser eingesetzt, da so keine Fremdionen zugesetzt werden, die die einzelnen Reaktionen beeinflussen könnten. Der pH-Wert der Lösung liegt nach dem Einmaischen bei 5,8 - 5,9; er verändert sich während des Maischprozesses kaum. Auf eine Korrektur des pH-Wertes wurde verzichtet. Das Einmaischen geschieht auf einem beheizbaren Magnetrührer, in einem Zweihalskolben mit Rückflußkühler und Thermometeraufsatz. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß sich die Wassermenge während des Maischens - ähnlich wie im Maischebottich - nicht verändert. Durch die ständige Temperaturkontrolle kann eine reproduzierbare Temperaturführung erreicht werden. Der Maischprozeß beginnt bei Raumtemperatur (ca. 25 °C). Durch langsames Aufheizen wird der Kolbeninhalt innerhalb von zwei Stunden auf die Abmaischtemperatur von 78 °C gebracht. Während der Aufheizphase durchläuft die Maische die Temperaturoptima der einzelnen Enzyme. Bei dem Maischprozeß handelt es sich somit um ein Infusionsverfahren, bei dem die gesamte Maische kontinuierlich erhitzt wird. Ein Dekoktionsverfahren wie das Drei- oder Zweimaischverfahren wäre im Labormaßstab nur schwer zu realisieren. Nach dem Maischen wird der Treber durch Filtration abgetrennt. Die so erhaltene Maische (Vorderwürze) stellt das erste Zwischenprodukt der Würzebereitung im Labormaßstab dar und wird auf die relevanten Inhaltsstoffe untersucht.

Zum Würzekochen wird der Treber mit einem Nachguß von ca. 100 ml Wasser (entspricht 5 hl/100g Malz), das auf 78 °C erwärmt wurde, nachgewaschen. Die so erhaltene Nachwürze wird mit der Vorderwürze vereinigt. Das Gesamtvolumen wird zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse auf 200 ml ergänzt. Diese Pfannenwürze wird nun in einem offenen Becherglas zum Kochen erhitzt und für 1 ½ Stunden unter Rühren bei dieser Temperatur belassen. Dabei verdampft mehr als die Hälfte des in der Würze enthaltenen Wassers. Die Würze wird abgekühlt und abfiltriert und zur besseren Vergleichbarkeit im Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt. Diese Korrektur des Volumens der so erhaltenen Würze entspricht der Einstellung des Malzextraktes vor der eigentlichen Gärung. Die standardisierte Würze wird wie vorher das Malz und die Maische auf die Inhaltsstoffe untersucht.

Auf den Zusatz von Hopfen bei dem Kochen der Würze wurde im Labormaßstab verzichtet, da dies keinen unmittelbaren Einfluß auf die nicht-enzymatische Bräunung und deren Abbauprodukte hat.

### 5.2.1 Bildung von Mono- und Disacchariden während des Brauprozesses

Bei den im eingesetzten Gerstenmalz enthaltenen Mono- und Disacchariden stellt die Maltose mit 4,5 g/100g Malz den Hauptbestandteil dar (Tabelle 6). Die Glucose mit 1,9 g/100g und die Saccharose mit 3,3 g/100g spielen ebenfalls eine gewisse Rolle, während der Gehalt an Fructose mit 0,3 g/100g relativ gering ist.

**Tabelle 6: Gehalte der Mono- und Disaccharide bei den einzelnen Stufen des Brauprozesses**

|                   | Malz   | Maischprozeß |         | Würzekochen |         |
|-------------------|--------|--------------|---------|-------------|---------|
|                   | g/100g | g/100g Malz  | g/100ml | g/100g Malz | g/100ml |
| <b>Fructose</b>   | 0,3    | 0,5          | 0,10    | 0,6         | 0,12    |
| <b>Glucose</b>    | 1,9    | 2,5          | 0,50    | 3,8         | 0,76    |
| <b>Saccharose</b> | 3,3    | 2,4          | 0,48    | 2,3         | 0,45    |
| <b>Maltose</b>    | 4,5    | 31,8         | 6,36    | 40,0        | 8,00    |

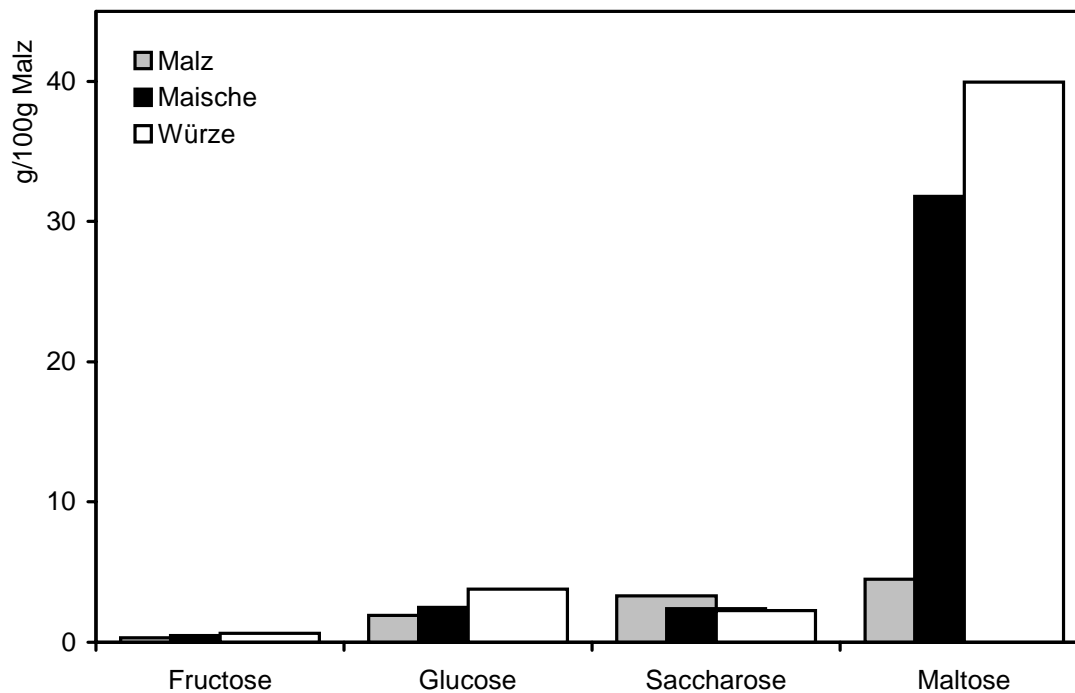
Der Gehalt an niederen Kohlenhydraten im eigentlichen Gerstenkorn ist mit 2 - 3 g/100g noch deutlich geringer als im Malz. Der erhöhte Gehalt im Malz erklärt sich aus der durchlaufenen Keimung. Hierbei werden die korneigenen Enzyme aktiviert und die Stärke als Reservestoff des Kornes wird teilweise abgebaut. Bei der Keimung ist es zuerst die  $\alpha$ -Amylase, die die genuine Stärke zu Dextrinen abbaut, die dann von der  $\beta$ -Amylase in Maltose gespalten werden. Die Maltose selbst wird allerdings während der Keimung auch

teilweise in Glucose umgesetzt [105]. So folgt eine Erhöhung des Glucosegehaltes (Ausgangsgehalt im Malz: 1,9 g/100g) aus der Aktivität der Maltase, die die Maltose in zwei Glucose-Moleküle spaltet. Auch der Gehalt an Saccharose steigt bei der Keimung. Sie wird über ein spezielles Enzymsystem aus zwei Molekülen Glucose gebildet und stellt die Haupttransportform der Kohlenhydrate im Keimling dar. Bei der Spaltung der Saccharose durch Invertase entstehen Fructose und Glucose, wobei die Fructose vom Keimling schneller verstoffwechselt werden kann und sie so nur in geringen Mengen nach der Keimung nachzuweisen ist.

Der Darrprozeß bremst diese Enzymaktivitäten, so daß sich im fertigen Malz die nachgewiesenen Gehalte ergeben.

Während der Aufheizphase im Verlauf des Maischens werden die einzelnen Enzymsysteme wieder aktiviert. Der Stärkeabbau beginnt mit der Quellung und dem Verkleistern des Stärkekorns. Die  $\alpha$ -Amylase weist in Maischen ein Temperaturoptimum von 72 - 75 °C auf, während das der  $\beta$ -Amylase bei 60 - 65 °C liegt. Die kombinierte Wirkung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase über einen breiten Temperaturbereich führt dazu, daß die Stärke während des Maischprozesses hauptsächlich zu Maltose abgebaut wird. In der Regel werden ca. 40 % der Stärke zur Maltose umgesetzt; bei unseren Untersuchungen steigt der Maltosegehalt in der Maische auf 6,4 g/100ml. Umgerechnet auf die eingesetzte Malzmenge werden aus 100 g Malz 32 g Maltose gebildet. Der Anstieg an Glucose während des Maischens von 1,9 g/100g auf 2,5 g/100g ist deutlich geringer. Die Maltase zeigt ein relativ niedriges Temperaturoptimum bei 35 - 40 °C, so daß nur wenig Monosaccharide gebildet werden. Für die Fructose und die Saccharose sollten beim Maischen kaum Veränderungen zu beobachten sein, da sie vor allem während des Mälzens gebildet werden. Der Saccharosegehalt nimmt bei unserem Maischprozeß dementsprechend ab, wodurch der Fructosegehalt etwas ansteigt, da die gebildete Fructose nun nicht mehr verstoffwechselt wird (Tabelle 6).

Mit dem Kochen der Würze sollten die Enzymaktivitäten eigentlich abgeschlossen sein. Folglich sollten nur noch wenig niedere Kohlenhydrate gebildet werden. Bei der eigenen Würze steigt der Maltosegehalt jedoch auch während des Kochens noch etwas auf 40 g je 100 g eingesetztes Malz an. Das liegt zum einen daran, daß die Verzuckerung der Stärke im Labormaßstab nach dem Maischen keineswegs vollständig ist und deshalb noch relativ große Mengen an Substrat zur Verfügung stehen. Hinzu kommt, daß sich in extraktreichen Maischen und Würzen Schutzkolloide bilden können, die die Enzyme widerstandsfähiger machen. Nach einiger Zeit werden jedoch auch die letzten Enzyme denaturiert, so daß die Zunahmen an Mono- und Disacchariden während des Würzekochens relativ gering sind.



**Abbildung 62: Bildung der Mono- und Disaccharide während des Brauprozesses**

Es läßt sich zusammenfassen, daß die Maltose die Hauptkomponente der niederen Kohlenhydrate während der gesamten Würzebereitung darstellt (Abbildung 62). Sie ist das Hauptabbauprodukt der Stärke und wird vor allem während des Maischens gebildet. Parallel dazu steigt auch jeweils der Gehalt an Glucose, während der Saccharosegehalt abnimmt. Die Fructose spielt während der Würzebereitung keine Rolle.

### 5.2.2 Bildung von Aminosäuren während des Brauprozesses

Das Gerstenkorn enthält ca. 10 g/100g Proteine. Beim Brauprozeß spielen die Proteine eine untergeordnete Rolle. Ein zu hoher Gehalt an Proteinen beeinflusst das fertige Produkt negativ, weswegen der Hauptanteil der Proteine bei dem Kochen der Würze denaturiert wird und als Bruch abgetrennt werden kann [105].

Bei der Keimung kommt es durch den Abbau von Hemmstoffen zu einer Aktivierung der Proteasen. Ähnlich wie bei den Amylasen kann man auch hier Endopeptidasen (Proteinasen) und Exopeptidasen (Peptidasen) unterscheiden. Während die Endopeptidasen die Proteinketten von innen in kleinere Polypeptidketten spalten, greifen die Exopeptidasen die Proteinketten vom Ende her an und trennen einzelne Aminosäuren ab. Dabei gibt es Peptidasen, die - bezogen auf den Wirkort - relativ unspezifisch sind und solche, die spezifisch nur eine bestimmte Peptidbindung spalten. Durch die Aktivierung der Proteasen lassen sich im Braumalz freie Aminosäuren nachweisen (Tabelle 7). Die Gehalte der einzelnen Aminosäuren liegen dabei zwischen 20 und 60 mg/100g.



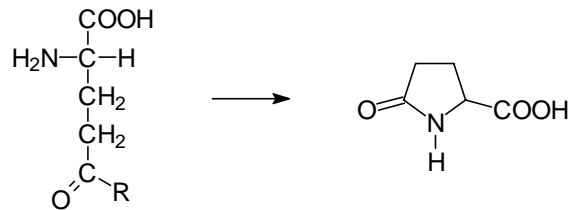
Tabelle 7: Gehalte der Aminosäuren bei den einzelnen Stufen des Brauprozesses

|   | Malz    | Maischprozeß |          | Würzekochen  |          |
|---|---------|--------------|----------|--------------|----------|
|   | mg/100g | mg/100g Malz | mg/100ml | mg/100g Malz | mg/100ml |
| <b>Asparaginsäure</b>                       | 17,9    | 22,8         | 4,6      | 25,1         | 5,0      |
| <b>Glutaminsäure</b>                        | 22,8    | 30,1         | 6,0      | 35,7         | 7,1      |
| <b>Arginin</b>                              | 57,0    | 59,3         | 11,9     | 66,8         | 13,4     |
| <b>Alanin</b>                               | 42,4    | 40,3         | 8,1      | 43,2         | 8,6      |
| <b>Valin / Methionin</b>                    | 54,0    | 53,5         | 10,7     | 57,3         | 11,5     |
| <b>Phenylalanin</b>                         | 59,7    | 58,0         | 11,6     | 64,3         | 12,9     |
| <b>Leucin</b>                               | 57,9    | 58,0         | 11,6     | 63,0         | 12,6     |
| <b>Lysin</b>                                | 24,9    | 29,5         | 5,9      | 33,6         | 6,7      |
| <b>Serin</b>                                | 27,3    | 28,8         | 5,8      | 31,3         | 6,3      |
| <b>Histidin</b>                             | 22,8    | 22,5         | 4,5      | 23,2         | 4,6      |
| <b>Glycin</b>                               | 11,0    | 9,9          | 2,0      | 10,8         | 2,2      |
| <b>Isoleucin</b>                            | 32,1    | 31,2         | 6,2      | 33,8         | 6,8      |
| <b>Asparagin</b>                            | 35,8    | 39,1         | 7,8      | 41,8         | 8,4      |
| <b>Glutamin</b>                             | 97,8    | 69,2         | 13,8     | 47,4         | 9,5      |
| <b>Threonin</b>                             | 22,8    | 22,1         | 4,4      | 23,9         | 4,8      |
| <b><math>\gamma</math>-Aminobuttersäure</b> | 26,5    | 20,5         | 4,1      | 20,6         | 4,1      |
| <b>Tyrosin</b>                              | 42,3    | 39,6         | 7,9      | 43,5         | 8,7      |
| <b>Tryptophan</b>                           | 25,6    | 21,9         | 4,4      | 23,5         | 4,7      |

Eine Ausnahme stellt das Glutamin dar, das mit ca. 100 mg/100g die Hauptkomponente der Aminosäuren darstellt. Während der Würzebereitung verändern sich die Gehalte der einzelnen Aminosäuren mit Ausnahme des Glutamins nur wenig. Bei einigen Aminosäuren (z.B.: Asp, Arg, Leu, Lys) ist zwar eine geringe Zunahme zu erkennen, doch beträgt diese nur 10 bis 20 %.

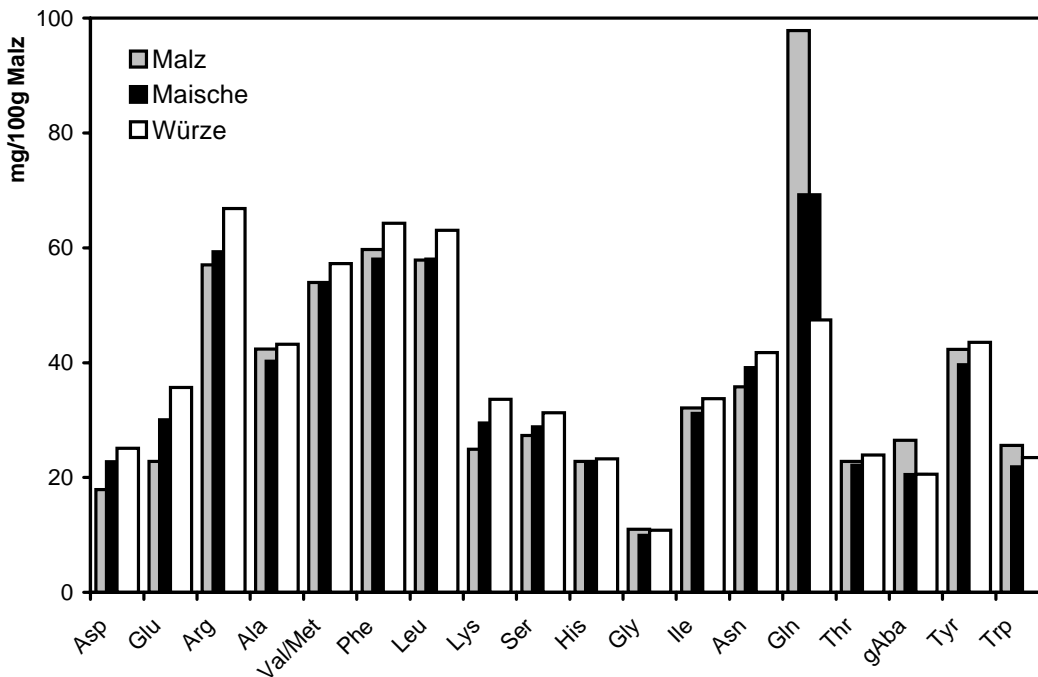
Der enzymatische Abbau der Proteine ist mit dem Mälzen eigentlich schon abgeschlossen. Der Hauptteil des Aleuronproteins passiert den Maischprozeß praktisch unverändert und wird durch die Hitzedenaturierung mit dem Treber abgetrennt. So kommt es zwar zu einem technologisch bedeutsamen Eiweißabbau, doch führt dieser nicht bzw. nur in sehr geringem Umfang zu freien löslichen Aminosäuren. Statt dessen erhöht sich der Anteil der stickstoffhaltigen Substanzen in der Maische durch die Bildung löslicher Peptidbruchstücke.

Deutlich verändert sich nur der Gehalt an Glutamin während der Würzebereitung. Ist das Glutamin im Malz noch mit ca. 100 mg/100g die Hauptaminosäure, so sinkt der Gehalt während des Maischprozesses schon auf ca. 70 mg. In der fertigen Würze lassen sich dann nur noch 47 mg Glutamin nachweisen. Dieser Abbau resultiert aus der Hitzeempfindlichkeit des Glutamins. Während der Erhitzungsprozesse des Maischens und des Würzekochens wird das Glutamin über eine intramolekulare Lactambildung zur Pyrrolidoncarbonsäure (PCA) umgesetzt (Abbildung 63). Grundsätzlich kann auch die Glutaminsäure zu dem Lactam umgesetzt werden, die Bildung erfolgt jedoch bevorzugt aus dem Glutamin [108].



**Abbildung 63:** Bildung von Pyrrolidoncarbonsäure (PCA) aus Glutamin (R = NH<sub>2</sub>) und Glutaminsäure (R = OH).

Die Pyrrolidoncarbonsäure ist im sauren Bereich beständig. Bei höheren pH-Werten kann es durch eine Ringöffnung wieder zur Bildung von Glutaminsäure kommen. Bei der untersuchten Maische (pH 5,9) ist eine teilweise Spaltung der entstehenden PCA zur Glutaminsäure ebenfalls denkbar. Tatsächlich steigt der Gehalt an Glutaminsäure während der zwei Stufen der Würzebereitung leicht an (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Bildung und Abbau von Aminosäuren während des Brauprozesses

Während der Würzebereitung sind sowohl in der Maische als auch in der Würze 130 - 140 mg freie Aminosäuren je 100 g eingesetztes Malz nachweisbar. Diese stehen als Amino-komponenten für die Maillard-Reaktion zur Verfügung. Auch wenn es während der beiden Stufen der Würzebereitung zu einer deutlichen Braunfärbung der Lösungen kommt, so kann ein paralleler Abbau der Aminosäuren nicht nachgewiesen werden.

### **5.2.3 Bildung und Abbau von Amadori-Verbindungen während des Brau-prozesses**

Amadori-Verbindungen stellen die ersten analytisch faßbaren Zwischenprodukte der nicht-enzymatischen Bräunung dar. Ihr Nachweis gelang in einer Vielzahl von erhitzten oder getrockneten Lebensmitteln [6].

Auch in dem eingesetzten Braumalz können beim Darrprozeß gebildete Amadori-Verbindungen nachgewiesen werden (Tabelle 8, vergl. [25]). Insgesamt enthält das eingesezte Malz 54,7 mg Amadori-Verbindungen je 100 g Malz. Die Hauptkomponenten stellen hierbei das Fructose-Valin und das Fructose-Leucin mit jeweils ca. 10 mg/100g dar. Die anderen nachgewiesenen Amadori-Verbindungen liegen im vorliegenden Malz bei 4,0 - 7,0 mg/100g. Eine Ausnahme stellt das Fructose-Glycin dar, das mit nur 0,3 mg/100g eine untergeordnete Rolle spielt, da das Glycin unter den Aminosäuren auch nur eine Minorkomponente darstellt.

Die Bildung der Amadori-Verbindungen während der Malzbereitung erfolgt beim Darren des Grünmalzes. Hier wird das ausgekeimte Grünmalz in mehreren Trocknungsschritten auf einen Endwassergehalt von 2 - 3 g/100g gebracht. Nach der Keimung liegen durch die enzymatischen Prozesse große Gehalte an reduzierenden Zuckern und freien Aminosäuren vor, die nun zu den Amadori-Verbindungen reagieren können. Gerade während des letzten Schrittes der Trocknung durchläuft die Wasseraktivität im Malz den kritischen Bereich, bei dem die nicht-enzymatische Bräunung bevorzugt abläuft. Bei typischen Abdarrtemperaturen von ca. 80 °C bilden sich in dieser Phase vermehrt Amadori-Verbindungen, die im fertigen getrockneten Malz relativ stabil sind und dort nachgewiesen werden können. Das Verhältnis der einzelnen Amadori-Verbindungen zueinander ergibt sich dabei nicht zwangsläufig aus dem Verhältnis der vorliegenden freien Aminosäuren. Vielmehr ist es die unterschiedliche Reaktivität der einzelnen Aminosäure, die entscheidend für die Bildungsrate der korrespondierenden Amadori-Verbindung ist. Auch sind die Amadori-Verbindungen unterschiedlich stabil, so daß einige schneller weiter reagieren als andere [25].

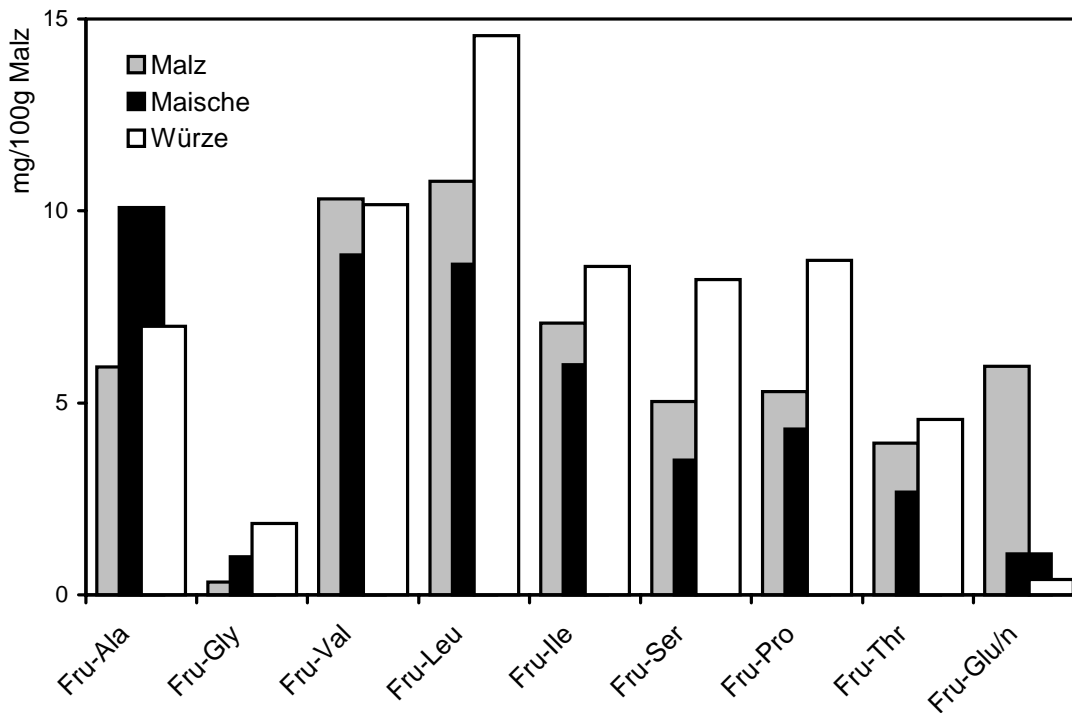
Tabelle 8: Gehalte an Amadori-Verbindungen bei den einzelnen Stufen des Brauprozesses

|                             | Malz   | Maischprozeß    |         | Würzekochen |         |
|-----------------------------|--------|-----------------|---------|-------------|---------|
|                             | g/100g | RT - 78 °C, 2 h |         | 1 ½ h       |         |
|                             |        | g/100g Malz     | g/100ml | g/100g Malz | g/100ml |
| <b>Fru-Alanin</b>           | 5,9    | 10,1            | 2,0     | 7,0         | 1,4     |
| <b>Fru-Glycin</b>           | 0,3    | 1,0             | 0,2     | 1,9         | 0,4     |
| <b>Fru-Valin</b>            | 10,3   | 8,9             | 1,8     | 10,2        | 2,0     |
| <b>Fru-Leucin</b>           | 10,8   | 8,6             | 1,7     | 14,6        | 2,9     |
| <b>Fru-Isoleucin</b>        | 7,1    | 6,0             | 1,2     | 8,6         | 1,7     |
| <b>Fru-Serin</b>            | 5,0    | 3,5             | 0,7     | 8,2         | 1,6     |
| <b>Fru-Prolin</b>           | 5,3    | 4,3             | 0,9     | 8,7         | 1,7     |
| <b>Fru-Threonin</b>         | 4,0    | 2,7             | 0,5     | 4,6         | 0,9     |
| <b>Fru-Glutamin /-säure</b> | 6,0    | 1,1             | 0,2     | 0,4         | 0,1     |
| <b>Summe</b>                | 54,7   | 46,1            | 9,2     | 64,1        | 12,8    |

Während des Maischprozesses nimmt der Gehalt an Amadori-Verbindungen bezogen auf die eingesetzte Malzmenge in der Regel etwas ab (Abbildung 65). Amadori-Verbindungen sind in wasserarmen Medien zwar relativ stabil, werden aber in wäßrigen Systemen in Abhängigkeit vom pH-Wert abgebaut. Dabei steigt mit zunehmendem pH-Wert auch die Abbaurate. In der Maische liegt ein pH-Wert von 5,8 vor, bei dem mit einem teilweisen Abbau der Amadori-Verbindungen zu rechnen ist. Lediglich der Gehalt an Fructose-Alanin und Fructose-Glycin steigt während des Maischprozesses an. Wie schon Wittmann [25] in Untersuchungen an Maischen und Würzen belegen konnte, sind Fructose-Alanin und Fructose-Glycin im Vergleich zu den anderen Amadori-Verbindungen erheblich stabiler, so daß im vorliegenden Fall die Neubildung während des Maischprozesses den Abbau überwiegt und daraus insgesamt ein Anstieg der Gehalte resultiert.

Auch während des Kochens der Würze sollte der Gehalt an Amadori-Verbindungen zurückgehen. Die höhere Temperatur begünstigt normalerweise den Abbau der Amadori-Verbindungen zusätzlich. Bei den eigenen Untersuchungen konnte jedoch ein Anstieg des Gesamtgehaltes an Amadori-Verbindungen auf 64 mg/100g Malz während des Kochprozesses nachgewiesen werden. Dies scheint in einem Widerspruch zu früheren Untersuchungen an realen Würzproben zu stehen, bei denen die erwartete Abnahme der Amadori-Verbindungen während dieser Phase festgestellt werden konnte [25]. Doch muß man sich

darüber im klaren sein, daß die Bildung und der Abbau von Amadori-Verbindungen bereits von kleinen Veränderungen der Reaktionsbedingungen abhängen können. So verdampfen während des Würzekochens im Labormaßstab zwangsläufig größere Mengen an Flüssigkeit als dies in den realen Würzpfannen der Fall ist. Die zwischenzeitliche Erhöhung des Extraktgehaltes könnte so die Bildung der Amadori-Verbindungen wieder begünstigen.



**Abbildung 65: Bildung und Abbau der Amadori-Verbindungen während des Brauprozesses**

Letztlich kommt es auch während des Würzekochens zum Abbau eines Anteils der Amadori-Verbindungen - was allein schon an der zunehmenden Bräunung der Würze zu erkennen ist. Doch stellt in dem vorliegenden Fall die gleichzeitige Neubildung von Amadori-Verbindungen in der Würze einen gegenläufigen Prozeß dar, der zu einem Anstieg des Gesamtgehaltes führt. Dabei hängt auch das Verhältnis von Abbau zu Neubildung maßgeblich von der beteiligten Aminosäure ab. So ist der Anstieg bei Fructose-Leucin, Fructose-Serin und Fructose-Prolin deutlich höher als bei Fructose-Valin oder Fructose-Isoleucin. Bei Fructose-Alanin überwiegen die Abbauprozesse sogar.

Abweichend von diesem Gesamtbild stellt sich lediglich der Gehalt an Fructose-Glutamin und Fructose-Glutaminsäure (werden als Summe bestimmt) dar. Der Gehalt sinkt hier bereits während des Maischprozesses von 6,0 mg/100g auf 1,1 mg/100g und fällt beim Würzekochen auf 0,4 mg/100g. Die Amadori-Verbindungen des Glutamins und der Glutaminsäure stellen genau wie die korrespondierenden Aminosäuren hitzelabile Verbindungen dar. Analog zu den freien Aminosäuren kommt es auch bei den korrespondierenden Amadori-Verbindungen über eine Lactambildung zur Pyrrolidoncarbonsäure (vergl. Abbildung 63).

Während der Würzebereitung bildet sich die Fructose-Pyrrolidoncarbonsäure, die jedoch im vorliegenden Fall nicht mitbestimmt werden kann, da sie während der Anreicherung nicht durch die Kationenaustauschersäule zurückgehalten wird (2.1.3).

## **5.2.4 Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen während des Brauprozesses**

Die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen während der Würzebereitung steht bei den eigenen Untersuchungen im Vordergrund. Zur Untersuchung der Bildungsraten wurden Maischen und Würzen angesetzt, die o-Phenylendiamin als Abfangreagenz enthielten (7.4). Die in Form ihrer Chinoxalinderivate abgefangenen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen wurden gemäß dem allgemeinen Aufarbeitungsschema durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Butanol von den anderen Inhaltsstoffen abgetrennt und angereichert (2.1.3).

Die Ergebnisse für die Bildungsraten der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in den wäßrigen Modellen zeigten bereits klare Abhängigkeiten von den Reaktionsbedingungen. An der Würzebereitung sollte nun gezeigt werden, inwieweit sich die in den Modellsystemen gefundenen Ergebnisse auf reale lebensmitteltechnologische Prozesse übertragen lassen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden in den nachfolgenden Unterkapiteln zur besseren Übersichtlichkeit bezogen auf die Abhängigkeiten von den Reaktionsbedingungen getrennt betrachtet.

### **5.2.4.1 Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bei der Würzebereitung in Abhängigkeit von der Temperaturführung**

Der Hauptunterschied zwischen dem Maischprozeß und dem Kochen der Würze liegt in der unterschiedlichen Temperaturführung. Die Temperaturen beim Maischen liegen deutlich niedriger als beim anschließenden Würzekochen. Während beim Maischprozeß die Temperatur langsam innerhalb von zwei Stunden auf die Abmaischtemperatur von 78 °C erhöht wird, bleibt die Temperatur beim Würzekochen über die gesamte Zeit konstant (ca. 100 °C). Aus diesem Grund sollten Reaktionen, die bei höheren Temperaturen bevorzugt ablaufen, beim Würzekochen in den Vordergrund treten.

Die Ergebnisse des Maischprozesses und des Würzekochens sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Konzentrationsangaben sind hier sowohl in mg je 100 ml Lösung als auch normiert in Bezug auf die verwendete Menge an Malz (mg/100g) angegeben. Anders als bei den vorangegangenen Kapiteln (5.2.1 - 5.2.3) stellen die Werte nach dem Würzekochen nur die während dieser Stufe gebildeten Mengen dar. Der Gehalt der insgesamt während der zwei Stufen der Würzebereitung gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen ergibt sich aus der Summe von Maischprozeß und Würzekochen (Tabelle 9, rechte Spalte).

Die Gehalte an den  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen im vorliegenden Malz wurden nicht bestimmt, da man davon ausgehen kann, daß diese kurzlebigen Verbindungen nach der Lagerung des Malzes bei der Brauerei nicht mehr nachgewiesen werden können.

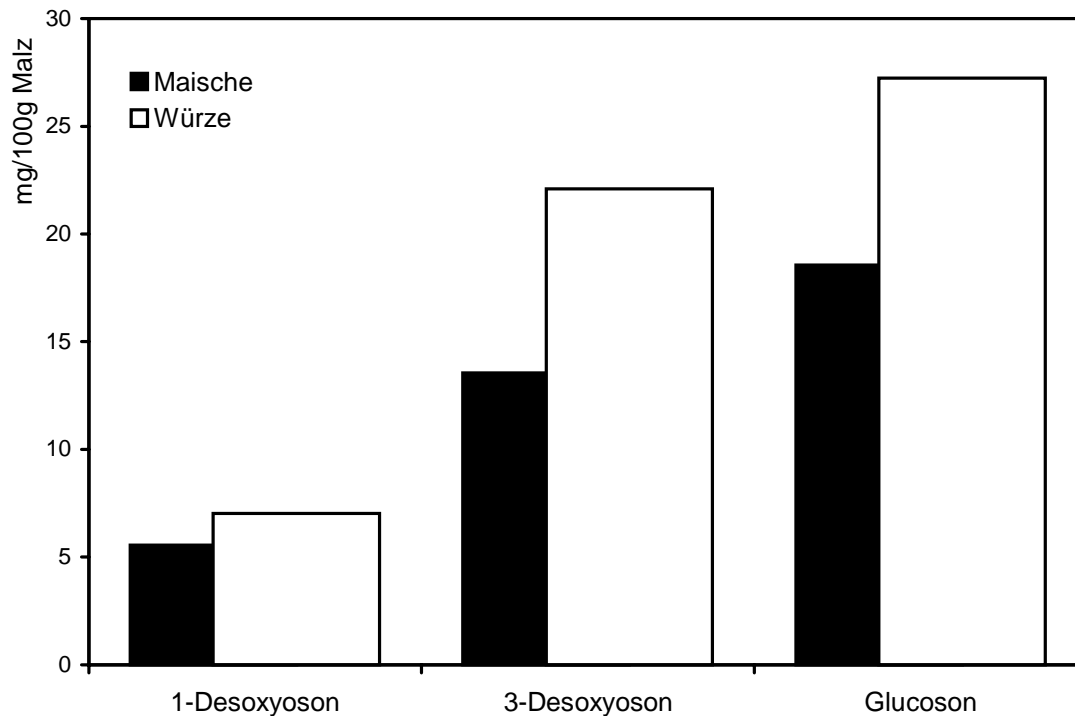
**Tabelle 9: Bildung der Dicarbonylverbindungen bei den einzelnen Stufen des Brauprozesses ohne Zusatz von Kupferionen**

|                     | <b>Malz</b> | <b>Maischprozeß</b> |          | <b>Würzekochen</b> |          | <b>Summe</b> |
|---------------------|-------------|---------------------|----------|--------------------|----------|--------------|
|                     | mg/100g     | mg/100g Malz        | mg/100ml | mg/100g Malz       | mg/100ml | mg/100g Malz |
| <b>1-Desoxyoson</b> | n. b.       | 5,6                 | 1,1      | 7,0                | 1,4      | 12,6         |
| <b>3-Desoxyoson</b> | n. b.       | 13,6                | 2,7      | 22,1               | 4,4      | 35,7         |
| <b>Glucoson</b>     | n. b.       | 18,6                | 3,7      | 27,2               | 5,4      | 45,8         |
| <b>Summe</b>        |             | 37,8                | 7,5      | 56,3               | 11,2     | 94,1         |

Während des zweistündigen Maischprozesses können insgesamt ca. 38 mg  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen je 100 g eingesetztes Malz nachgewiesen werden. Obwohl hier keine Zugabe von Kupferionen stattgefunden hat, stellt das Glucoson die Hauptkomponente unter den  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen dar. Nach dem Maischprozeß können ca. 19 mg/100g Malz nachgewiesen werden. Bei den Verbindungen, die über dem Weg der Enolisierungsreaktionen entstehen, überwiegt das 3-Desoxyoson mit 13,6 mg/100g Malz. Das 1-Desoxyoson bildet sich demgegenüber in untergeordnetem Maße; lediglich 5,6 mg/100g Malz können während des Maischprozesses abgefangen werden. Summiert man die Gehalte der Desoxyosone, die während des Maischens entstanden sind, so erhält man mit 19,2 mg/100g einen Gehalt, der in etwa der Bildung des Glucosons während dieser Stufe entspricht. Die autoxidative Bildung des Glucosons und die Bildung der Desoxyosone über die Enolisierungsreaktionen scheinen somit während des Maischprozesses relativ gleichberechtigt nebeneinander zu verlaufen - keiner der beiden Reaktionswege dominiert hier.

Während des Würzekochens bilden sich insgesamt höhere Mengen an  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen. Als Summe ergibt sich in der fertigen Würze eine Zunahme von 56,3 mg je 100 g Malz. Die Verhältnisse der Bildungsraten der einzelnen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zueinander verändern sich während des eineinhalbstündigen Kochvorgangs jedoch nur wenig. Während des Würzekochens werden 7,0 mg 1-Desoxyoson und 22,1 mg 3-Desoxyoson bezogen auf 100 g Malz gebildet, die Summe der Desoxyosone

beträgt damit 29,1 mg/100g Malz. Parallel bilden sich im selben Ansatz 27,2 mg Glucoson. Auch hier halten sich also die Enolisierungsreaktionen und der autoxidative Bildungsweg in etwa die Waage. Doch kann man zumindest eine leichte Verschiebung des Verhältnisses zu Gunsten der Enolisierungsreaktionen erkennen. Deutlicher wird dies, wenn man die während des Maischprozesses und während des Würzekochens gebildeten Gehalte an den einzelnen Dicarbonylverbindungen direkt nebeneinander stellt.



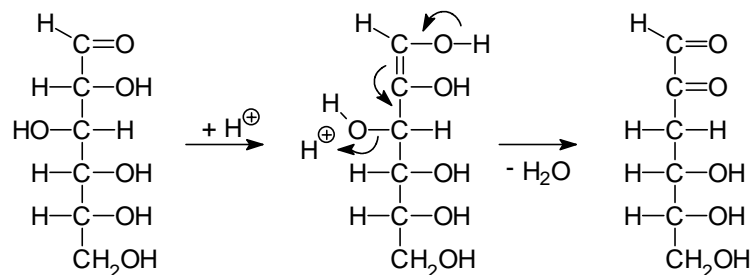
**Abbildung 66: Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Maischprozeß und beim Würzekochen**

In Abbildung 66 erkennt man, daß die Bildungsrate für alle drei Dicarbonylverbindungen bei dem Würzekochen größer sind als beim Maischprozeß. Die geringste Steigerung erfährt hierbei das 1-Desoxyoson, bei beiden Prozessen bildet es sich über die 2,3-Enolisierung in der gleichen Größenordnung. Beim Glucoson und beim 3-Desoxyoson sind die Unterschiede in den Bildungsrate schon deutlicher. Bei beiden liegt die während des Würzekochens gebildete Menge um das etwa eineinhalbfache über der Menge, die während des Maischens gebildet wurde.

Die Untersuchungen an den wäßrigen Modellen haben gezeigt, daß die Bildung des 1-Desoxyosons über die 2,3-Enolisierungsreaktion bei Temperaturen um die 100 °C ein Optimum besitzt. Die Bildung des 3-Desoxyosons läuft ebenfalls bei Temperaturen um und über dem Kochpunkt bevorzugt ab. Dementsprechend sollten beim Würzekochen die Enolisierungsreaktionen eine größere Rolle spielen als die autoxidativen Prozesse, die bei Kupferkatalyse bereits bei geringeren Temperaturen ablaufen können. Tatsächlich ergibt sich für die Bildung des 3-Desoxyosons die größte Steigerungsrate zwischen Maischprozeß und



Würzekochen (Faktor: 1,6). Aber auch die gesamte Bildungstendenz der einzelnen Dicarboxylverbindungen läßt sich von den wäßrigen Modellen auf die Vorgänge bei der Würzebereitung übertragen. Auch in den wäßrigen Modellen mit ähnlichem pH-Wert (5,0) ist die Summe der gebildeten Desoxyosone vergleichbar mit dem Gehalt des gebildeten Glucosons. Erst bei höheren Temperaturen bilden sich die Desoxyosone bevorzugt und stellen den Hauptweg beim Abbau der Amadori-Verbindungen dar. Folgerichtig verschiebt sich auch bei der Würzebereitung das Verhältnis der beiden Reaktionswege beim Würzekochen, das bei höheren Temperaturen abläuft, zu Gunsten der Enolisierungsreaktionen. Dabei liegt das bei der Würzebereitung vor allem an der vermehrten Bildung des 3-Desoxyosons. In den wäßrigen Modellen sind demgegenüber beide Enolisierungsreaktionen noch relativ gleichbedeutend. Diese Zunahme der Bedeutung des 3-Desoxyosons liegt in erster Linie an den vorliegenden Ausgangsverbindungen. Bei den wäßrigen Modellen wurde der Abbau einer einzelnen Amadori-Verbindung betrachtet, während bei der Würzebereitung neben den verschiedenen Amadori-Verbindungen vor allem größere Überschüsse an reduzierenden Zuckern für die unterschiedlichen Reaktionswege der nicht-enzymatischen Bräunung zur Verfügung stehen. Das 1-Desoxyoson gilt allgemein als eine Indikatorverbindung für die Maillard-Reaktion, die ausschließlich über den Abbau der Fructose-Aminosäuren entsteht [109]. Für das 3-Desoxyoson sind allerdings im schwach sauren pH-Bereich auch Bildungsmechanismen bekannt, die direkt von der Glucose aus auch in Abwesenheit von Aminokomponenten stattfinden und an der eigentlichen Maillard-Reaktion vorbeigehen (Abbildung 67)[13][96]. Da die freie Glucose in einem großen Überschuß vorliegt, sind solche parallelen Abbauewege um so wahrscheinlicher. Der Gehalt an 3-Desoxyoson in Maische und Würze ergibt sich somit wahrscheinlich aus der Summe des Anteils, der über die 1,2-Enolisierung der Amadori-Verbindung gebildet wird und des Anteils, der direkt aus der Glucose ohne Aminkatalyse stammt.



**Abbildung 67: Bildung des 3-Desoxyosons aus Glucose in Abwesenheit von Aminverbindungen.**

Die erhöhte Bildung an Glucoson beim Kochen der Würze gegenüber dem Maischprozeß scheint auf den ersten Blick einen Widerspruch zu den Gegebenheiten in den wäßrigen Modellen darzustellen, da die Autoxidation grundsätzlich bei niedrigeren Temperaturen bevorzugt abläuft. Bei den nur die Amadori-Verbindung enthaltenden wäßrigen Modellen steht

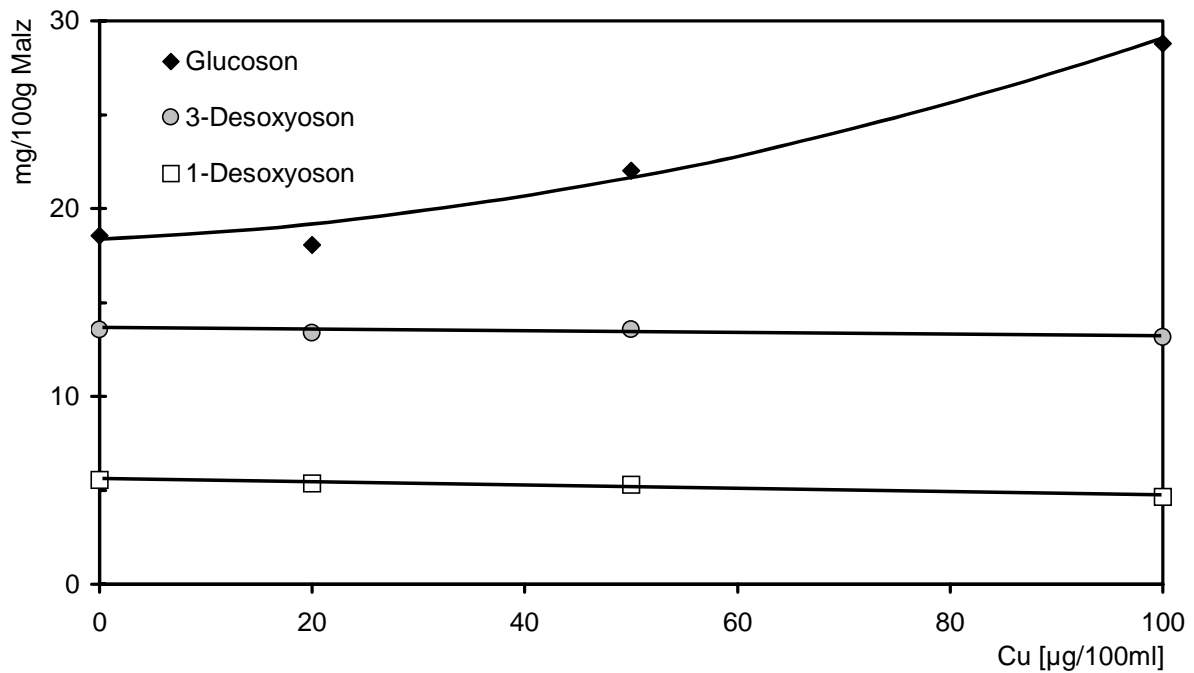
die Bildung des Glucosons jedoch in direkter Konkurrenz zu den Enolisierungsreaktionen, so daß sich kleine Veränderungen in den Reaktionsbedingungen weg vom Optimum bereits negativ auf die Bildungsrate auswirken. Bei der Würzebereitung können die verschiedenen Reaktionswege jedoch nebeneinander ablaufen, da genügend Ausgangsverbindungen zur Verfügung stehen. Vor allem über die Autoxidation der Glucose können, aufgrund des großen Angebotes in der Maische bzw. der Würze, größere Mengen an Glucoson gebildet werden. Überträgt man die Bildungsraten aus reinen Glucose/Alanin-Modellen - hier bildete sich das Glucoson aus der vorgelegten Glucose zu 2 mol% (80 °C, 6 h) - auf die Verhältnisse in der Maische und der Würze, so wäre es durchaus denkbar, daß sich allein aus den ca. 3 g/100g Glucose (bei einer Bildungsrate von 2 mol%) bis zu 40 mg Glucoson bilden könnten (vergl. 3.5.2). Unter Berücksichtigung der kürzeren Erhitzungszeiten bei den Stufen der Würzebereitung erscheinen die nachgewiesenen Gehalte an Glucoson in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an den wäßrigen Glucose/Alanin-Modellen durchaus plausibel.

#### **5.2.4.2 Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen während der Würzebereitung in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration**

Um den Einfluß der Kupferkatalyse auf die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen und insbesondere auf die radikalische Bildung des Glucosons zu untersuchen, wurden Maischen und Würzen mit unterschiedlichen Gehalten an Kupferionen angesetzt. Kupfer ist als Schwermetallspur in Bieren immer noch von gewisser Bedeutung. Früher war Kupfer aufgrund seiner guten Wärmeleitfähigkeit das Material, aus dem bevorzugt Maischebottich und Würzpfanne gefertigt wurden. Dadurch war in Bieren immer mit einem bestimmten Kupfergehalt zu rechnen. Für die Qualität des Bieres ist die Anwesenheit von Kupferionen allerdings problematisch, da es bereits durch Kupferspuren zu einer Beeinträchtigung der oxidationsempfindlichen Stoffe kommen kann.

Heutzutage hat Stahl das Kupfer als Material der Bottiche und Pfannen abgelöst. Trotzdem enthält ein durchschnittliches Vollbier (hell) einen Kupfergehalt von 40  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ; dabei schwanken die Werte im Mittel zwischen 20  $\mu\text{g}$  und 50  $\mu\text{g}/100\text{g}$  [110]. In Nährbieren liegen die Kupfergehalte mit 90  $\mu\text{g}/100\text{g}$  noch etwas höher. Bei den eigenen Maischen und Würzen wurden die Kupfergehalte in diesem Rahmen variiert. Dazu wurden Lösungen angesetzt, die 20, 50 und 100  $\mu\text{g}/100\text{ml}$  Kupfer(II)-Ionen enthielten. Diese Lösungen wurden dann als Haupt- und Nachguß anstelle des destillierten Wassers verwendet. Parallel dazu wurde ein Ansatz auch ohne die Zugabe von Kupferionen durchgeführt.

In Abbildung 68 ist die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bei dem Maischprozeß in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration in der Maische dargestellt.

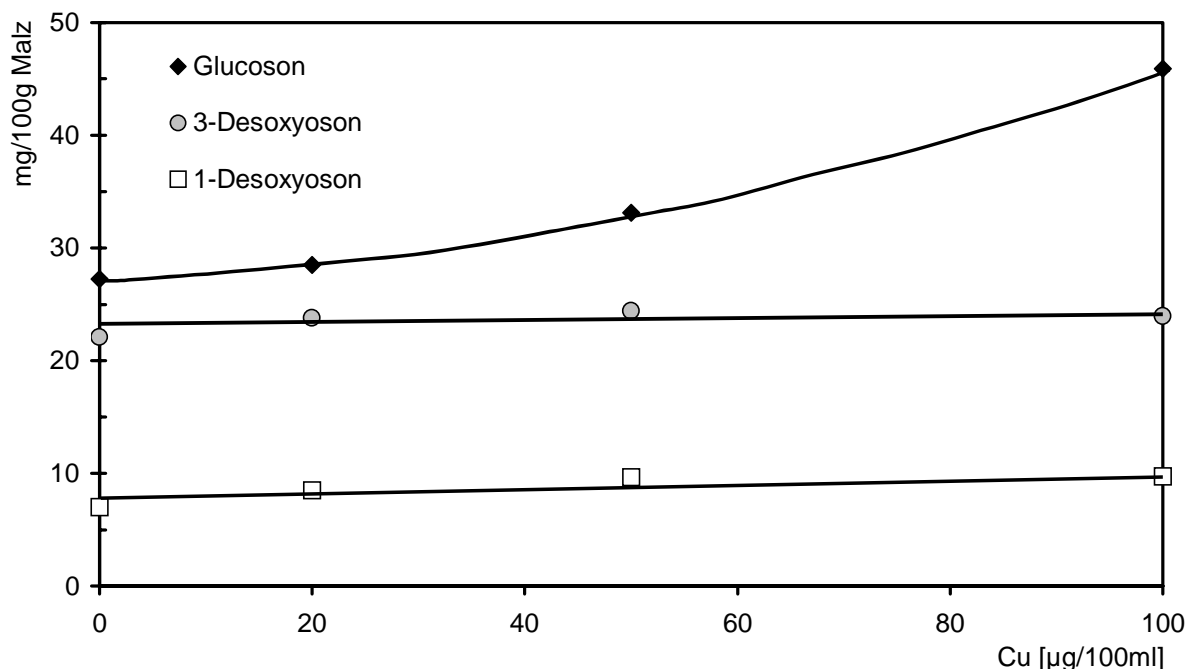


**Abbildung 68:** Bildung der Dicarbonylverbindungen während des Maischprozesses in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration

Man erkennt, daß die Bildung des Glucosons auch in der realen Lebensmittelmatrix mit zunehmendem Kupferionen-Gehalt an Bedeutung gewinnt. Interessant ist hierbei vor allem, daß genau wie bei den wäßrigen Modellen erst eine Schwellenkonzentration an Kupfer(II)-Ionen überschritten werden muß, ab der es über die Kupfer-Katalyse zu einer vermehrten Bildung des Glucosons kommt. Während bei einer Kupferkonzentration von 20 µg/100ml noch keine signifikante Steigerung der Bildungsrate gegenüber der Maische ohne Kupferzugabe zu erkennen ist, können bei einer Kupferkonzentration von 50 µg/100ml bereits 22 mg Glucoson je 100 g eingesetztes Malz nachgewiesen werden. Bei einer weiteren Erhöhung der Kupferkonzentration auf 100 µg/100ml steigt der Gehalt an Glucoson sogar auf 28 mg/100g. Der Schwellenwert für die Kupfer-Katalyse liegt beim Maischprozeß somit bei einer Kupferkonzentration von ca. 40 µg/100ml. Dieser Gehalt an Kupfer entspricht einer molaren Konzentration an Kupfer(II)-Ionen von ca. 6 µmol/l. In den wäßrigen Systemen lag die Schwellenkonzentration mit 5 µmol/l bei einem fast identischen Wert (3.4). Dieser Schwellenwert gilt also in den wäßrigen Systemen unabhängig von den verwendeten Puffersubstanzen (Citrat, Phosphat, ungepuffert). Auch in den Maischen und Würzen sind aufgrund der komplexen Matrix die unterschiedlichsten Puffersubstanzen zu erwarten; diese haben aber parallel zu den Gegebenheiten in den wäßrigen Modellen keinen negativen Einfluß auf die Kupfer-Katalyse.

Die Kupferkonzentration hat auf die Bildung der  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen, die über die beiden Enolisierungswege gebildet werden, keinen Einfluß. Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich verändern sich die Gehalte an 1-Desoxyoson und 3-Desoxyoson nicht signifikant. Denkbar wäre auch eine Verschiebung der Bildungsraten zu Ungunsten der Desoxyosone mit steigendem Kupfergehalt, wie dies in den wäßrigen Systemen der Fall war. Hier gilt wieder das bereits unter 5.2.4.1 Beschriebene. In den angesetzten Maischen und Würzen kommt es selbst bei Anwesenheit von Kupferionen zu keiner Konkurrenz zwischen der Autoxidation und den Enolisierungsreaktionen. Vielmehr wird aufgrund der erhöhten Kupfer-Katalyse lediglich die Glucosonbildung begünstigt. Für die Bildung der Desoxyosone bleiben genügend hohe Gehalte an Ausgangsverbindungen übrig.

Die Gegebenheiten bei der zweiten Stufe der Würzebereitung - dem Kochen der Würze - liegen ganz ähnlich (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Bildung der Dicarbonylverbindungen während des Würzekochens in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration**

Auch hier steigt die Bildungsrate des Glucosons mit zunehmendem Kupfergehalt an. Während der Gehalt in der fertigen Würze ohne Kupferzugabe noch bei 27,2 mg/100g Malz liegt, steigt er bereits bei einem Kupfergehalt von 20 µg/100ml geringfügig auf 28,5 mg/100g Malz an. Deutlicher ist der Anstieg der Bildungsrate dann bei den höheren Kupferkonzentrationen. Bei 50 µg Cu<sup>2+</sup>/100ml bilden sich 33 mg und bei 100 µg Cu<sup>2+</sup>/100ml sind es bereits 46 mg Glucoson pro 100 g eingesetztes Malz. Der Schwellenwert für die Kupfer-Katalyse liegt also beim Kochen der Würze ähnlich dem des Maischprozesses. Einen Anstieg der Bildung des

Glucosons durch die Kupfer-Katalyse kann man bei der Würze ebenfalls bei 40 µg/100 ml erkennen. Es kann also auch hier davon ausgegangen werden, daß für eine erkennbare Begünstigung der Glucosonbildung - wie in der Maische und den wäßrigen Systemen - eine Konzentration an Kupfer(II)-Ionen von ungefähr 5 µmol/l vorliegen muß.

## 6 Zusammenfassung

Die Maillard-Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminoverbindungen spielt bei vielen technologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Aber auch im menschlichen Organismus ist die Maillard-Reaktion bei Alterungsprozessen an körpereigenen Proteinen und bei Diabetes mellitus von großer Bedeutung. Hier sind es vor allem oxidative Prozesse, die im Verlauf der Maillard-Reaktion zu einer Schädigung von Gewebeproteinen führen können.

Die ersten analytisch faßbaren Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion sind die Fructose-Aminosäuren, die sogenannten Amadori-Verbindungen. Die Amadori-Verbindungen können zu den unterschiedlichsten Folgeprodukten weiterreagieren. Die wichtigsten Zwischenstufen stellen das 1-Desoxyoson und das 3-Desoxyoson dar, die sich aus den Amadori-Verbindungen über Enolisierungsreaktionen und anschließende  $\beta$ -Eliminierung bilden.

Die Autoxidation von Amadori-Verbindungen stellt einen alternativen Abbauweg zu den klassischen Enolisierungsreaktionen dar. Beachtung finden die oxidativen Reaktionsmechanismen vor allem in Bezug auf ihre Relevanz für physiologische Systeme. Bei der Autoxidation der Amadori-Verbindungen handelt es sich um eine Reaktion, die über einen radikalischen Reaktionsmechanismus unter Metall-Katalyse bevorzugt abläuft.

### ***Nachweis von Radikalen beim autoxidativen Abbau von Amadori-Verbindungen***

Der für die Bildung des Glucosons aus Amadori-Verbindungen formulierte Abbauweg verläuft über eine radikalische Zwischenstufe. In den eigenen Modellen sollte untersucht werden, ob sich beim Abbau von Amadori-Verbindungen mittels der Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie die Entstehung solcher Radikale nachweisen läßt.

Bei den Radikalen handelt es sich meist um sehr kurzlebige Strukturen, die häufig nur im Moment der Entstehung nachzuweisen sind. Die Lebensdauer verkürzt sich zusätzlich, wenn man Radikale - wie im vorliegenden Fall - in wäßrigen Systemen bestimmen will, da hier das ungepaarte Elektron Reaktionen mit gelöstem Sauerstoff oder anderen Verbindungen eingehen kann.

Für den Nachweis der kurzlebigen Radikale beim Abbau von Amadori-Verbindungen wurde das Spin Trapping mit 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) angewendet. Hierbei wird das ungepaarte Elektron auf das DMPO übertragen und es entsteht so ein Radikal mit erheblich längerer Lebensdauer.

Bereits kurze Zeit nach der Zugabe des DMPOs zu einem Modellsystem, das Fructose-Alanin und Kupferionen enthält, kann ein ESR-Signal aufgezeichnet werden, dessen Intensität im Verlauf der Reaktion zunimmt. Eine genauere Untersuchung der Hyperfeinstruktur des erhaltenen Spektrums gab Aufschluß über die Struktur der vorliegenden Radikale. Beim Abbau der Amadori-Verbindung ließen sich auf diese Weise Alkylradikale und Hydroxylradikale

in Form ihrer DMPO-Addukte nachweisen, die durch die Berechnung der Kopplungskonstanten charakterisiert wurden.

### ***Bildung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen***

Bei den beim Abbau von Amadori-Verbindungen gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen handelt es sich um sehr reaktive Verbindungen, deren Bildung nur schwer zu quantifizieren ist, da sie im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung schnell weiter reagieren.

Eine geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung dieser  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen stellt die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (oPhD) dar. In der Abfangreaktion mit oPhD können grundsätzlich sämtliche Verbindungen mit einer  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur zu den entsprechenden Chinoxalinderivaten umgesetzt werden. Die Chinoxalinderivate der hier interessierenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen wurden präparativ dargestellt, mittels GC/MS-Kopplung charakterisiert und auf ihre Eignung als Substanzen für die Kalibration überprüft. In unterschiedlichen Modellsystemen wurden die gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit oPhD abgefangen und ihre Bildungsraten in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen bestimmt. Der analytische Nachweis der Chinoxaline erfolgte hierbei gaschromatographisch neben den Fructose-Aminosäuren und den korrespondierenden Zuckern (nach Oximierung und Silylierung).

#### ***- in wässrigen Modellsystemen***

Die Bildungswege, die zu den einzelnen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau der Amadori-Verbindung führen, zeigen eine klare Abhängigkeit vom pH-Wert des untersuchten Modellsystems. Die Bildung des 3-Desoxyosons über den Weg der 1,2-Enolisierung stellt bei pH 3,0 den Hauptabbauweg der Amadori-Verbindung dar. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die Bedeutung dieser Reaktion mehr und mehr ab. Die 2,3-Enolisierung, die zum 1-Desoxyoson führt, gewinnt demgegenüber mit zunehmendem pH-Wert an Bedeutung. Bei pH 7,0 bildet sich das 1-Desoxyoson im größten Maße. Bei den höheren pH-Werten tritt auch die Bildung des Glucosons über die Autoxidation vermehrt in Erscheinung. Hier kommt es in Abhängigkeit von den übrigen Reaktionsbedingungen zu einer klaren Konkurrenz zwischen der 2,3-Enolisierung und der Autoxidation. Während bei Abwesenheit von Schwermetallspuren die 2,3-Enolisierung und die Autoxidation bei einem pH-Wert von 7,0 im gleichen Maße ablaufen, stellt das Glucoson bei Anwesenheit von Kupferionen das Hauptabbauprodukt der Amadori-Verbindung dar. Insgesamt erhöht sich die Bildungsrate des Glucosons bei Anwesenheit von Kupferionen und es bilden sich bereits bei relativ niedrigen Temperaturen (40 - 60 °C) große Mengen Glucoson. Bei der Kupferkatalyse scheint es einen Schwellenwert für die Konzentration zu geben, ab der sich die Anwesenheit von Kupferionen

positiv auf die Bildungsrate des Glucosons auswirkt. Erst ab einer Kupferkonzentration von ca. 5  $\mu\text{mol/l}$  konnte in den Modellen ein Anstieg der Glucosonbildung nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von EDTA als Komplexbildner konnte die Bildung des Glucosons im Gegenzug gehemmt, nicht jedoch gänzlich unterbunden werden. Die Anwesenheit von Citrat als Puffersubstanz hemmt die Autoxidation nicht, vielmehr wird die Wirkung der Kupferionen durch die stabilisierende Wirkung des Citrats bei höheren pH-Werten eher noch verstärkt.

Bei der Abhängigkeit der Reaktionswege von der Temperatur lassen sich grundsätzliche Unterschiede zwischen den Enolisierungsreaktionen und der Autoxidation aufzeigen. Die Enolisierungsreaktionen laufen demnach bevorzugt bei höheren Temperaturen ab. So zeigt die Bildung des 1-Desoxyosons bei 100 °C ein Optimum; die Bildungsgeschwindigkeit des 3-Desoxyosons erreicht über den untersuchten Temperaturbereich einen Maximalwert bei 120 °C. Demgegenüber zeigt die Bildung des Glucosons schon bei 80 °C ein Temperaturoptimum. Die Autoxidation läuft bei Anwesenheit von Kupferionen auch noch bei niedrigeren Temperaturen in großem Maße ab.

Reduzierende Zucker können unter prooxidativen Bedingungen ebenfalls eine Autoxidation durchlaufen, bei der analog zu den Gegebenheiten bei den Amadori-Verbindungen reaktive  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen entstehen. In Modellsystemen, die nur Glucose als Ausgangsverbindung enthielten, konnte folgerichtig ebenfalls das Glucoson nachgewiesen werden. Die Bildungsrate des Glucosons aus Glucose erhöht sich bei Zugabe von Aminosäuren geringfügig. Die Autoxidation der Glucose führt zwar zum Glucoson, die Bildungsrate bleibt aber deutlich unter den Gehalten, die in den Modellen mit der Amadori-Verbindung erreicht werden. Man kann davon ausgehen, daß die Autoxidation der Zucker durch den Zwischenschritt über die Amadori-Verbindung im Verlauf der nicht-enzymatischen Bräunung beschleunigt wird.

Parallel dazu wurde auch der Einfluß unterschiedlicher Zuckerarten auf die Glucosonbildung untersucht. Demnach ist die Fructose anfälliger für den oxidativen Abbau als die Glucose.

#### **- in wasserarmen Modellsystemen**

In den wasserarmen Modellen steigt die Abbaurate der Amadori-Verbindung mit zunehmendem pH-Wert an. Bei allen untersuchten pH-Werten durchläuft der Abbau bei einer Wasseraktivität von 0,3 - 0,4 ein Maximum und fällt mit zunehmender Wasseraktivität ab, da hier das freie Wasser die Reaktionsgeschwindigkeit durch den auftretenden Verdünnungseffekt erniedrigt. Bei Anwesenheit von Kupferionen steigt der Abbau - anders als in den wäßrigen Systemen - nicht an. Es kommt lediglich bei den Modellen, in denen das Kupfer überhaupt katalytisch wirksam ist, zu einer Verschiebung der Abbauewege hin zum Glucoson. Insgesamt fällt auf, daß die katalytische Wirksamkeit der eingesetzten Mengen an Kupferspuren stark von den jeweiligen Reaktionsbedingungen in den Modellen abhängig ist. So spielt die Kupfer-Katalyse bei einem pH-Wert von 3,0 gar keine Rolle, während bei pH 7,0



die größte Wirksamkeit bezogen auf die gebildete Menge an Glucoson nachgewiesen werden kann. Wichtig für die Wirksamkeit der Kupferionen ist ganz offensichtlich die Form, in der sie bei den unterschiedlichen pH-Werten in den Modellen vorliegen. So hat die als Puffersubstanz zugesetzte Citronensäure nur bei einem pH-Wert von 7,0 durch die Ausbildung eines Komplexes eine stabilisierende Wirkung, die die Kupfer-Katalyse positiv beeinflusst. Bei niedrigeren pH-Werten bildet sich ein entsprechender Kupfer-Citratkomplex nicht aus, so daß die Kupferionen bei zunehmender Hydratisierung in ihrer katalytischen Wirkung gehemmt werden. Dem entsprechend hängt die Glucoson-Bildung in den wasserarmen Modellen stark vom pH-Wert des jeweiligen Systems ab. Die Kupfer-Katalyse hat in den Modellen mit einem pH-Wert kleiner als 5,0 nur einen geringen Einfluß auf die Bildung des Glucosons. Trotzdem stellt das Glucoson bei diesen pH-Werten in Gegenwart von Kupferionen das Hauptprodukt des Abbaus der Amadori-Verbindung dar. Bei einem pH-Wert von 7,0 kommt es zu einer ausgeprägten Konkurrenz zwischen der Bildung des Glucosons und der 2,3-Enolisierungsreaktion, die zum 1-Desoxyoson führt. Während bei  $a_w$ -Werten oberhalb von 0,5 das Glucoson in den Modellen mit Kupferionen das Hauptabbauprodukt der Amadori-Verbindung darstellt, ist bei den kleineren  $a_w$ -Werten der Abbauweg zum 1-Desoxyoson favorisiert.

Die Bildung des 1-Desoxyosons zeigt bei der Abhängigkeit von der Wasseraktivität mit der Ausbildung eines Maximums im Bereich von 0,3 - 0,4 die gleiche Charakteristik wie der Abbau der Amadori-Verbindung. Bei pH-Werten unter 5,0 spielt die 2,3-Enolisierung nur noch eine untergeordnete Rolle.

Die Bildung des 3-Desoxyosons läuft über dem gesamten pH-Bereich in der gleichen Größenordnung ab. Ein Bildungsmaximum läßt sich bei pH 5,0 erkennen. Auffällig ist, daß die Bildung des 3-Desoxyosons im Gegensatz zur Bildung des 1-Desoxyosons im Bereich der untersuchten Wasseraktivitäten kein Maximum durchläuft. Vielmehr bildet sich das 3-Desoxyoson in den Modellen mit dem geringsten Wassergehalt im größten Maße und nimmt dann mit zunehmender Wasseraktivität mehr und mehr ab.

### ***Untersuchungen zum Prozeß des Bierbrauens***

Mit einem hellem Darrmalz als Ausgangsprodukt wurde der Prozeß der Würzebereitung im Labormaßstab nachvollzogen. Die Würzebereitung gliedert sich hierbei in die zwei Hauptstufen: Maischprozeß und Würzekochen. Bei beiden Prozessen spielt die nicht-enzymatische Bräunung eine große Rolle. Durch den Zusatz von oPhD wurden die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in der Maische bzw. Würze abgefangen. Parallel dazu wurde der Gehalt an Zuckern, Amadori-Verbindungen und Aminosäuren als potentielle Ausgangsverbindungen für die Bildung der Dicarbonyle bei den einzelnen Stufen der Würzebereitung bestimmt.

Während des zweistündigen Maischprozesses können insgesamt ca. 38 mg  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen je 100 g eingesetztes Malz nachgewiesen werden. Obwohl hier

keine Kupferionen zugegeben wurden, stellt das Glucoson die Hauptkomponente unter den  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen dar. Bei den Verbindungen, die über den Weg der Enolisierungsreaktionen entstehen, überwiegt das 3-Desoxyoson; das 1-Desoxyoson bildet sich demgegenüber im untergeordneten Maße. Summiert man die Gehalte der Desoxyosone, die während des Maischens entstanden sind, so erhält man einen Gesamtgehalt, der in etwa der Menge des während dieser Stufe gebildeten Glucosons entspricht. Die autoxidative Bildung des Glucosons und die Bildung der Desoxyosone über die Enolisierungsreaktionen scheinen somit während des Maischprozesses relativ gleichberechtigt nebeneinander zu verlaufen - keiner der beiden Reaktionswege dominiert hier.

Während des Würzekochens bilden sich insgesamt höhere Gehalte an  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen. Als Summe ergibt sich in der fertigen Würze ein Gehalt von 56,3 mg je 100 g Malz. Die Verhältnisse der Bildungsraten der einzelnen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zueinander verändern sich während des Kochvorgangs jedoch nur wenig. Die Bildung des 3-Desoxyosons scheint während der Würzebereitung von größerer Bedeutung zu sein, als dies in den wäßrigen Modellsystemen - die die Amadori-Verbindung als einzige Ausgangsverbindung enthielten - der Fall war. Für das 3-Desoxyoson sind allerdings im schwach sauren pH-Bereich (hier ca. 5,8) auch Bildungsmechanismen bekannt, die direkt von der Glucose aus auch in Abwesenheit von Aminokomponenten stattfinden und an der eigentlichen Maillard-Reaktion vorbeigehen. Da die freie Glucose in einem großen Überschuss vorliegt, sind solche parallelen Abbauege um so wahrscheinlicher.

Auch in der realen Lebensmittelmatrix gewinnt die Bildung des Glucosons bei Zugabe von Kupferionen an Bedeutung. An Maischen und Würzen, die unterschiedliche Gehalte an Kupferionen enthalten, läßt sich nachweisen, daß genau wie bei den wäßrigen Modellen erst eine Schwellenkonzentration an Kupferionen überschritten werden muß, ab der es über die Kupferkatalyse zu einer vermehrten Bildung des Glucosons kommt. Dieser Schwellenwert liegt in den untersuchten Maischen und Würzen bei einer Kupferionenkonzentration von ca. 6  $\mu\text{mol/l}$  und entspricht damit dem Wert in den wäßrigen Systemen.

Die Kupferkonzentration hat auf die Bildung der Desoxyosone, die über die beiden Enolisierungswege gebildet werden keinen Einfluß. Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich verändern sich die Gehalte an 1-Desoxyoson und 3-Desoxyoson nicht signifikant. In den angesetzten Maischen und Würzen kommt es selbst bei Anwesenheit von Kupferionen zu keiner direkten Konkurrenz zwischen der Autoxidation und den Enolisierungsreaktionen. Vielmehr wird aufgrund der erhöhten Kupferkatalyse lediglich die Glucosonbildung zusätzlich begünstigt.

## 7 Arbeitsvorschriften

### Allgemein verwendete Geräte

- Analysenwaage 770 (Kern, Albstadt)
- Gefriertrocknungsapparatur Lyovac GT 2 (AMSCO Finn-Asco, Hürth)
- Magnetrührer, heizbar IKA-Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
- „Glycerinbad“, Kristallisierschale (Ø 120 mm) gefüllt mit Glycerin
- pH-Meter mit Einstabmeßkette 766 (Knick, Berlin)
- Reagenzgläser mit Gewinde Schraubkappe mit PTFE-Dichtung, 10 ml „Sovirelgläser“ (Sovirel, Levallois-Perret F)
- Reagenzglasschüttler, Vibrofix VF 2 (Janke & Kunkel, Staufen)
- Rotationsverdampfer R-114 mit Wasserbad B-480 (Büchi, Buchs CH)
- Transferpette, 10 µl - 100 µl, 25 µl - 250 µl, 100 µl - 1000 µl (Brand, Wertheim)
- Trockenschrank (Heraeus, Hanau)
- Ultraschallbad, Sonorex TK 52 (Bandelin, Berlin)
- Vakuumpumpe MZ 2C mit Ausbausatz AK/EK und Vakuumcontroller CVC 2 (Vaccubrand, Wertheim)
- Zentrifuge, Biofuge *primo* (Heraeus, Hanau)
- Kühlschrank, + 4 °C (Liebherr, Ochsenhausen)
- Tiefkühlschrank, - 18 °C (AEG Hausgeräte AG, Nürnberg)
- übliche Labor-Glasgeräte

### Allgemein verwendete Chemikalien

- Stickstoff (Westfalengas, Münster)
- Wasserstoff (Westfalengas, Münster)
- Helium (Westfalengas, Münster)
- Faltenfilter und Rundfilter, diverse Größen (Schleicher und Schüll, Dassel)
- Wasser, entionisiert
- Salzsäure, min. 37% (Riedel-De Haën, Seelze)
- Essigsäure, 100% „Eisessig“ (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, 96% (Krist, Enningerloh)
- verdünnte Lösungen und Säuren wurden, sofern es sich nicht um Maßlösungen handelt selbst hergestellt.

## 7.1 Präparative Arbeiten

### 7.1.1 Darstellung von Amadori-Verbindungen

#### Chemikalien

- D(+)-Glucose, wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- L-Alanin (Fluka, Buchs CH)
- L-Glutaminsäure (Merck, Darmstadt)
- Glycin (Merck, Darmstadt)
- L-Isoleucin (Fluka, Buchs CH)
- L-Leucin (Merck, Darmstadt)
- L-Serin (Merck, Darmstadt)
- L-Threonin (Fluka, Buchs CH)
- L-Valin (Fluka, Buchs CH)
- Natriumdisulfit (Merck, Darmstadt)
- Methanol, reinst (Merck, Darmstadt)
- Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)
- 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Fluka, Buchs CH)
- Ninhydrin (Merck, Darmstadt)
- n-Butanol (Riedel-De Haën, Seelze)
- Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)
- Kationenaustauscherharz Lewatit S 1080 (Merck, Darmstadt)
- Diethylether (Merck, Darmstadt)

#### Geräte

- Chromatographiesäule mit Lösungsmittelreservoir,  $\varnothing$  12 mm
- Scheidetrichter, 500 ml
- Tüpfelplatte, Porzellan

#### Kationenaustauschersäule

Die Chromatographiesäule wird kurz über dem Hahn mit einem kleinen Wattepfropf versehen. Das in Wasser gequollene Lewatit-Harz (S 1080) wird bis zu einer Höhe von 150 mm in die Chromatographiesäule geschwemmt. Nach dem Absetzen des Harzes wird es durch einen abschließenden Wattepfropf gegen Aufwirbelungen geschützt. Das Harz wird mit 50 ml Salzsäure (3 mol/l) regeneriert. Man wäscht mit Wasser bis die ablaufende Waschflüssigkeit pH-neutral ist. Die Säule kann nun zur Anreicherung der Amadori-Verbindungen eingesetzt werden.

## Chemikalien für die Tüpfelreaktionen

Reagenz I: 0,2 g Ninhydrin in 95 ml n-Butanol und 5 ml Essigsäure (10 %)

Reagenz II: 0,5 g 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in 100 ml Natronlauge (0,5 mol/l)

### Durchführung

13 mmol Glucose (2,5 g), 6,5 mmol Aminosäure (z.B.: 0,6 g L-Alanin) und 0,5 g Natriumdisulfit werden in 50 ml Methanol unter Rückfluß zweieinhalb Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung filtriert man den ungelösten Rückstand durch einen Faltenfilter ab.

Die Lösung wird in einen Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bei maximal 35 °C Wasserbadtemperatur zu einem sirupösen Rückstand (3 ml) eingeeengt. Man versetzt mit 0,5 ml Eisessig und verdünnt mit 5 ml Wasser (vor der Zugabe der Essigsäure kann man die Lösung gut über Nacht stehenlassen).

Zur Isolierung der Amadori-Verbindung wird die Lösung auf die Kationenaustauschersäule gegeben. Zunächst wäscht man mit 200 ml Wasser zuckerfrei. Danach wird die Amadori-Verbindung mit 120 ml 0,20 molarer Trichloressigsäure eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen werden mit den beiden Tüpfelreaktionen auf das Vorhandensein von Amadori-Verbindungen getestet. Hierfür werden jeweils 20 µl der einzelnen Fraktionen auf zwei Tüpfelplatten mit 100 µl der jeweiligen Reagenzlösung vermischt.

Tüpfelreaktion I: Nach 5 min bei 105 °C ergeben Amadori-Verbindungen und Aminosäuren eine violette Färbung.

Tüpfelreaktion II: Nach 5 min im Dunkeln (Raumtemperatur) ergeben Amadori-Verbindungen lachsrote bis leuchtend rote Färbungen.

Die Fraktionen, die bei beiden Tüpfelreaktionen positiv reagieren, werden vereint und am Rotationsverdampfer (max. 35 °C) auf 20 - 30 ml eingeeengt. Zur Entfernung der Trichloressigsäure wird siebenmal mit 60 ml Diethylether ausgeschüttelt. Man engt die wäßrige Lösung am Rotationsverdampfer auf wenige Milliliter ein und gefriertrocknet die Lösung, wobei die Amadori-Verbindung als glasartiger Rückstand zurückbleibt, der gemörsert wird.

Die Ausbeute liegt je nach Amadori-Verbindung bei 200 - 600 mg.

## 7.1.2 Darstellung von 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin (1-Desoxyoson-chinoxalin)

### Geräte

- Dreihalskolben, 250 ml
- KPG-Rührer (Janke & Kunkel, Staufen)
- Liebigkühler

- Büchnertrichter,  $\varnothing$  60 mm
- Zentrifugenglas, 100 ml

### Chemikalien

- D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt)
- Piperidin (Merck, Darmstadt)
- o-Phenylendiamin (Fluka, Buchs CH)
- Triethanolamin (Merck, Darmstadt)
- Natronlauge, 1 mol/l (Merck, Darmstadt)
- Aceton (Merck, Darmstadt)
- Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
- Dichlormethan (Merck, Darmstadt)
- Methanol, reinst (Merck, Darmstadt)

#### 7.1.2.1 Darstellung von 1-Desoxy-1-piperidino-fructose

Zur Darstellung des 1-Desoxyoson-chinoxalins wird in einem ersten Schritt die 1-Desoxy-1-piperidino-fructose als Zwischenstufe synthetisiert [111].

Hierfür wird ein Gemisch aus 66 g (0,33 mol) D(+)-Glucose-Monohydrat und 50 ml Triethanolamin unter Rückfluß in einem Dreihalskolben (Thermometer, KPG-Rührer; Kühler) gerührt. Möglichst zügig werden 28,3 g (0,33 mol) Piperidin und 20 g (0,33 mol) Eisessig zugegeben, wodurch sich die sirupöse Mischung auf 50 °C erwärmt. In den nächsten zwanzig Minuten wird das Gemisch auf 70 °C erwärmt und für eine Stunde bei dieser Temperatur belassen.

Man läßt abkühlen und rührt noch weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur. Zur Kristallisation läßt man die Lösung über Nacht im Kühlschrank stehen.

Erfahrungsgemäß ergibt die Kristallisation eine dickflüssige, karamellfarbige Masse in tiefbrauner Lösung, die sich selbst unter Einsatz einer Membranpumpe nicht absaugen läßt. Deswegen wird die Masse in ein Zentrifugenglas gegeben und die Mutterlauge nach dem Zentrifugieren abdekantiert. Das so erhaltene Rohprodukt wird durch Aufschlemmen mit einem Aceton/Ethanol-Gemisch (1:1) und anschließendem Abzentrifugieren im Zentrifugenglas gereinigt. Dieser Reinigungsschritt wird wiederholt, bis die Waschlösung nicht mehr gefärbt ist und die 1-Desoxy-1-piperidino-fructose als rein weißes Produkt übrigbleibt.

Ausbeute: 13,7 g (17 %)

m.p.: 121-122 °C [111]

#### 7.1.2.2 Darstellung von 1-Desoxyoson-Chinoxalin

2,47 g (0,01 mol) 1-Desoxy-1-piperidino-fructose und 1,19 g (0,01 mol) o-Phenylendiamin werden in 50 ml Wasser, das mit Eisessig und Natriumacetat auf einen pH-Wert von 5,5 - 5,8

gebracht wurde, 7 ½ h unter Rückfluß erhitzt. Während des Erhitzens verändert sich der pH-Wert der Reaktionslösung nur wenig.

Nach dem Abkühlen neutralisiert man das Reaktionsgemisch mit Natronlauge (1 mol/l). Nebenprodukte wie das 1,4-Desoxy-1-piperidino-hexosulose-chinoxalin und weitere Verunreinigungen werden durch dreimaliges Ausschütteln mit 30 ml Dichlormethan entfernt

Die wäßrige Lösung wird am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von höchstens 40 °C bis zur Trockne eingeengt (schäumt stark!).

Der Rückstand wird in wenig heißem Methanol aufgenommen und der unlösliche Rückstand abfiltriert. Über Nacht im Kühlschrank kristallisiert das 2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin in weißen Nadeln aus. Das Rohprodukt wird über einen Büchnertrichter abfiltriert und noch einmal aus wenig Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 250 mg (10%)

m.p.: 169 - 170 °C [18]

### 7.1.3 Darstellung von 2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl)-chinoxalin (3-Desoxyoson-chinoxalin)

#### Geräte

- Rundkolben, 250 ml
- Büchnertrichter, Ø 30 cm
- Exsikkator
- Vakuumtrockenschrank VD 23 (WTC-Binder, Tuttlingen)

#### Chemikalien

- D(+)-Glucose, wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- n-Butylamin (Merck, Darmstadt)
- o-Phenylendiamin (Fluka, Buchs CH)
- Methanol, reinst (Merck, Darmstadt)
- Natronlauge, 1 mol/l (Merck, Darmstadt)
- Salzsäure, halbkonz.
- Aceton (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure-ethylester (Merck, Darmstadt)
- Acetonitril (Merck, Darmstadt)
- Dichlormethan (Merck, Darmstadt)
- Aktivkohle, z. A. (Fluka, Buchs CH)

### 7.1.3.1 Darstellung von 3-Desoxy-D-erythro-hexosulose (3-Desoxyoson)

Zur Darstellung des 3-Desoxyoson-chinoxalins muß in einem ersten Schritt das 3-Desoxyoson als Zwischenstufe synthetisiert werden [25].

#### Präparative Säulenchromatographie an Cellulose

- Cellulosepulver für die SC, MN 100 (Macherey Nagel, Düren)
- Chromatographiesäule mit Lösungsmittelreservoir,  $\varnothing$  20 mm
- Elutionsmittel: Essigsäure-ethylester / Ethanol / Wasser (6 / 3 / 1)

Zur Vorbereitung der Cellulose-Säule wird das Cellulosepulver zuerst gereinigt. Dazu werden 150 g Cellulosepulver in 1 l Natronlauge (1 mol/l) in einem großen Becherglas eine Stunde lang gerührt. Man neutralisiert mit Salzsäure (halbkonz.), saugt über einen Büchnertrichter ab und wäscht mit Wasser nach. Danach wird die Cellulose mit 1 l Wasser für eine halbe Stunde gerührt und erneut abgesaugt. Man wäscht mit Wasser und saugt den Rückstand möglichst trocken. Die Cellulose wird noch im Büchnertrichter mit Ethanol aufgeschlemmt und erneut trocken gesaugt. Man läßt das so gereinigte Cellulosepulver an der Luft vortrocknen und trocknet es schließlich im Vakuumtrockenschrank. Das Cellulosepulver wird bis auf eine Höhe von 20 cm in die Chromatographiesäule gefüllt, dabei ist auf eine möglichst kompakte Packung zu achten.

#### Kationenaustauschersäule

Die Kationenaustauschersäule zur Abtrennung der Aminokomponente entspricht der bei der präparativen Darstellung der Amadori-Verbindungen eingesetzten Säule (7.1.1).

#### Durchführung

15 g Glucose und 6 g n-Butylamin werden in 10 ml Methanol im Rundkolben im Glycerinbad unter Rückfluß auf 65 °C erhitzt (innerhalb ½ h). Man läßt Abkühlen und gibt 5 ml Eisessig hinzu. Anschließend erhitzt man erneut für 2 h auf 55 °C im Glycerinbad. Man verdünnt die tiefbraune Reaktionsmischung mit Wasser auf ca. 100 ml und gibt zur Entfärbung 10 g Aktivkohle hinzu. Man rührt über Nacht und saugt die Aktivkohle über einen Büchnertrichter ab. Die nur noch schwach gefärbte Lösung wird zur Abtrennung des n-Butylamins auf die Kationenaustauschersäule gegeben, wobei das Eluat in einem Rundkolben aufgefangen wird. Man spült noch zusätzlich mit 30 ml Wasser nach und engt das gesammelte Eluat am Rotationsverdampfer zum Sirup ein.

Der Sirup wird in 20 ml Ethanol (96 %) gelöst und mit 5 g Cellulosepulver vermischt. Man dampft das Lösungsmittel im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur ab und gibt das Cellulosepulver, auf dem nun das Reaktionsgemisch aufgebracht ist, auf die Cellulose-Säule. Man eluiert mit insgesamt 500 ml Elutionsmittel (s.o.) und fängt Fraktionen zu 20 ml auf. Die einzelnen Fraktionen werden gaschromatographisch auf das 3-Desoxyoson unter-



sucht, die genügend reinen Fraktionen vereint und nach dem Abrotieren des Lösungsmittels gefriergetrocknet.

Ausbeute an 3-Desoxyoson: 200 mg

### 7.1.3.2 Darstellung von 3-Desoxyoson-chinoxalin

#### Präparative Schichtchromatographie

- PSC-Fertigplatten für die präparative Schichtchromatographie (Merck, Darmstadt)
- Chromatographiekammer
- Fließmittel: Acetonitril / Wasser (19 + 1)

#### Durchführung [53]

140 mg (0,86 mmol) 3-Desoxy-D-*erythro*-hexosulose und 115 mg (1,06 mmol) o-Phenylendiamin werden in 3 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der Reaktionsansatz wird bei Raumtemperatur für 24 h unter Stickstoff gerührt. Zur Abtrennung des Chinoxalinderivates wird die Reaktionslösung dreimal mit 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt.

Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer eingengt und der sirupöse Rückstand mittels der präparativer Schichtchromatographie aufgereinigt. Die Kieselgeschicht mit einem  $R_f$ -Wert zwischen 0,16 und 0,32 wird abgekratzt und das 3-Desoxyoson-chinoxalin mit Methanol extrahiert.

Ausbeute: 20 mg

m.p.: 120 °C [53]

### 7.1.4 Darstellung von D-*arabino*-Hexos-2-ulose-chinoxalin (D-Glucoson-chinoxalin)

#### Geräte

- Rundkolben, 250 ml
- Liebigkühler
- Büchnertrichter,  $\varnothing$  80 mm

#### Chemikalien

- D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt)
- o-Phenylendiamin (Fluka, Buchs CH)
- p-Toluidin (Merck, Darmstadt)
- Diethylether (Merck, Darmstadt)
- Methanol, reinst (Merck, Darmstadt)

## Durchführung [78]

3,96 g (0,02 mol) D(+)-Glucose-Monohydrat und 2,14 g (0,02 mol) p-Toluidin werden in 90 ml Ethanol (96 %) gelöst. Die Reaktionslösung wird mit 5 ml Eisessig versetzt und anschließend für eine halbe Stunde unter Rückfluß erhitzt.

Man gibt 2,46 g (0,02 mol) o-Phenylendiamin zu und erhitzt weiter für 7 ½ h unter Rückfluß. Nachdem die Mischung über Nacht im Kühlschrank stand, wird der ausgefallene Rückstand über einen Büchnertrichter abfiltriert und mehrmals gewaschen; zuerst dreimal mit 20 ml Methanol, dann dreimal mit 20 ml Diethylether und schließlich noch dreimal mit 20 ml Methanol - die Waschlösungen werden jeweils verworfen. Man erhält das D-Glucoson-chinoxalin als Rohprodukt, das aus wenig Ethanol (96 %, weniger als 50 ml) umkristallisiert wird.

Ausbeute: 300 mg (6 %)

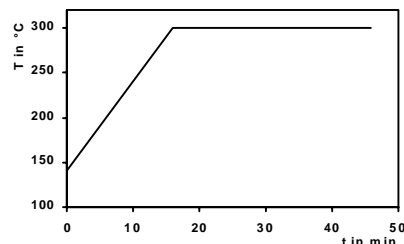
### 7.1.5 Charakterisierung der Präparate mittels GC/MS

#### Gerätebedingungen

|                    |  |               |        |
|--------------------|--|---------------|--------|
| GC:                | HP 6890 (Hewlett-Packard, Waldbronn)                           |               |        |
| Säule:             | HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Hewlett-Packard, Waldbronn) |               |        |
| Carrier:           | Helium 1,1 ml/min  |               |        |
| Injektor:          | Split 1:50   | Temperatur:   | 250 °C |
| Injektionsvolumen: | 1,0 µl   |               |        |
| Solvent Delay:     | 3 min  |               |        |
| Detektor:          | MSD 5973   | Transferline: | 300 °C |
|                    | Ionisierungsenergie: 70 eV                                     | MS Source:    | 230 °C |
| Scan (silyliert):  | low mass: 70   |               |        |
|                    | high mass: 650   |               |        |
| Scan (acetyliert): | low mass: 40   |               |        |
|                    | high mass: 420   |               |        |
| Auswertesoftware:  | HP Chemstation <i>Enhanced</i> (Hewlett-Packard, Waldbronn)    |               |        |

#### Temperatur-Programm

|                |                         |
|----------------|-------------------------|
| Initial Value: | 140 °C                  |
| Program Rate:  | 10 °C/min               |
| Final Value:   | 300 °C, hold for 30 min |



### 7.1.5.1 Charakterisierung der Präparate nach Oximierung und Silylierung

#### Chemikalien

- Präparate aus 7.1.2, 7.1.3 und 7.1.4
- Xylit (Merck, Darmstadt)
- Trehalose-Dihydrat (Fluka, Buchs CH)
- Hydroxylammoniumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Pyridin, zur Analyse (Merck, Darmstadt)
- N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (Fluka, Buchs CH)
- 1,1,2-Trichlortrifluorethan (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Trimethylchlorsilan (Fluka, Buchs CH)

#### Oximierungsreagenz

50,0 mg Xylit, 50,0 mg Trehalose als interne Standards und 2,50 g Hydroxylammoniumchlorid werden mit Pyridin auf 100 ml aufgefüllt.

#### Silylierungsreagenz

2,5 ml BSA und 0,8 ml TMCS werden kurz vor der Silylierung gemischt. Da das Silylierungsreagenz sehr anfällig gegen Wasser und selbst Luftfeuchtigkeit ist, sollte immer nur die für die anstehende Serie benötigte Menge angesetzt werden.

#### Durchführung

1 mg des zu untersuchenden Präparates werden in 0,5 ml Oximierungsreagenz im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wird zur Oximierung für eine halbe Stunde auf 70 °C im Trockenschrank erhitzt.

Für die Silylierung gibt man anschließend zu der abgekühlte Lösung 0,33 ml Silylierungsreagenz (entspricht: 0,25 ml BSA + 0,08 ml TMCS) und erwärmt wieder für eine halbe Stunde im Trockenschrank auf 70 °C.

Nach dem erneuten Abkühlen gibt man noch 0,25 ml TCTFE hinzu. Die erhaltene Lösung kann direkt für die Gaschromatographie eingesetzt werden.

### 7.1.5.2 Charakterisierung der Präparate nach Acetylierung

#### Chemikalien

- Präparate aus 7.1.2, 7.1.3 und 7.1.4
- Acetanhydrid (Merck, Darmstadt)
- Pyridin, zur Analyse (Merck, Darmstadt)

## Durchführung

1 mg des zu untersuchenden Präparates wird in 0,5 ml Pyridin gelöst. Man gibt 0,5 ml Acetanhydrid zu und läßt bei Raumtemperatur über Nacht im dicht verschlossenen Sovirelglas stehen. Die so acetylierte Lösung kann direkt zur Gaschromatographie eingesetzt werden.

### 7.1.6 Charakterisierung der Präparate mittels FT-IR

#### Gerätebedingungen

FT-IR Spektrometer Spectrum 1000 (Perkin Elmer, Überlingen)

Scan-Bereich: 4000  $\text{cm}^{-1}$  - 600  $\text{cm}^{-1}$

Auflösung: 2  $\text{cm}^{-1}$

Auswertesoftware: Spectrum for Windows 1.5 (Perkin Elmer, Überlingen)

#### Geräte

- Preßwerkzeug für KBr-Preßlinge (Perkin Elmer, Überlingen)
- Achatmörser

#### Chemikalien

- Präparate aus 7.1.2 und 7.1.4
- Kaliumbromid, Uvasol (Merck, Darmstadt)  
getrocknet bei 105 °C

#### Durchführung

Eine kleine Probe des zu untersuchenden Präparates (1 - 2 mg) werden mit ca. 200 mg Kaliumbromid vermischt. Die Mischung wird im Achatmörser sehr innig miteinander verrieben, so daß die Korngröße der einzelnen Partikel möglichst gering ist. Eine Spatelspitze der Verreibung wird mit dem Preßwerkzeug bei einem Anpreßdruck von 10 t innerhalb von zehn Minuten zu einer Tablette gepreßt.

Die Tablette wird mit dem FT-IR Spektrometer vermessen; dabei werden vier Scans aufgenommen, die vom Gerät rechnerisch gemittelt werden, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren. Da es sich bei dem Gerät um ein Einstrahl-Meßgerät handelt, wird vor der eigentlichen Messung der Probe ein Hintergrundspektrum aufgenommen, welches direkt von dem Probenspektrum abgezogen wird, um so die Banden der Umgebungsluft zu eliminieren.

## 7.2 Ansatz der wäßrigen Modellsysteme

### Chemikalien

- Fructose-Alanin (nach 7.1.1)
- D(+)-Glucose, wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- D(-)-Fructose (Merck, Darmstadt)
- Saccharose (Serva, Heidelberg)
- Maltose (Merck, Darmstadt)
- L-Alanin (Fluka, Buchs CH)
- o-Phenylendiamin (Fluka, Buchs CH)
- Cellulose mikrokristallin, Avicel 0,019 mm (Serva, Heidelberg)
- tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Titriplex III Lösung, 0,1 mol/l (Merck, Darmstadt)
- Kupfer(II)chlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Salzsäure, halbkonz.
- Natronlauge, 1,0 mol/l (Merck, Darmstadt)
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

### 7.2.1 Modelle mit Fructose-Alanin als Ausgangsverbindung

Für eine Meßreihe mit bis zu 20 Meßpunkten werden 120 mg Fructose-Alanin und 104 mg o-Phenylendiamin in einen 20 ml Meßkolben eingewogen und mit dem entsprechenden Citratpuffer (7.2.3), der je nach Versuchsreihe EDTA oder Kupfer enthält, aufgefüllt. Für jeden Meßpunkt werden nun 2,0 ml der jeweiligen Modellösung in ein Sovirelglas pipettiert. Das Modell enthält somit je Meßpunkt 6,0 mg (12 mmol/l) Fructose-Alanin und einen doppelt molaren Überschuß an o-Phenylendiamin.

### 7.2.2 Modelle mit Zuckern und Aminosäuren als Ausgangsverbindungen

Die Modelle mit den unterschiedlichen Zuckern als Ausgangsverbindungen werden so angesetzt, daß die Konzentration an dem jeweiligen Zucker bzw. der Aminosäure 12 mmol/l beträgt und somit der Konzentration an Fructose-Alanin in den Modellen mit der Amadori-Verbindung entspricht.

**Tabelle 10: Einwaagen für die Modelle mit Zuckern und Aminosäuren als Ausgangsverbindungen**

| Modell        | Einwaage Zucker                                   | Einwaage L-Alanin |
|---------------|---|-------------------|
| Glc           | 4,32  | 0,00              |
| Glc / Ala     | 4,32  | 2,14              |
| Fru / Ala     | 4,32  | 2,14              |
| Maltose / Ala | 8,64  | 2,14              |
|               | in mg bezogen auf 2,0 ml Citratpuffer je Meßpunkt |                   |

### 7.2.3 Citratpuffer (0,02 mol/l)

1,47 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat werden in einem 250 ml Meßkolben mit etwas Wasser gelöst. Je nach Versuchsreihe gibt man den benötigten Zusatz hinzu und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Der anfängliche pH-Wert von ca. 7,4 wird dann mit einigen Tropfen Salzsäure (konz. und 1,0 mol/l) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt (pH-Werte: 3,0 / 5,0 / 7,0).

#### 7.2.3.1 mit Kupfer-Zusatz

- Ansatz der Kupfer-Stammlösung:

85,25 mg Kupfer(II)chlorid-Dihydrat werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung hat damit eine Kupferkonzentration von 5,0 mmol/l.

Beim Ansatz des Citratpuffers werden 2,5 ml der Kupfer-Stammlösung (5,0 mmol/l) vor dem Auffüllen auf 250 ml zugesetzt. Der Citratpuffer und die damit hergestellten wäßrigen Modelle haben somit eine Kupferkonzentration von 50 µmol/l.

#### 7.2.3.2 mit EDTA als Komplexierungsreagenz für Metallspuren

- Ansatz der EDTA-Stammlösung:

10 ml Titriplex III Lösung (0,1 mol/l) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung hat damit eine EDTA-Konzentration von 10 mmol/l.

Beim Ansatz des Citratpuffers werden 2,5 ml EDTA-Stammlösung (10 mmol/l) vor dem Auffüllen auf 250 ml zugesetzt. Der Citratpuffer und die damit hergestellten wäßrigen Modelle haben somit eine EDTA-Konzentration von 0,1 mmol/l.

### 7.2.4 Modelle zur Abhängigkeit von der Kupferkonzentration

Insgesamt werden drei verschiedene Modellreihen mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen angesetzt. Die Modelle unterscheiden sich in der Auswahl der Pufferlösungen:

- Citratpuffer, pH 7,0  
nach 7.2.3 jedoch ohne weitere Zusätze
- Modell ohne Puffer, pH 7,0  
Wasser wird mit Natronlauge (1 mol/l) auf pH 7,0 gebracht, keine weiteren Zusätze
- Phosphatpuffer (0,1 mol/l), pH 7,0  
10,89 g di-Natriumhydrogenphosphat und 5,28 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 1 l Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt [112].

#### 7.2.4.1 Ansatz der Kupfer-Verdünnungsreihe

- Ansatz der Kupfer-Stammlösung I:  
85,25 mg Kupfer(II)chlorid-Dihydrat werden mit Pufferlösung auf 100 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung hat damit eine Kupferkonzentration von 5,0 mmol/l.

Modell Cu I enthält 100 µl der Stammlösung I auf 1,0 ml. Die anderen Modelle entsprechend 100 µl einer 1:10-Verdünnung der vorangegangenen Kupfer-Standardlösung. Daraus ergeben sich folgende Kupferkonzentrationen; das Modell II entspricht dem üblichen Kupfergehalt in den sonst verwendeten Modellen.

Tabelle 11: Konzentrationsreihe in den Modellen mit unterschiedlichen Kupfergehalten

| Modell   | Kupferkonzentration |            |
|----------|---------------------|------------|
| Cu I     | 500,0 µmol/l        | 31,8 mg/l  |
| Cu II    | 50,0 µmol/l         | 3,18 mg/l  |
| Cu III   | 5,0 µmol/l          | 318,0 µg/l |
| Cu IV    | 0,5 µmol/l          | 31,8 µg/l  |
| Cu V     | 50,0 nmol/l         | 3,18 µg/l  |
| Cu VI    | 5,0 nmol/l          | 318,0 ng/l |
| Cu Blind | -                   | -          |

#### Durchführung

Um die Abhängigkeit der Glucoson-Bildung von der Kupferionen-Konzentration zu ermitteln, werden Modelle mit einem pH-Wert von 7,0 und unterschiedlich hohen Gehalten an Kupferionen angesetzt. Die Proben werden für 24 h auf 50°C erhitzt. Wie die anderen Modelle zeigten, spielt bei diesen niedrigen Temperaturen nur die Glucoson-Bildung eine Rolle, so daß Konkurrenzreaktionen, die zu den Desoxyosone führen, nicht zu erwarten sind.

Man wiegt 50 mg Fructose-Alanin und 36 mg o-Phenylendiamin ein und löst in jeweils 15 ml Pufferlösung (Citratpuffer, Phosphatpuffer, ungepuffert). Für jeden Meßpunkt werden jeweils 900 µl dieser Ausgangslösung in einem Sovirelglas mit 100 µl der entsprechenden Kupfer-Standardlösungen versetzt. Die Konzentrationen an Fructose-Alanin (12 mmol/l) und

o-Phenylendiamin entsprechen somit den Standardmodellen (7.2.1) - lediglich die Kupferkonzentrationen variieren.

## 7.2.5 Modell zur Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration

- Ansatz des kupferhaltigen Citratpuffers

Beim Ansatz des Citratpuffers werden 2,77 ml der Kupfer-Stammlösung (5,0 mmol/l, siehe 7.2.3.1) vor dem Auffüllen auf 250 ml zugesetzt. Da für jeden Meßpunkt 900 µl Citratpuffer und 100 µl des EDTA-Standards eingesetzt werden, ist die Konzentration an Kupfer in den Modellösungen jeweils 50 µmol/l (vergl. die Modelle nach 7.2.3).

### 7.2.5.1 Ansatz der EDTA-Verdünnungsreihe

- EDTA-Stammlösung I:

5 ml Titriplex III Lösung (0,1 mol/l) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung hat damit eine EDTA-Konzentration von 5 mmol/l.

Modell EDTA I enthält 100 µl der Stammlösung I auf 1,0 ml. Die anderen Modelle entsprechend 100 µl einer Verdünnung der vorangegangenen EDTA-Standardlösung. Daraus ergeben sich folgende EDTA-Konzentrationen bzw. folgende molare Verhältnisse von Kupfer zu EDTA in den einzelnen Modellen.

**Tabelle 12: Konzentrationsreihe in den Modellen mit unterschiedlichen EDTA-Gehalten**

| Modell     | EDTA-Konzentration | Verhältnis Cu : EDTA |
|------------|--------------------|----------------------|
| EDTA I     | 500 µmol/l         | 1 : 10               |
| EDTA II    | 100 µmol/l         | 1 : 2                |
| EDTA III   | 50 µmol/l          | 1 : 1                |
| EDTA IV    | 10 µmol/l          | 5 : 1                |
| EDTA V     | 5 mol/l            | 10 : 1               |
| EDTA Blind | -                  | -                    |

### Durchführung

Um die Abhängigkeit der Glucoson-Bildung von der EDTA-Konzentration zu ermitteln, werden Modelle mit einem pH-Wert von 7,0 und unterschiedlich hohen Gehalten an EDTA angesetzt. Die Proben werden für 24 h auf 50°C erhitzt. Wie die anderen Modelle zeigten, spielt bei diesen niedrigen Temperaturen nur die Glucoson-Bildung eine Rolle, so daß Konkurrenzreaktionen, die zu den Desoxyosone führen, nicht zu erwarten sind.

Man wiegt 50 mg Fructose-Alanin und 36 mg o-Phenylendiamin ein und löst in 15 ml kupferhaltigen Citratpuffer. Für jeden Meßpunkt werden jeweils 900 µl dieser Ausgangslösung in einem Sovirelglas mit 100 µl der entsprechenden EDTA-Standardlösungen versetzt. Die



Konzentrationen an Fructose-Alanin, o-Phenylendiamin und Kupfer entsprechen somit den Standardmodellen (7.2.1) - lediglich die EDTA-Konzentrationen variieren.

### **7.2.6 Erhitzungsbedingungen / Aufarbeitung der Proben**

Die einzelnen Proben in den Sovirelgläsern werden dicht verschlossen und im vorgeheizten Trockenschrank für eine vorgegebene Zeit erhitzt. Danach werden die Proben schnell direkt tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Der Rückstand wird direkt zur gaschromatographischen Bestimmung der entstandenen Chinoxaline neben den Ausgangsverbindungen eingesetzt.

## **7.3 Ansatz der wasserarmen Modellsysteme auf Basis mikrokristalliner Cellulose (Avicel)**

### **Geräte**

- Exsikkator
- Kristallisierschale, Ø 12 mm
- Mörser mit Pistill, Porzellan

### **Chemikalien**

- Fructose-Alanin (nach 7.1.1)
- o-Phenylendiamin (Fluka, Buchs CH)
- Cellulose mikrokristallin, Avicel 0,019 mm (Serva, Heidelberg)
- tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Titriplex III Lösung, 0,1 mol/l (Merck, Darmstadt)
- Kupfer(II)chlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Salzsäure, halbkonz.
- Natronlauge, 1,0 mol/l (Merck, Darmstadt)
- Lithiumchlorid, wasserfrei (Fluka, Buchs CH)
- Kaliumacetat (Merck, Darmstadt)
- Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Magnesiumnitrat (Merck, Darmstadt)
- Ammoniumnitrat (Fluka, Buchs CH)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Zinksulfat (Merck, Darmstadt)

## Durchführung

Für eine Meßreihe mit bis zu 20 Meßpunkten werden 120 mg Fructose-Alanin und 104 mg o-Phenylendiamin in ein kleines Becherglas eingewogen. Man wiegt soviel Avicel ein, daß das Gesamtgewicht aller Substanzen 4,00 g beträgt. Je nach Versuchsreihe suspendiert man das Avicelgemisch mit 20 ml des entsprechenden Citratpuffers (7.3.1) und mischt gut im Ultraschallbad. Man gefriertrocknet die Suspension und mörsert den trocknen Rückstand gründlich.

Für jeden Meßpunkt werden nun 200 mg des Avicelgemisches in ein Sovirelglas eingewogen und der  $a_w$ -Wert des Modells wie unter 7.3.2 beschrieben eingestellt. Das Modell enthält somit je Meßpunkt 6,0 mg (0,024 mmol) Fructose-Alanin

### 7.3.1 Citratpuffer (0,04 mol/l)

2,94 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat werden in einem 250 ml Meßkolben mit etwas Wasser gelöst. Je nach Versuchsreihe gibt man den benötigten Zusatz hinzu und füllt mit Wasser bis zur Marke auf. Der anfängliche pH-Wert von ca. 7,4 wird dann mit sehr wenig Salzsäure (konz. und 1,0 mol/l) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt (pH-Werte: 3,0 / 5,0 / 7,0).

#### 7.3.1.1 mit Kupfer-Zusatz

- Ansatz der Kupfer-Stammlösung:

85,25 mg Kupfer(II)chlorid-Dihydrat werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung hat damit eine Kupferkonzentration von 5,0 mmol/l.

Beim Ansatz des Citratpuffers werden 5,0 ml der Kupfer-Stammlösung (5,0 mmol/l) vor dem Auffüllen auf 250 ml zugesetzt. Der Citratpuffer hat somit eine Kupferkonzentration von 100  $\mu$ mol/l - die so hergestellten Avicelmodelle eine Kupferkonzentration von 50  $\mu$ mol/100g.

#### 7.3.1.2 mit EDTA als Komplexierungsreagenz für Metallspuren

- Ansatz der EDTA-Stammlösung:

10 ml Titriplex III Lösung werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung hat damit eine EDTA-Konzentration von 10 mmol/l.

Beim Ansatz des Citratpuffers werden 5,0 ml EDTA-Stammlösung (10 mmol/l) vor dem Auffüllen auf 250 ml zugesetzt. Der Citratpuffer hat somit eine EDTA-Konzentration von 0,2 mmol/l - die so hergestellten Avicelmodelle eine EDTA-Konzentration von 0,1 mmol/100g.

### 7.3.2 Einstellung des $a_w$ -Wertes

Zur Einstellung eines definierten  $a_w$ -Wertes stellt man eine Kristallisierschale, die eine gesättigte Salzlösung enthält in einen Exsikkator (die Lösung muß einen Bodensatz des Salzes

aufweisen). Nach ca. drei Tagen stellt sich in dem Exsikkator eine relative Luftfeuchtigkeit ein, die abhängig von der verwendeten Salzlösung ist [98].

Die in Sovirelgläser eingewogenen Proben (0,2 g je Meßpunkt) werden nun offen in dem Exsikkator aufbewahrt, wodurch sich durch die vorgegebene Luftfeuchtigkeit in den Proben der entsprechende  $a_w$ -Wert einstellt. Hierfür werden die offenen Sovirelgläser in dem Exsikkator belassen, bis sich das Gewicht der Probe nicht mehr ändert. Zum Zeitpunkt dieser Gewichtskonstanz befindet sich die Probe mit der Umgebungsfeuchte im Gleichgewicht, was wiederum bedeutet, daß der gewünschte  $a_w$ -Wert in den Proben eingestellt wurde. Dieser Vorgang der  $a_w$ -Wert-Einstellung dauert ca. drei Tage.

**Tabelle 13:**  $a_w$ -Wert in Abhängigkeit von den gesättigten Salzlösungen [98]

| eingesetztes Salz          | $a_w$ -Wert bei 20-25°C |
|----------------------------|-------------------------|
| Lithiumchlorid, wasserfrei | 0,11                    |
| Kaliumacetat               | 0,23                    |
| Magnesiumchlorid           | 0,33                    |
| Magnesiumnitrat            | 0,52                    |
| Ammoniumnitrat             | 0,63                    |
| Natriumchlorid             | 0,75                    |
| Zinksulfat                 | 0,90                    |

### 7.3.3 Erhitzungsbedingungen / Aufarbeitung der Proben

Die einzelnen Proben in den Sovirelgläsern werden dicht verschlossen und jeweils für vier Stunden im auf 80 °C vorgeheizten Trockenschrank erhitzt.

Danach werden die Proben schnell abgekühlt und das Avicelgemisch zur Extraktion der Chinoxaline und der Amadori-Verbindungen im Sovirelglas mit 2,0 ml Wasser auf dem Vibrofix aufgeschlemmt. Die Extraktion wird noch für weitere zehn Minuten im Ultraschallbad fortgesetzt. Schließlich zentrifugiert man das Avicel ab und entnimmt von der überstehenden, klaren Lösung einen aliquoten Anteil von 1,0 ml, der für die gaschromatographische Bestimmung (7.6.3) weiter aufgearbeitet wird.

## 7.4 Ansatz der Maischen und der Würzen im Labormaßstab

### Geräte

- Becherglas, 400 ml
- Liebigkühler

- Mikroschlagmühle, Maschenweite 1,2 mm (Culatti, Zürich CH)
- Schliffthermometer
- Zueihalskolben, 500 ml

### Chemikalien

- helles Gerstenmalz (Bergische Löwen-Brauerei GmbH & Co. KG, Köln Mühlheim)
- o-Phenylendiamin (Fluka, Buchs CH)
- Kupfer(II)chlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Titriplex III Lösung, 0,1 mol/l (Merck, Darmstadt)

#### 7.4.1 Schrotten des Gerstenmalzes

Das Gerstenmalz wird mit Hilfe einer Mikroschlagmühle vermahlen. Dabei sollte es sich nicht zu stark erwärmen. Schließlich erhält man einen feinen Mehlkörper und zusätzlich die zurückgehaltenen Spelzen mit einer Größe von über 1,2 mm, die man wieder sorgfältig miteinander vermischt. Das so erhaltene Gerstenmalz dient als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen und für die Herstellung der Maische.

#### 7.4.2 Ansatz der Maische im Labormaßstab

- Ansatz der Kupfer-Stammlösung:  
267 mg (1,57 mmol) Kupfer(II)chlorid-Dihydrat werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt (entspricht 100 mg  $\text{Cu}^{2+}$  / 100 ml). Ein Aliquot dieser Stammlösung wird noch mal 1:100 verdünnt; die verwendete Kupfer-Stammlösung hat damit eine Kupferkonzentration von 1,0 mg / 100 ml.

Zur Einstellung unterschiedlicher Kupferkonzentrationen in der Maische wird ein Aliquot der Stammlösung mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und diese Lösung zum Einmischen verwendet.

Tabelle 14: Kupferkonzentrationen in den Einmisch-Lösungen

| v(Stammlösung)<br>auf 100 ml | Kupferkonzentration<br>in der Einmisch-Lösung |
|------------------------------|---|
| 2                            | 20  |
| 5                            | 50  |
| 10                           | 100   |
| in ml                        | in $\mu\text{g}$ / 100 ml                     |

Für die Maische ohne Kupfer-Katalyse wird eine Einmisch-Lösung mit EDTA versetzt, um auch eventuell vorhandene andere Schwermetallspuren wirkungsvoll zu komplexieren.

Hierfür stellt man sich eine Einmisch-Lösung her, die 500 µl einer 0,1 molaren Titriplex III Lösung auf 100 ml enthält; diese Lösung enthält also 500 µmol/l EDTA.

### Durchführung

20 g Malz werden in einem Zweihalskolben (Schliffthermometer, Liebigkühler) mit 100 ml Wasser versetzt, das je nach Versuchsbedingung unterschiedliche Zusätze enthält. Das Verhältnis von Malz zu Wasser entspricht damit der üblichen Konzentration des Hauptgusses beim Einmischen, wie es in Brauereien durchgeführt wird. Sollen in der Maische die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen abgefangen werden, so gibt man noch 436 mg (4,0 mmol) o-Phenylendiamin hinzu. Der pH-Wert der Suspension sollte in jedem Fall 5,8 - 6,0 betragen. Eine Korrektur des pH-Wertes ist jedoch im allgemeinen nicht nötig.

Zum Erhitzen taucht der Zweihalskolben in ein Glycerinbad, das durch einen heizbaren Magnetrührer erwärmt wird. Die Suspension (Maische) wird nun unter ständigem Rühren innerhalb von zwei Stunden langsam von Raumtemperatur auf eine Abmischtemperatur von 78 °C gebracht. Nach dem Abkühlen wird die Maische durch Filtration durch einen Faltenfilter vom Treber abgetrennt; anschließendes Auspressen des Treberkuchens erhöht die Ausbeute an Maische. Danach kann ein Aliquot der Maische direkt zur Analyse (7.6.2) weiter aufgearbeitet werden. Ansonsten wird die Maische zum Kochen der Würze weiterverarbeitet.

### 7.4.3 Das Würzekochen

Der ausgepreßte Treber aus 7.4.2 wird mit ca. 100 ml Wasser, das auf 78 °C erhitzt wurde, nachgewaschen. Dieser Nachguß wird mit der aus 20 g Malz gewonnene Maische vereinigt und im Meßkolben auf 200 ml aufgefüllt. Sollen in der Würze die  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen abgefangen werden, so gibt man noch 436 mg (4,0 mmol) o-Phenylendiamin hinzu.

Die Würze wird nun schnell in einem offenen Becherglas (Würzpfanne) unter ständigem Rühren zum Kochen erhitzt. In diesem Labormaßstab kocht die Würze insgesamt 1½ Stunden, wobei mehr als die Hälfte der eingesetzten Flüssigkeit verdampft. Zum besseren Vergleich der einzelnen Ergebnisse wird die erhaltene Ausschlagwürze in einem Meßkolben auf 100 ml ergänzt. Dies entspricht dem Einstellen der Stammwürze vor der Vergärung im großtechnischen Maßstab. Von der so standardisierten Würze kann ein Aliquot zur weiteren Analyse eingesetzt werden (7.6.2).

## 7.5 Extraktion der Chinoxalinderivate aus wäßrigen Lösungen

### Geräte

- Scheidetrichter, 100 ml

## Chemikalien

- n-Butanol (Riedel-De Haën, Seelze)
- tert-Butyl-methylether (Fluka, Buchs CH)
- n-Hexan (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure-ethylester (Merck, Darmstadt)
- Dichlormethan (Merck, Darmstadt)
- D(+)-Glucose, wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- D(-)-Fructose (Merck, Darmstadt)
- Präparate aus 7.1.2, 7.1.3 und 7.1.4

## Durchführung

Jeweils 10 mg der Chinoxalinderivate aus 7.1.2, 7.1.3 und 7.1.4, 200 mg Glucose und 200 mg Fructose werden in einem 100 ml Meßkolben mit Citratpuffer (nach 7.2.3, ohne Zusatz) aufgefüllt. 10 ml dieser Lösung werden zweimal mit jeweils 10 ml Lösungsmittel ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird direkt zur gaschromatographischen Bestimmung der Chinoxaline neben den Zuckern eingesetzt.

### 7.5.1 Bestimmung der Wiederfindungsraten für die Extraktion mit n-Butanol

Die Wiederfindungsraten für die einzelnen Chinoxaline bei der Extraktion mit n-Butanol wurde genaueren statistischen Untersuchungen unterzogen, um Aussagen über die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der eigenen Arbeitsweise machen zu können.

Für fünf unabhängig aufgearbeiteten Proben wurde die Wiederfindung für die drei Chinoxaline berechnet.

**Tabelle 15:** Wiederfindungsraten in % für die Chinoxaline bei einer Fünffachbestimmung. Angegeben ist der Mittelwert  $\bar{X}$  und die Standardabweichung  $s$ .

|                         | I    | II   | III  | IV   | V    | $\bar{X}$   | $s$         |
|-------------------------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|
| 1-Desoxyoson-chinoxalin | 95,1 | 93,0 | 93,2 | 91,0 | 95,4 | <b>93,5</b> | <b>1,80</b> |
| 3-Desoxyoson-chinoxalin | 96,5 | 92,7 | 93,2 | 91,0 | 93,3 | <b>93,3</b> | <b>1,98</b> |
| Glucoson-chinoxalin     | 82,1 | 86,2 | 81,1 | 79,0 | 81,2 | <b>81,9</b> | <b>2,66</b> |

Der Ausreißertest nach Grubbs gemäß den allgemeinen Vorschriften zur statistischen Analyse in den amtlichen Sammlungen nach § 35 LMBG verläuft für die Fünffachbestimmung

sowohl bei einer Signifikanz von 5% als auch bei 1% negativ. Somit dürfen die fünf Werte zur weiteren statistischen Behandlung verwendet werden [113].

Für die Überprüfung der eigenen Arbeitsweise ist es sinnvoll klarzustellen, in welchem Intervall die gefundenen Werte schwanken. Hierfür berechnet man den Vertrauensbereich des Analyseergebnisses. Dabei handelt es sich um das Intervall, in dem der tatsächliche Gehalt des Analyseergebnisses mit einer Wahrscheinlichkeit von P liegt. In dem Fall der Wiederfindungsraten, zeigt der Vertrauensbereich an, mit welcher Unsicherheit die gefundenen Werte behaftet sind, was für quantitative Aussagen über den Chinoxalingehalt der Extrakte und der ursprünglich vorliegenden wäßrigen Lösungen wichtig ist.

Der Vertrauensbereich wird in der Form  $\bar{x} \pm \Delta x$  angegeben, wobei sich  $\Delta x$  nach Gleichung 5 berechnet [114].

**Gleichung 5:**

$$\Delta x = s \cdot t_{f,P} \cdot \frac{1}{\sqrt{z}}$$

z: Anzahl der Analyseergebnisse  
= 5

s: Nahrungs-Standardabweichung, siehe Tabelle 15.

t: t-Wert aus der t-Tabelle in Abhängigkeit von dem Freiheitsgrad der Standardabweichung ( $f = z - 1$ ) und der Sicherheit  $P = 95\%$  [113][114]

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Bestimmung des Vertrauensbereiches für die einzelnen Chinoxaline**

|                         | $\bar{x}$   | s    | t    | $\Delta x$ |
|-------------------------|-------------|------|------|------------|
| 1-Desoxyoson-chinoxalin | <b>93,5</b> | 1,80 | 2,78 | <b>2,2</b> |
| 3-Desoxyoson-chinoxalin | <b>93,3</b> | 1,98 | 2,78 | <b>2,5</b> |
| Glucoson-chinoxalin     | <b>81,9</b> | 2,66 | 2,78 | <b>3,3</b> |

Das ergibt für die Extraktion der Chinoxaline mit n-Butanol, folgendes Ergebnis für die Wiederfindungsraten, angeben in %:

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| 1-Desoxyoson-chinoxalin | 93,5 ± 2,2 |
| 3-Desoxyoson-chinoxalin | 93,3 ± 2,5 |
| Glucoson-chinoxalin     | 81,9 ± 3,3 |

## 7.6 Analytische Arbeiten

### 7.6.1 Nachweis von Radikalen in wäßrigen Modellsystemen

#### 7.6.1.1 Nachweis von Radikalen in wäßrigen Systemen mittels ESR und Spin Trapping mit DMPO

##### Gerätebedingungen - ESR

Bruker EMS 104 - EPR Analyzer (Bruker, Rheinstetten)

Microwave Power: 12,53 mW  
X-band (9,5 GHz)

Modulation:

Frequenz: 50 kHz

Amplitude: 6,37 G

Sweep Width: 100 G

Auswertesoftware: WIN-EPR V 921201 (Bruker, Rheinstetten)

##### Gerätebedingungen - Bestrahlung

Siemens SRS 303 - Sequenz Röntgenspektrometer (Siemens AG, München)

Röntgen-Quelle:

Spannung: 60 kV

Stromstärke: 50 mA

Filter: Al 0,8 mm

Bestrahlungsdauer: 120 s

##### Geräte

- Kapillare, innen  $\varnothing$  0,95 mm
- Schlauchstücke aus PP, innen  $\varnothing$  1,0 mm

##### Chemikalien

- DMPO (Sigma, Deisenhofen)
- Fructose-Alanin, Präparat aus 7.1.1

##### Durchführung

25,2 mg Fructose-Alanin werden in 100  $\mu$ l eines Citratpuffers, der nach 7.2.3 angesetzt wurde, gelöst. Zur Messung der gebildeten Radikale beim metallkatalysierten Abbau der Amadori-Verbindung enthält dieser Puffer 50  $\mu$ mol/l Kupfer(II)-Ionen. Man gibt 10  $\mu$ l DMPO zu der Lösung und schüttelt kurz. Danach wird ein Teil der Lösung in die Kapillare gesogen.



Durch geeignetes Schrägstellen wird die Kapillare auf eine Höhe von genau 40 mm gefüllt. Die Kapillare enthält somit genau 28 µl der Lösung. Die Flüssigkeitssäule reicht aus, um die gesamte Höhe der Meßzelle (Cavity) auszufüllen. Die Kapillare wird mit kleinen *zugeschweißten* Schlauchstücken aus Polypropylen an beiden Seiten verschlossen und in das eigentliche Meßgefäß gegeben. Das Meßgefäß, das die Kapillare enthält, wird nun in die Meßzelle des ESR-Spektrometers gesetzt und das Spektrum der Probe wird registriert.

Zur Erzeugung von Radikalen in einer einmolaren Fructose-Alanin-Lösung (s. o.), wird die Lösung mit der Röntgenquelle eines Sequenz Röntgenspektrometer bestrahlt. Die Lösung wird ebenfalls in eine Kapillare gefüllt und ESR-spektroskopisch vermessen.

Zur Aufnahme des DMPO-OH Vergleichsspektrum wird eine Lösung aus 100 µl Wasser und 10 µl DMPO parallel dazu bestrahlt und das ESR-Spektrum aufgenommen.

### 7.6.1.2 Photometrische Bestimmung von Radikalen mit der DPPH-Methode

#### Geräte

- UV/VIS Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer, Überlingen)
- Quarzküvetten, 1,000 cm (Carl Zeiss, Jena)
- Schüttelmaschine 3005 (GFL, Burgwedel)

#### DPPH-Reagenz

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Fluka, Buchs CH)
- Chloroform, z. A. (Merck, Darmstadt)

10 mg DPPH werden in 100 ml Chloroform gelöst und bis zur Analyse dunkel im Kühlschrank gelagert.

Durch geeignete Verdünnung dieser Reagenzlösung mit Chloroform stellt man sich eine Kalibrationsreihe her, die ebenfalls photometrisch vermessen wird. Die Auswertung der Proben erfolgt über die hieraus resultierende Kalibrationsgerade unter Berücksichtigung der Einwaage und der Verdünnungsschritte.

Zur Herstellung einer reinen 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin-Lösung, die keine Radikale mehr enthält, versetzt man einen Teil des DPPH-Reagenz mit einer wäßrigen Lösung, die einen Überschuß an Ascorbinsäure enthält und schüttelt diese einige Zeit kräftig. Die Abwesenheit von DPPH-Radikalen erkennt man an der vollständigen Entfärbung der organischen Phase.

#### Durchführung

Jeweils 2,0 ml eines Fructose-Alanin-Modells (angesetzt gemäß 7.2.1), das jedoch kein o-Phenylendiamin enthält, werden in einem Sovirelglas für zwei Stunden im Trockenschrank auf 80 °C erhitzt. Danach kühlt man die Probe schnell ab und entnimmt ein 1,0 ml Aliquot. Dieses Aliquot wird in einem Sovirelglas mit 3,0 ml DPPH-Reagenz versetzt und auf der

Schüttelmaschine für eine Stunde geschüttelt. Zur Bestimmung des DPPH-Gehaltes wird die organische Phase im Photometer bei 529 nm gegen Chloroform vermessen.

## 7.6.2 Untersuchungen in Malz, Maischen und Würzen

### Geräte

- Chromatographiesäule mit Lösungsmittelreservoir ( $\varnothing$  12 mm)
- Rundkolben, 250ml
- Spitzkolben, 100 ml
- Zentrifugenglas, 100 ml
- Scheidetrichter, 100 ml und 250 ml
- Ultraturrax IKA TP25 (Janke & Kunkel, Staufen)

### Chemikalien

- Diethylether (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, 70%
- Kationenaustauscherharz Lewatit S 1080 (Merck, Darmstadt)
- Salzsäure (3 mol/l)
- Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)
- Methanol, reinst (Merck, Darmstadt)
- n-Butanol (Riedel-De Haën, Seelze)

### Kationenaustauschersäule

Die hier genutzte analytische Kationenaustauschersäule entspricht der präparativen Säule (vergl. 7.1.1).

#### 7.6.2.1 Aufarbeitung von Malz

5 g des zerkleinerten Malzes (7.4.1) werden zur Fällung der Polysaccharide in einem Zentrifugenglas mit 50 ml Ethanol (70%) versetzt und mit dem Ultraturrax homogenisiert. Man zentrifugiert und dekantiert die überstehende Lösung in einen Rundkolben. Die Extraktion wird noch zweimal mit jeweils 40 ml Ethanol (70%) wiederholt. Die gesammelten Ethanol-extrakte werden durch einen Faltenfilter filtriert und am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von maximal 35 °C auf 10 ml eingengt.

#### 7.6.2.2 Aufarbeitung von Maischen und Würzen

25 ml der zu untersuchenden Maische bzw. Würze werden mit 70 ml Ethanol (96%) versetzt und zur vollständigen Abscheidung der Polysaccharide über Nacht bei 4 °C gelagert. Man filtriert die Lösung durch einen Faltenfilter ab und wäscht mit 70%igem Ethanol nach. Der

ethanolische Extrakt wird am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 35 °C auf ca. 10 ml eingeeengt.

### **7.6.2.3 Trennung von Zuckern und Amadori-Verbindungen an der Kationenaustauschersäule**

Der eingeeengte Extrakt aus 7.6.2.1 und 7.6.2.2 wird durch einen Faltenfilter direkt auf die Kationenaustauschersäule gegeben; man läßt langsam einziehen und spült noch zweimal mit je 10 ml Wasser. Danach wäscht man die Säule mit 50 ml Wasser zuckerfrei. Das Eluat fängt man hierbei in einem Meßkolben (100 ml) auf, den man anschließend mit Wasser bis zur Marke auffüllt. Zur gaschromatographischen Bestimmung (nach 7.6.3) der Zucker werden 0,2 ml dieser Lösung gefriergetrocknet und direkt derivatisiert. Bei der Bestimmung der Zucker aus Malzen kann es beim vorangegangenen Ethanolextrakt zu Verlusten an Maltose kommen [25]. Deswegen werden die Zucker in diesem Fall nicht aus dem Säuleneluat, sondern direkt aus einem wäßrigen Extrakt bestimmt. Dafür werden 0,5 g zerkleinertes Malz mit 10 ml Wasser im Ultraschallbad extrahiert. 0,2 ml davon werden direkt gefriergetrocknet und zur Gaschromatographie eingesetzt.

Anschließend werden die Amadori-Verbindungen mit 140 ml Trichloressigsäure-Lösung (0,5 mol/l) von der Säule eluiert. Man engt das Eluat auf ca. 50 ml ein und schüttelt zur Entfernung der Trichloressigsäure siebenmal mit 60 ml Diethylether aus, wobei man die organische Phase verwirft. Die wäßrige Phase wird am Rotationsverdampfer auf wenige Milliliter eingeeengt. Der so gewonnene Extrakt, der die Amadori-Verbindungen enthält, wird schließlich gefriergetrocknet und der Rückstand zur gaschromatographischen Bestimmung eingesetzt.

### **7.6.2.4 Bestimmung der $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Chinoxaline in Maischen und Würzen**

25,0 ml der zu untersuchenden Maische bzw. Würze werden mit 70 ml Ethanol (96%) versetzt und zur vollständigen Abscheidung der Polysaccharide über Nacht bei 4°C gelagert. Man filtriert die Lösung durch einen Faltenfilter ab und wäscht mit 70%igem Ethanol nach. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 60 °C auf ca. 20 ml eingeeengt, so daß man das Ethanol vollständig entfernt hat. Man schüttelt die Chinoxaline zweimal mit 25 ml n-Butanol aus. Die organischen Phasen werden in einem Spitzkolben gesammelt und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Den Rückstand, der die Chinoxaline neben den zu einem Teil mit extrahierten Zuckern enthält, nimmt man in 10,0 ml eines Wasser / Methanol-Gemisches (1:1) auf. Ein Aliquot von 1,0 ml wird zur Entfernung des Methanols am Rotationsverdampfer auf die Hälfte eingeeengt und der wäßrige Rest gefriergetrocknet. Der Rückstand wird direkt zur gaschromatographischen Bestimmung der Chinoxaline eingesetzt.

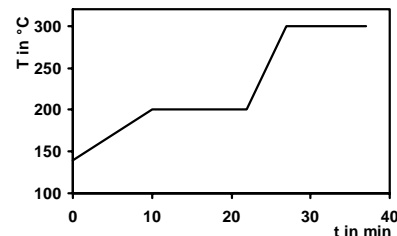
### 7.6.3 Gaschromatographische Bestimmung von Zuckern, Amadori-Verbindungen und Chinoxalinen nebeneinander

#### Gerätebedingungen

|                    |  |             |        |
|--------------------|--|-------------|--------|
| GC:                | Autosystem XL (Perkin Elmer, Überlingen)                     |             |        |
| Säule:             | HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Hewlett-Packard, Waldbronn) |             |        |
| Carrier:           | Wasserstoff 1,2 ml/min (58 kPa)                              |             |        |
| Injektor:          | PSS - Split 1:50   | Temperatur: | 250 °C |
| Injektionsvolumen: | 1,0 µl   |             |        |
| Detektor:          | FID  | Temperatur: | 300 °C |
| Wasserstoff:       | 45 ml/min  |             |        |
| Luft:              | 450 ml/min   |             |        |
| Auswertesoftware:  | Turbochrom 6.1.0.2 (Perkin Elmer, Überlingen)                |             |        |

#### Temperaturprogramm

|                 |                         |
|-----------------|-------------------------|
| Initial Value:  | 140 °C                  |
| Program Rate 1: | 6 °C/min                |
| Final Value 1:  | 200 °C, hold for 12 min |
| Program Rate 2: | 20 °C/min               |
| Final Value 2:  | 300 °C, hold for 3 min  |



Das Plateau bei 200°C kann bei Abwesenheit von Amadori-Verbindungen entfallen.

#### 7.6.3.1 Oximierung und Silylierung

##### Chemikalien

- Xylit (Merck, Darmstadt)
- Trehalose-Dihydrat (Fluka, Buchs CH)
- Hydroxylammoniumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Pyridin, zur Analyse (Merck, Darmstadt)
- N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (Fluka, Buchs CH)
- 1,1,2-Trichlortrifluorethan (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Trimethylchlorsilan (Fluka, Buchs CH)

##### Oximierungsreagenz

50,0 mg Xylit, 50,0 mg Trehalose als interne Standards und 2,50 g Hydroxylammoniumchlorid werden mit Pyridin auf 100 ml aufgefüllt.

### Silylierungsreagenz

2,5 ml BSA und 0,8 ml TMCS werden kurz vor der Silylierung gemischt. Da das Silylierungsreagenz sehr anfällig gegen Wasser und selbst Luftfeuchtigkeit ist, sollte immer nur die für die anstehende Serie benötigte Menge Reagenz angesetzt werden.

#### 7.6.3.2 Aufarbeitung der Probe

Die zu analysierende Lösung wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt oder - noch schonender - über Nacht gefriergetrocknet.

Der Rückstand wird in 0,5 ml Oximierungsreagenz aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wird zur Oximierung für eine halbe Stunde im Trockenschrank auf 70 °C erhitzt.

Zur Silylierung gibt man anschließend in die abgekühlte Lösung 0,33 ml Silylierungsreagenz (entspricht: 0,25 ml BSA + 0,08 ml TMCS) und erwärmt wieder für eine halbe Stunde im Trockenschrank auf 70 °C.

Nach dem Abkühlen gibt man noch 0,25 ml TCTFE hinzu. Die erhaltene Lösung kann direkt für die Gaschromatographie eingesetzt werden. Ein bei realen Proben eventuell auftretender weißer Niederschlag wird abzentrifugiert und die überstehende Lösung zur Analyse verwendet.

#### 7.6.3.3 Auswertung

##### Standardchemikalien

- D(+)-Glucose, wasserfrei (Merck, Darmstadt)
- D(-)-Fructose (Merck, Darmstadt)
- Saccharose (Serva, Heidelberg)
- Maltose (Merck, Darmstadt)
- *meso*-Inosit (Merck, Darmstadt)
- Amadori-Verbindungen aus 7.1.1
- Präparate aus 7.1.2, 7.1.3 und 7.1.4

##### Durchführung

Die Auswertung der Proben erfolgt über die zwei inneren Standards Xylit und Trehalose, die bereits im Oximierungsreagenz enthalten sind. In einem Kalibrationslauf mit bekannten Konzentrationen werden die Response-Faktoren für die einzelnen Substanzen ermittelt (Gleichung 6). Dabei werden für die reduzierenden Zucker die Peakflächen der beiden Peaks (*syn*- und *anti*-Form des Oxims) addiert. Während die Monosaccharide über den inneren Standard Xylit quantifiziert werden, berechnet man die Disaccharide, sowie die Amadori-Verbindungen und die Chinoxaline über den inneren Standard Trehalose.

Über die Response-Faktoren der einzelnen Substanzen kann man schon erste Aussagen über die *Qualität* der Silylierung machen. So sollte der Response-Faktor für die Monosaccharide bezogen auf Xylit nur wenig von 1,0 unterschiedlich sein. Das gleiche sollte für die Response-Faktoren der Disaccharide bezogen auf Trehalose gelten. Des Weiteren sollte bei mehreren Läufen das Peakflächenverhältnis der beiden inneren Standards nahezu identisch bleiben.

Die Konzentration der jeweiligen Substanz in dem Analysenlauf berechnet sich dann mit Hilfe des ermittelten Response-Faktors (Gleichung 7).

**Gleichung 6:**

$$R_{\text{SUB}} = \frac{A_{\text{ISTD}} \cdot C_{\text{SUB}}}{C_{\text{ISTD}} \cdot A_{\text{SUB}}}$$

$R_{\text{SUB}}$ : Response-Faktor

$A_{\text{ISTD}}$ : Fläche des inneren Standards im Kalibrationslauf

$C_{\text{ISTD}}$ : Konzentration des inneren Standards im Kalibrationslauf

$A_{\text{SUB}}$ : Fläche der zu untersuchenden Substanz im Kalibrationslauf

$C_{\text{SUB}}$ : Konzentration der zu untersuchenden Substanz im Kalibrationslauf

**Gleichung 7:**

$$C_{\text{SUB}} = \frac{R_{\text{SUB}} \cdot A_{\text{SUB}} \cdot C_{\text{ISTD}}}{A_{\text{ISTD}}}$$

$C_{\text{SUB}}$ : Konzentration der zu untersuchenden Substanz im Analysenlauf

$A_{\text{SUB}}$ : Fläche der zu untersuchenden Substanz im Analysenlauf

$R_{\text{SUB}}$ : Response-Faktor der zu untersuchenden Substanz aus Gleichung 6

$A_{\text{ISTD}}$ : Fläche des inneren Standards im Analysenlauf

$C_{\text{ISTD}}$ : Konzentration des inneren Standards im Analysenlauf

## 7.6.4 Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA

### Chemikalien

- Natriumacetat-Trihydrat (Merck, Darmstadt)
- Triethanolamin (Merck, Darmstadt)
- Acetonitril (Merck, Darmstadt)
- Methanol (Merck, Darmstadt)
- Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt)
- Tetrahydrofuran, Chromasolv (Riedel-De Haën, Seelze)
- Natronlauge, 1 mol/l (Merck, Darmstadt)

- o-Phthalaldehyd (Serva, Heidelberg)
- 2-Mercaptoethanol (Fluka, Buchs CH)

### Gerätebedingungen

|                       |  |
|-----------------------|--|
| HPLC:                 | HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn)   |
| Säule:                | AminoQuant (200 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 5 µm)<br>(Hewlett-Packard, Waldbronn) |
| Säulentemperatur:     | 40 °C  |
| Flow:                 | 0,45 ml/min (konstant über die Laufzeit)   |
| Injektionsvolumen:    | 7,0 µl   |
| Fluoreszenz-Detektor: | Anregungslicht: 340 nm<br>Fluoreszenzlicht: 450 nm                               |
| Auswertesoftware:     | HP Chemstation for LC and LC/MS Systems<br>(Hewlett-Packard, Waldbronn)          |

### 7.6.4.1 Fließmittel und Gradient

#### Fließmittel A

2,72 g Natriumacetat-Trihydrat werden unter Rühren in 1 l Wasser gelöst. Man gibt 180 µl Triethanolamin hinzu und stellt den pH-Wert der Lösung mit Essigsäure auf einen Wert von 7,20 ( $\pm 0,05$ ) ein. Anschließend werden noch 3,0 ml Tetrahydrofuran zugegeben und der fertige Puffer gründlich gemischt.

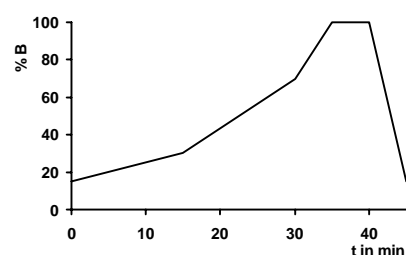
#### Fließmittel B

2,72 g Natriumacetat-Trihydrat werden unter Rühren in 200 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit Essigsäure auf einen Wert von 7,20 ( $\pm 0,05$ ) gebracht. Parallel dazu stellt man sich eine Mischung aus 400 ml Acetonitril und 400 ml Methanol her. Schließlich werden die beiden Lösungen vereint und gründlich gemischt.

Die fertigen Fließmittel müssen nun noch entgast werden. Hierfür werden die Vorratsgefäße, die die Fließmittel enthalten für zehn Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Während dieser Zeit, legt man mit der Wasserstrahlpumpe ein geringes Vakuum an. Die Entgasung der Fließmittel wird auch während der chromatographischen Trennung mittels des geräteeigenen Entgasers fortgesetzt.

#### Gradient

Beginnend mit 15 vol% Fließmittel B, innerhalb von 15 min ansteigend auf 30 vol% Fließmittel B; nach 30 min auf 70 vol% Fließmittel B und schließlich nach 35 min



100 vol% Fließmittel B bis zum Laufende (40 min); in 5 min zurück auf 15 vol% Fließmittel B

#### **7.6.4.2 Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthalaldehyd (OPA)**

##### **Boratpuffer (0,1 mol/l)**

1,9 g Natriumtetraborat werden in 50 ml Wasser gelöst und mit Natronlauge (1 mol/l) auf pH 10,4 eingestellt.

##### **OPA-Reagenz**

65 mg o-Phthalaldehyd und 20 µl 2-Mercaptoethanol werden in 20 ml Boratpuffer (0,1 mol/l) gelöst.

##### **Durchführung [115]**

Die Vorsäulenderivatisierung findet mit Hilfe eines Injektionsprogrammes in der Injektions-spritze des Autosamplers statt. Hierfür werden die einzelnen Lösungen in verschiedene Vials im Autosampler gegeben. Mit der 8 µl-Spritze werden jetzt nacheinander 5 µl Boratpuffer, 1 µl OPA-Reagenz und 1 µl Probenlösung aufgezogen. Im Kolben der Spritze werden die Lösungen durch mehrmaliges automatisches Auf- und Abziehen vermischt. Die Umsetzung der Aminosäuren mit dem OPA-Reagenz erfolgt noch in der Spritze. Schließlich wird die Lösung, die nun die derivatisierten Aminosäuren enthält zur chromatographischen Bestimmung auf die Säule gegeben.

#### **7.6.4.3 Aufarbeitung von Maischen und Würzen**

25,0 ml der zu untersuchenden Maische bzw. Würze werden in einen 100 ml Meßkolben pipettiert und mit Ethanol (96%) aufgefüllt, so daß die Ethanolkonzentration über 70 vol% beträgt. Zur vollständigen Abscheidung der Polysaccharide wird die Lösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Man filtriert die Lösung ab und entnimmt ein Aliquot von 1,0 ml den man nochmals 1:10 verdünnt. Das so verdünnte Aliquot kann direkt zur HPLC-Bestimmung eingesetzt werden.

#### **7.6.4.4 Aufarbeitung von Malzen**

5,0 g des zerkleinerten Malzes werden zur Extraktion der Aminosäuren in einem 100 ml Meßkolben mit 25 ml Wasser versetzt und für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Man füllt mit Ethanol (96%) auf, so daß der Ethanolgehalt dieser Lösung über 70 vol% beträgt. Zur vollständigen Abscheidung der Polysaccharide wird die Lösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Man filtriert die Lösung ab und entnimmt ein Aliquot von 1,0 ml den man nochmals 1:10 verdünnt. Das so verdünnte Aliquot kann direkt zur HPLC-Bestimmung eingesetzt werden.



### 7.6.4.5 Auswertung

#### Standardchemikalien

- $\gamma$ -Aminobuttersäure (Fluka, Buchs CH)
- L-Alanin (Fluka, Buchs CH)
- L-Arginin (Merck, Darmstadt)
- L-Asparagin (Fluka, Buchs CH)
- L-Asparaginsäure (Merck, Darmstadt)
- L-Glutamin (Fluka, Buchs CH)
- L-Glutaminsäure (Merck, Darmstadt)
- Glycin (Merck, Darmstadt)
- L-Histidin (Fluka, Buchs CH)
- L-Isoleucin (Fluka, Buchs CH)
- L-Leucin (Merck, Darmstadt)
- L-Lysin (Riedel-De Haën, Seelze))
- L-Methionin (Merck, Darmstadt)
- L-Phenylalanin (Fluka, Buchs CH)
- L-Serin (Merck, Darmstadt)
- L-Threonin (Fluka, Buchs CH)
- L-Tryptophan (Merck, Darmstadt)
- DL-Tyrosin (Fluka, Buchs CH)
- L-Valin (Fluka, Buchs CH)

Die Auswertung erfolgt über mehrere äußere Standards (Kalibrationsläufe), die jeweils 5 - 8 verschiedene Aminosäuren in bekannten Mengen enthalten und parallel zu den Analysenläufen chromatographisch bestimmt werden.

Die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren in den Analysenläufen erfolgt direkt nach Gleichung 8. Unter Berücksichtigung der Einwaage und der Verdünnungsschritte ergibt sich hieraus der Gehalt an freien Aminosäuren in dem eingesetzten Malz bzw. in der eingesetzten Maische oder Würze.

**Gleichung 8:**

$$C_{\text{SUB}} = \frac{A_{\text{SUB}} \cdot C_{\text{STD}}}{A_{\text{STD}}}$$

$A_{\text{STD}}$ : Fläche der jeweiligen Aminosäure im Kalibrationslauf

$C_{\text{STD}}$ : Konzentration der jeweiligen Aminosäure im Kalibrationslauf

$A_{\text{SUB}}$ : Fläche der jeweiligen Aminosäure im Analysenlauf

$C_{\text{SUB}}$ : Konzentration der jeweiligen Aminosäure im Analysenlauf

## 7.6.5 Bestimmung des Wassergehaltes in wasserarmen Proben mittels der Karl-Fischer-Titration

### Geräte

- Titrationsgerät TitroLine *alpha* mit Aufsatz für die Karl-Fischer-Titration (Schott Geräte, Hofheim)
- Exsikkator

### Chemikalien

- Hydranal-Solvent (Riedel-De Haën, Seelze)
- Hydranal-Titrant 5 (Riedel-De Haën, Seelze)
- Natriumtartrat (Merck, Darmstadt)  
im Exsikkator über Schwefelsäure (50 g / 100 g) aufbewahrt

### Durchführung

25 ml Solvent werden im Probengefäß der Apparatur vorgelegt und mit dem Titrant austitriert (Konditionieren). Danach gibt man schnell 0,2 g der Probe in das Probengefäß und startet die eigentliche Titration. Am Endpunkt der Titration wird der Verbrauch an Titrant automatisch angezeigt.

Zur Berechnung des Wassergehaltes der Probe wird der Titer der Titrationslösung durch Titration einer bekannten Menge Natriumtartrat (theoretischer Wassergehalt: 15,66 g / 100 g) bestimmt (Gleichung 9). Der Wassergehalt der Probe kann dann leicht aus dem Verbrauch an Titrant und der Einwaage berechnet werden (Gleichung 10).

**Gleichung 9:**

$$f_T = \frac{m(\text{NaTartrat}) \cdot 15,66}{100 \cdot v(\text{Titrant})}$$

$f_T$ : Titer der Titrationslösung in mg Wasser / ml Titrant

$m(\text{NaTartrat})$ : Einwaage Natriumtartrat in mg

$v(\text{Titrant})$ : Verbrauch an Titrant in ml

**Gleichung 10:**

$$c = \frac{f_T \cdot v(\text{Probe})}{m(\text{Probe})} \cdot 100$$

$c$ : Wassergehalt in g / 100 g

$f_T$ : Titer der Titrationslösung in mg Wasser / ml Titrant

$m(\text{Probe})$ : Einwaage der Probe in mg

$v(\text{Probe})$ : Verbrauch an Titrant für die Probe in ml

## 8 Literatur

- [1] **Maillard, L.-C.**,  
Action des aminés sur les sucres; formation des mèlanoïdines par voie méthodique  
Comptes rendus, 154 (1912) S. 66-68
- [2] **Eichner K.**,  
Indikatoren für beginnende qualitative Veränderungen von Lebensmitteln  
Deutsch. Lebensm. Rundsch., 69 (1973) S. 4-10
- [3] **Baltes W.**,  
Reaktionen vom Maillard-Typ in Lebensmitteln  
Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie, 40 (1986) S. 49-54
- [4] **Hodge J. E.**,  
Chemistry of Browning Reactions in Model Systems  
J. Agric. Food Chem., 1 (1953) S. 928-943
- [5] **Hodge J. E., Rist C. E.**,  
The Amadori Rearrangement under New Conditions and its Significance for Non enzymatic Browning Reactions  
J. Am. Chem. Soc., 75 (1952) S. 316ff
- [6] **Ledi F., Schleicher E.**,  
Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper  
Angewandte Chemie, 102 (1990) S. 597-626
- [7] **Westphal G., Kroh L.**,  
Zum Mechanismus der "frühen Phase" der Maillard-Reaktion 1. Mitt. Einfluß der Struktur des Kohlenhydrats und der Aminosäure auf die Bildung des N-Glycosides  
Die Nahrung, 29 (1985) S. 757-764
- [8] **Amadori, M.**,  
Condensation products of glucose with p-toluidine  
Atti R. Accad. Lincei (Roma), 13 (1931) S. 72
- [9] **Weygand F.**,  
Über N-Glycoside. II. Amadori-Umlagerungen  
Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 73 (1940) S. 1259-1278
- [10] **Angrick M., Rewicki D.**,  
Die Maillard-Reaktion  
Chemie in unserer Zeit, 5 (1980) S. 149-156
- [11] **Westphal G., Kroh L.**,  
Zum Mechanismus der "frühen Phase" der Maillard-Reaktion 2. Mitt. Folgereaktionen von N-Glycosiden  
Die Nahrung, 29 (1985) S. 765-775
- [12] **Baltes W.**,  
Maillardreaktion in Lebensmitteln  
Lebensmittelchemie, 47 (1993) S. 9-14
- [13] **Yaylayan V. A., Huyghues-Despointes A.**,  
Chemistry of Amadori Rearrangement Products: Analysis, Synthesis, kinetics, Reactions and Spectroscopic Properties  
Critical reviews in Food Science and Nutrition, 34 (4) (1994) S. 321-369
- [14] **O'Brien J., Labuza T. P.**,  
Research Provides New Insights into Non-enzymatic Browning Reactions  
in "Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health" ed.: Labuza, T. P. et. al., The Royal Chemistry Society, Cambridge, 1993, S. 402-408
- [15] **Ahmed M. U., Thorpe S. R., Baynes J. W.**,  
Identification of N-carboxymethyllysine as a Degradation product of Fructoselysine in glycated Protein  
J. Biol. Chem., 261 (1986) S. 4889-4894
- [16] **Ahmed M. U., Dunn J. A., Walaa M. D., et al.**,  
Oxidative Degradation of Glucose Adducts to Protein  
J. Biol. Chem., 263 (1988) S. 8816-8821
- [17] **Yaylayan V. A., Huyghues-Despointes A.**,  
Identification of per-O-(trimethylsilyl)derivatives of aldoses generated from thermal decomposition of N-(1-deoxy-D-fructopyranos-1-yl)proline: reversibility of the Amadori rearrangement  
Carbohydrate Research, 286 (1996) S. 179-187
- [18] **Beck J., Ledi F., Severin T.**,  
Formation of 1-deoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose from Amadori compounds  
Carbohydrate Research, 177 (1988) S. 240-243
- [19] **Anet E. F. L. J.**,  
3-Deoxyhexosones  
J. Am. Chem. Soc., 82 (1960) S. 1502

- [20] **Yim H.-S., Kang S.-O., Hah Y.-C., Chock P. B., Yim M. B.,**  
Free Radicals Generated during the Glycolation Reaction of Amino Acids by Methylglyoxal  
*J. Biol. Chem.*, 270 (1995) S. 28228-28233
- [21] **Kawakishi S., Tsunehiro J., Uchida K.,**  
Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion  
*Carbohydrate Research*, 211 (1991) S. 167-171
- [22] **Namiki M., Hayashi T.,**  
Development of Novel Free Radicals during the Amadori-Carbonyl Reaction of Sugars with Amino Acids  
*J. Agric. Food Chem.*, 23 (3) (1975) S. 487-491
- [23] **Cheng R. Z., Kawakishi S.,**  
Selective Degradation of Histidine Residue Mediated by Copper(II)-Catalyzed Autoxidation of Glycated Peptide (Amadori Compound)  
*J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) S. 361-365
- [24] **Cheng R. Z., Kawakishi S.,**  
Novel Decomposition of Amadori Compound Catalyzed by Copper Ion  
*J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) S. 700-703
- [25] **Wittmann R.,**  
Bildung und Nachweis von Amadori- und Heyns-Umlagerungsprodukten in Lebensmitteln  
Dissertation, WWU-Münster, 1987
- [26] **Hirsch J., Mossine V. V., Feather M. S.,**  
The detection of some dicarbonyl intermediates arising from the degradation of Amadori compounds (the Maillard reaction)  
*Carbohydrate Research*, 273 (1995) S. 171-177
- [27] **Seidel W., Pischetsrieder M.,**  
Reaction of guanosine with glucose under oxidative conditions  
*Biorganic & Medical Chemistry Letters*, 8 (1998) S. 2017-2022
- [28] **Wolff S. P., Dean R. T.,**  
Glucose autoxidation and protein modification - The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes  
*Biochem. J.*, 245 (1987) S. 243-250
- [29] **Wells-Knecht K. J., Zyzak D. V., Litchfield J. E., Thorpe S. R., Baynes J. W.,**  
Mechanism of Autoxidative Glycosylation: identification of Glyoxal and Arabinose as Intermediates in the Autoxidative Modification of proteins and Glucose  
*Biochemistry*, 34 (1995) S. 3702-3709
- [30] **Den Drijver L., Holzapfel C. W., Van Der Linde H. J.,**  
HPLC-Determination of D-arabino-Hexos-2-ulose (D-Glucosone) in Irradiated Sugar Solutions: Application of the Method to Irradiated Mango  
*J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) S. 758-762
- [31] **Niemand J. G., Den Drijver L., Pretorius C. J., et al.,**  
A Study of the Mutagenicity of irradiated Sugar Solutions: Implications for the Radiation Preservation of Subtropical Fruits  
*J. Agric. Food Chem.*, 31 (1983) S. 1016-1020
- [32] **Namiki M.,**  
Chemistry of Maillard Reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of Antioxidants and mutagens  
*Advances in Food Research*, 32 (1988) S. 115-184
- [33] **Namiki M., Hayashi T.,**  
A New Mechanism of the Maillard Reaction Involving Sugar Fragmentation and Free Radical Formation  
in "The Maillard-Reaction in Foods and Nutrition", ACS, Washington DC, ACS 215 (1983) S. 21-46
- [34] **Hofmann T., Bors W., Stettmaier K.,**  
Studies on Radical Intermediates in the Early Stage of the Nonenzymatic Browning Reaction of Carbohydrates and Amino Acids  
*J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) S. 379-390
- [35] **Hayashi K., Ohta Y., Namiki M.,**  
Electron Spin Resonance Spectral Study on the Structure of the Novel Free Radical products Formed by the Reactions of Sugars with Amino Acids or Amines  
*J. Agric. Food Chem.*, 25 (6) (1977) S. 1282-1287
- [36] **Hofmann T., Bors W., Stettmaier K.,**  
Radical-Assisted melanoidin Formation during Thermal Processing of Foods as well as under Physiological Conditions  
*J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) S. 391-396
- [37] **Weenen H.,**  
Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry  
*Food Chemistry*, 62 (4) (1998) S. 393-401

- [38] **Severin T., Hiebl J., Popp-Ginsbach H.,**  
Untersuchungen zur Maillard-Reaktion: XX. Nachweis von Glycerinaldehyd, Dihydroxyaceton und anderen hydrophilen Zuckerabbauprodukten in Caramellisierungsgemischen  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 178 (1984) S. 284-287
- [39] **Shibamoto T., Bernhard R. A.,**  
Effect of Time, temperature, and Reactant Ratio on Pyrazine Formation in Model Systems  
J. Agric. Food Chem., 24 (1976) S. 847-851
- [40] **Shibamoto T., Bernhard R. A.,**  
Investigation of Pyrazine Formation Pathways in Sugar-Ammonia Model Systems  
J. Agric. Food Chem., 25 (1977) S. 609-614
- [41] **Yaylayan V. A., Kaminsky E.,**  
Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system  
Food Chemistry, 63 (1) (1998) S. 25-31
- [42] **Ames J. M.,**  
Applications of the Maillard reaction in the food industry  
Food Chemistry, 62 (4) (1998) S. 431-439
- [43] **Schreier P.,**  
Isolierung von Aromastoffen. - Entscheidender Schritt bei der Analyse von Lebensmittelaromen  
Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie, 41 (1987) S. 25-34
- [44] **Schreier P.,**  
Advances in the instrumental analysis of food flavours  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 180 (1985) S. 1-14
- [45] **Kawakishi S., Cheng R. Z., Sato S., Uchida K.,**  
Biomimic Oxidation of Glycated Protein and Amadori Product  
in "Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health" ed.: Labuza, T. P. et. al., The Royal Chemistry Society, Cambridge, 1993, S. 281-285
- [46] **Hollnagel A, Kroh L W,**  
Formation of  $\alpha$ -dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions  
Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 207 (1998) S. 50-54
- [47] **Takagi M., Ono S., et al.,**  
Determination of Carbonyl Groups in Starches by Polarographic techniques Using o-Phenylendiamine I. Reactions of o-Phenylendiamine with Mono- and Disaccharides  
Die Stärke, 20 (1968) S. 215-224
- [48] **Takagi M., Ono S., et al.,**  
Determination of Carbonyl Groups in Starches by Polarographic techniques Using o-Phenylendiamine II. Effect of Sodium Sulfite on Reactions of Oligosaccharides with o-Phenylendiamine  
Die Stärke, 20 (1968) S. 251-256
- [49] **Takagi M., Ono S., et al.,**  
Determination of Carbonyl Groups in Starches by Polarographic techniques Using o-Phenylendiamine III. Separation of 2-Methylquinoxaline from Reaction Mixtures by Extraction or Chromatographic Techniques  
Die Stärke, 20 (1968) S. 283-288
- [50] **Reutter M., Eichner K.,**  
Separation and determination of Amadori compounds by high pressure liquid chromatography and post column reaction  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 188 (1989) S. 28
- [51] **Morita N., Takagi M.,**  
Browning Reaction and Quinoxaline Formation from Carbohydrates  
in "Developments in Food Science 13: Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems"  
ed.: Fujimaki M., Namiki M., Kato H., Kodansha Ltd., Tokyo, 1986, S. 59-65
- [52] **Verhagen L. C., de Jong R. L., Strating J.,**  
Analysis of vicinal diketones in beer by High-Performance Liquid Chromatography  
Proceedings of the European Brewery Convention  
IRL-Press Ltd., Oxford, 1987, S. 615-622
- [53] **Nedvidek W., Ledl F., Fischer P.,**  
Detection of 5-hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 194 (1992) S. 222-228
- [54] **Funcke W., von Sonntag C.,**  
*Syn* and *anti* forms of some monosaccharide O-methyl oximes: a  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. and g.l.c. study  
Carbohydrate Research, 69 (1979) S. 247-251
- [55] **Petersson G.,**  
Gas-chromatographic analysis of sugars and related hydroxy acids as acyclic oxime and ester trimethylsilyl derivatives  
Carbohydrate Research, 33 (1974) S. 47-61

- [56] **Zürcher K., Hadorn H.,**  
Versuche zur Herstellung und gaschromatographischen Trennung der Zucker-Silyläther  
Deutsch. Lebensm. Rundsch., 70 (1974) S. 425-431
- [57] **Beck J., Ledl F., Severin T.,**  
Formation of glucosyl-deoxyosones from Amadori compounds of maltose  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 188 (1989) S. 118-121
- [58] **Blois M. S.,**  
Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical  
Nature, 181 (1958) S. 1199f
- [59] **Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C.,**  
Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity  
Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 28 (1995) S. 25-30
- [60] **Cämmerer B., Kroh L. W.,**  
Investigations of the contribution of radicals to the mechanism of the early stage of the Maillard reaction  
Food Chemistry, 57 (2) (1996) S. 217-221
- [61] **Bär F., Berndt A., Dimroth K.,**  
ESR-Spektroskopie organischer Radikale  
in "Physikalische Methoden in der Chemie", VCH, Weinheim, 1. Auflage, 1985, S. 95-119
- [62] **Kirmse R.,**  
ESR-Spektroskopie  
Akademie-Verlag, Berlin, 1. Auflage, 1985
- [63] **Atkins P. W.,**  
Physikalische Chemie  
VCH, Weinheim, 1. Auflage, 1987, S. 498ff
- [64] **Berliner L. J. (ed.),**  
Biological Magnetic Resonance - Volume 14 - Spin Labeling The Next Millenium  
Plenum Press, New York, 1. Auflage, 1998
- [65] **Root K. S., Hill C. L., Lawrence L. M., Whitesides G. M.,**  
The Mechanism of Formation of Grignard Reagents: Trapping of Free Alkyl Radical Intermediates by Reaction with Tetramethylpiperidine-N-oxyl  
J. Am. Chem. Soc., 111 (1989) S. 5405-5412
- [66] **Barton, D. H. R., Gloahec V. N. L., Smith J.,**  
Study of a New Reaction: Trapping of Peroxyl Radicals by TEMPO  
Tetrahedron Letters, 39 (1998) S. 7483-7486
- [67] **Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J.,**  
Spin Trapping. Kinetics of the Reaction of Superoxide and Hydroxyl radicals with Nitrones  
J. Am. Chem. Soc., 102 (1980) S. 4994-4999
- [68] **Ueda J., Saito N., Ozawa T.,**  
ESR Spin Trapping Studies on the Reactions of Hydroperoxides with Cu(II) Complex  
J. Inorg. Biochem., 64 (1996) S. 197-206
- [69] **Yamaguchi F., Yoshimura Y., Nakazawa H., Ariga T.,**  
Free Radical Scavenging Activity of Grape Seed Extract and Antioxidants by Electron Spin Resonance Spectrometry in an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH/DMSO System  
J. Agric. Food Chem., 47 (1999) S. 2544-2548
- [70] **Davies M. J., Slater T. F.,**  
Studies on the metal-ion and lipoxygenase-catalysed breakdown of hydroperoxides using electron-spin-resonance spectroscopy  
Biochem. J., 245 (1987) S. 167-173
- [71] **Zang L., Stone K., Pryor W. A.,**  
Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance  
Free Radical Biology & Medicine, 19 (1995) S. 161-167
- [72] **Ródio R. T., Pereira E. M., Tavares M. F. M., da Costa Ferreira A. M.,**  
Kinetics of the degraditive oxidation of sugar-type ligands catalyzed by copper(II) ions  
Carbohydrate Research, 315 (1999) S. 319-329
- [73] **Huber B., Ledl F.,**  
Formation of 1-Amino-1,4-dideoxy-2,3-hexodiuloses and 2-aminoacetylfurans in the Maillard reaction  
Carbohydrate Research, 204 (1990) S. 215-220
- [74] **Yaylayan V. A., Sporns P.,**  
Diagnostic Ion Series for the Identification of Amadori Rearrangement Products by MS Techniques Based on Electron-Impact Ionization  
J. Agric. Food Chem., 37 (1989) S. 978-981
- [75] **Glomb M A, Pfahler C,**  
Synthese eines bedeutenden Maillard-Intermediates beim Abbau von Hexosen  
Lebensmittelchemie, 53 (1999) S. 16-17
- [76] **Khadem H. El, Horton D., Meshreki M. H. , Nashed M. A.,**  
Bis(arylhyazones) of 3-Deoxyaldos-2-ulosos  
Carbohydrate Research, 22 (1972) S. 381-389

- [77] **Anet E. F. L. J.,**  
3-Deoxyglycosuloses (3-Deoxyglycosones) and the Degradation of Carbohydrates  
Adv. Carbohydrate Chem., 19 (1964) S. 181-218
- [78] **Feather M. S., Madson M. A.,**  
An improved preparation of 3-deoxy-*erythro*-hexos-2-ulose via the bis(benzoylhydrazone) and some related constitutional studies  
Carbohydrate Research, 94 (1981) S. 183-191
- [79] **Bayne S.,**  
Section IX. Article 106: Aldosuloses (Osones)  
Methods Carbohydr. Chem., 2 (1963) S. 421-423
- [80] **DeJongh D. C., et al.,**  
Analysis of Trimethylsilyl Derivates of Carbohydrates by Gas-Chromatography and Mass Spectrometry  
J. Am. Chem. Soc., 91 (1969) S. 1728-1740
- [81] **Laine R. A., Sweeley C. C.,**  
O-methyl oximes of sugars. Analysis as O-trimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry  
Carbohydrate Research, 27 (1973) S. 199-213
- [82] **Hesse M., Meier H., Zeeh. B.,**  
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie  
Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 1995
- [83] **Volkman H.,**  
Handbuch der Infrarot-Spektroskopie  
Verlag Chemie, Weinheim, 1972
- [84] **Holleman A. F., Wiberg E.,**  
Lehrbuch der Anorganischen Chemie  
de Gruyter, Berlin, 91. - 100. Auflage, 1985, S. 467
- [85] **Kawakishi S., Nasu S., Cheng R. Z., Osawa T.,**  
Glucosone as a Radical-Generating Intermediate in the Advanced Maillard Reaction  
in "Chemical Markers for Processed and Stored Foods" ed.: Lee T.-C., Kim H. J., American Chemical Society, Washington DC, ACS 631, 1996, S. 77-84
- [86] **Wells-Knecht M. C., Thorpe S. R., Baynes J. W.,**  
Pathways of Formation of Glycoxidation products during Glycation of Collagen  
Biochemistry, 34 (1995) S. 15134-15141
- [87] **Rendleman J. A., Inglett G. E.,**  
The influence of Cu<sup>2+</sup> in the Maillard reaction  
Carbohydrate Research, 201 (1990) S. 311-326
- [88] **Sillen L. G.,**  
Stability Constants, Supplement No. 1  
The Chemical Society, London, 1971
- [89] **Meites L.,**  
Polarographic Studies of Metal Complexes. II. The Copper(II) Citrates  
J. Am. Chem. Soc., 72 (1950) S. 180-189
- [90] **Jander G., Blasius E.,**  
Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum  
S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 14. Auflage (1995)
- [91] **Bell L. N.,**  
Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration  
Food Chemistry, 59 (1997) S. 143-147
- [92] **O'Brien J., Morrissey P. A.,**  
Metal ion complexation by products of the Maillard reaction  
Food Chemistry, 58 (1-2) (1997) S. 17-27
- [93] **Nienaber U.,**  
Untersuchungen über die autoxidative Wirkung von Produkten der Maillard-Reaktion in Modellsystemen und gerösteten Haselnüssen  
Dissertation, WWU-Münster, 1994
- [94] **Mahoney jr. J. R., Graf E.,**  
Role of Alpha-Tocopherol, Ascorbic Acid, Citric Acid and EDTA as Oxidants in Model Systems  
J. Food Sci., 51 (1986) S. 1293-1296
- [95] **Westphal G., Kroh L., Föllmer U.,**  
Untersuchungen zur Maillard-Reaktion 16. Mitt. Zur Reaktivität von Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit vom Reaktionsmilieu  
Die Nahrung, 32 (1988) S. 117-120
- [96] **Belitz H. D., Grosch W.,**  
Lehrbuch der Lebensmittelchemie  
Springer-Verlag, Berlin, 4. Auflage, 1992, S. 233, 241f

- [97] **Eichner K.**,  
The Influence of Water Content on Non-enzymatic Browning Reactions in Dehydrated Foods and Modell Systems and the Inhibition of Fat Oxidation by Browning Intermediates  
in "Water Relations Of Food" Duckworth R. B., Academic Press, London, 1997, S. 417 ff
- [98] **Rockland L. B.**,  
Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40°C  
Analytical Chemistry, 32 (1960) S. 1375-1376
- [99] **Labuza T. P.**,  
Oxidative Changes in Foods at Low and Intermediate Moisture Levels  
in "Water Relations Of Food" Duckworth R. B., Academic Press, London, 1997, S. 455 ff
- [100] **Karel M.**,  
Free Radicals in low moisture systems  
in "Water Relations Of Food" Duckworth R. B., Academic Press, London, 1997, S. 435 ff
- [101] **Rojas A. M., Gerschenson L. N.**,  
Ascorbic Acid Destruction in Sweet Aqueous Model Systems  
Lebensm.-Wiss. U.-Technol., 30 (1997) S. 567-572
- [102] **Pieper G.**,  
Das Abbauverhalten von Ascorbinsäure in Modellsystemen und Lebensmitteln  
Dissertation, WWU-Münster, 1988
- [103] **Spanyár P., Kevei E.**,  
Über die Stabilisierung von Vitamin C in Lebensmitteln  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., 120 (1963) S. 1-17
- [104] **Belitz H. D., Grosch W.**,  
Lehrbuch der Lebensmittelchemie  
Springer-Verlag, Berlin, 4. Auflage, 1992, S. 805-818
- [105] **Narziss L., Schuster K., Weinfurtn F.**,  
Die Bierbrauerei – Band 1: Die Technologie der Malzbereitung  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, 1976
- [106] **Narziss L.**,  
Abriß der Bierbrauerei  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, 1972
- [107] **Schuster K.**,  
Die Bierbrauerei – Band 2: Die Technologie der Würzebereitung  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 1968
- [108] **Mahdi A. A., Rice A. C., Weckel K. G.**,  
Formation of Pyrrolidincarboxyl Acid in Processed Fruit nad Vegetable Products  
J. Agric. Food Chem., 7 (1959) S. 712-714
- [109] **Ledi F.**,  
Analytik flüchtiger Zuckerabbauprodukte  
Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie, 41 (1987) Seiten 83-87
- [110] **Souci S. W., Fachmann W., Kraut H.**,  
Die Zusammensetzung der Lebensmittel  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 4. Auflage, 1989
- [111] **Van den Ouweland G. A. M., Peer H. G.**,  
Synthesis of 3,5-dihydroxy-2-methyl-5,6-dihydro-pyran-4-one from aldohexoses and secondary amine salts  
Rec. Trav. Chim., 89 (1970) S. 750ff
- [112] **Merck-Broschüre**,  
Laborprodukte für die Praxis – Puffer  
Merck, Darmstadt
- [113] **Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG**,  
Allgemeiner Teil – Statistik  
Bundesgesundheitsamt, Band I (Stand März 97)
- [114] **Doerffel K.**,  
Statistik in der analytischen Chemie  
Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage, 1984
- [115] **Gratzfeld-Huesgen A.**,  
Sensitive and Reliable Amino Acid Ananlysis in Protein Hydrolysates using the HP 1100 Series HPLC  
Hewlett-Packard - Firmenschrift, 1998



## 9 Anhang

### 9.1 Verwendete Abkürzungen

Für die Monosaccharide und die Aminosäuren werden in Abbildungen und Tabellen die üblichen Drei-Buchstaben-Abkürzungen verwendet

Fru-Ala ..... Amadori-Verbindung: Fructose-Alanin

Dementsprechend setzen sich die Abkürzungen für die anderen Amadori-Verbindungen aus Glucose und der jeweiligen Aminosäure aus der Abkürzung für Fructose und der Aminosäure zusammen

1-DHQ ..... 1-Desoxyoson-chinoxalin (2-Methyl-3-(1',2',3'-trihydroxypropyl)-chinoxalin)

3-DHQ ..... 3-Desoxyoson-chinoxalin (2-(2',3',4'-Trihydroxybutyl)-chinoxalin)

aTBQ ..... D-*arabino*-Tetrahydroxybutyl-chinoxalin (D-Glucoson-chinoxalin)

BSA ..... N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid

bsa ..... Rinderserum Albumin (bovine serum albumin)

CMG ..... N<sup>ε</sup>-Carboxymethylguanosid

CML ..... N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin

CROSSPY ... 1,4-bis(5-amino-5-carboxy-1-pentyl)pyrazinradikal-Kation

DHM ..... 2,3-Dihydro-3-hydroxymaltol

DMPO ..... 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid

DMPO-OH ... DMPO-Addukt des Hydroxylradikals

DPPH• ..... 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Radikal

DPPH-H ... 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin, reduziert

EDTA ..... Ethylendiamin-tetraessigsäure

FPCA ..... Fructose-Pyrrolidoncarbonsäure

gAba ..... γ-Aminobuttersäure

HMF ..... 5-Hydroxymethylfurfural

ISTD ..... innerer Standard

LL ..... 3-(N<sup>ε</sup>-Lysino)-Milchsäure

Malt ..... Maltose

OPA ..... o-Phthalaldehyd

oPhD ..... o-Phenylendiamin

ROS ..... *reactive oxygen species*

RT ..... Raumtemperatur

Sacc ..... Saccharose

TCTFE ..... 1,1,2-Trichlortrifluorethylen

TMCS ..... Trimethylchlorsilan

## 9.2 MS-Spektren

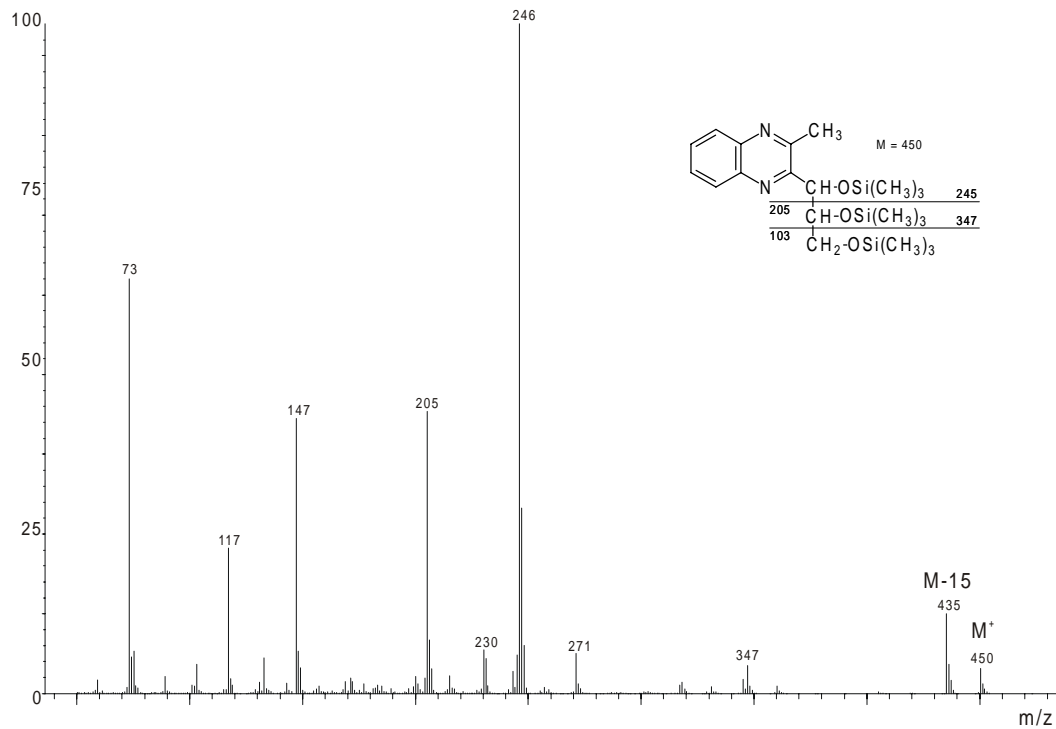


Abbildung 70: Massenspektrum des silylierten 1-Desoxyoson-chinoxalins

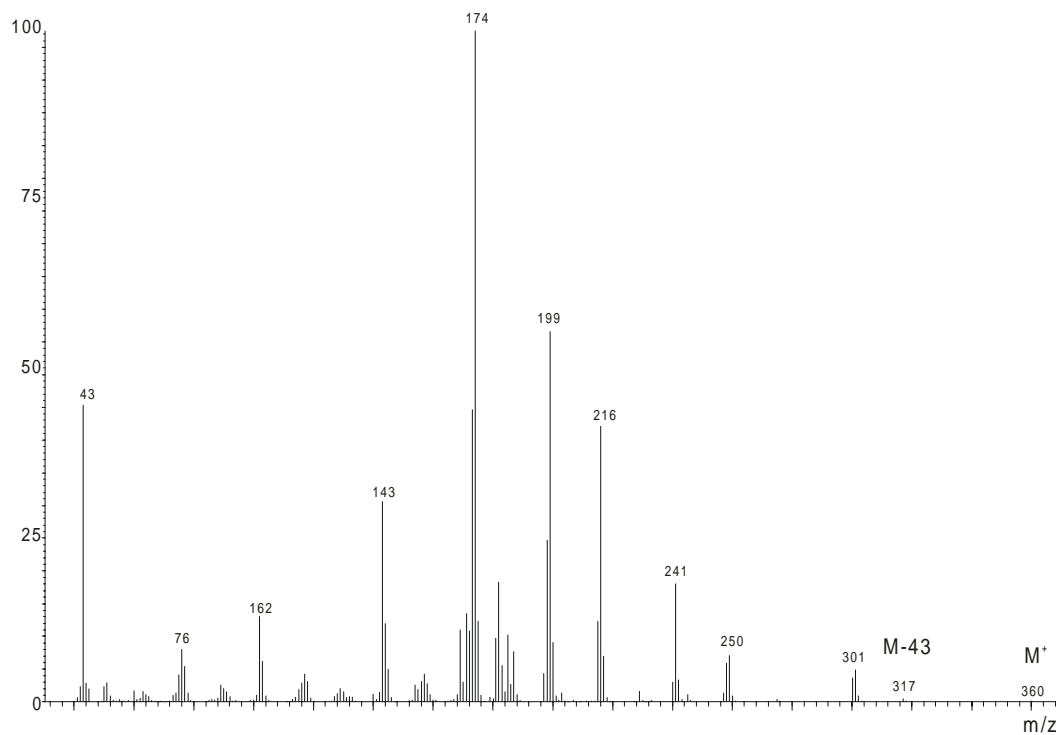


Abbildung 71: Massenspektrum des acetylierten 1-Desoxyoson-chinoxalins

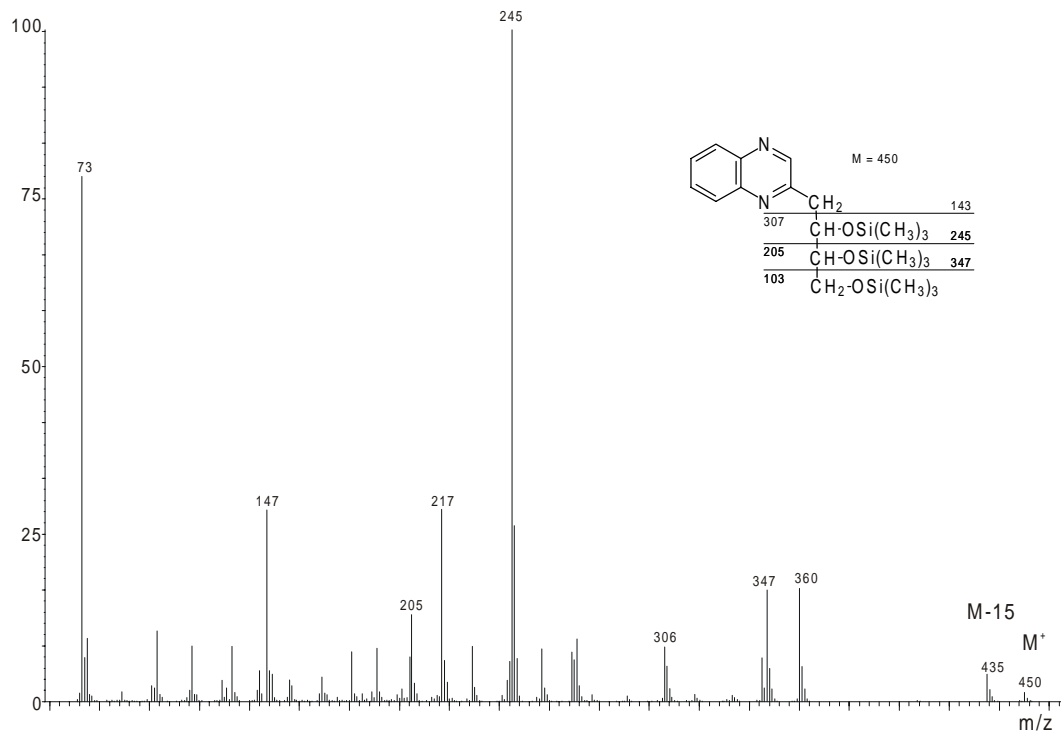


Abbildung 72: Massenspektrum des silylierten 3-Desoxyoson-chinoxalins

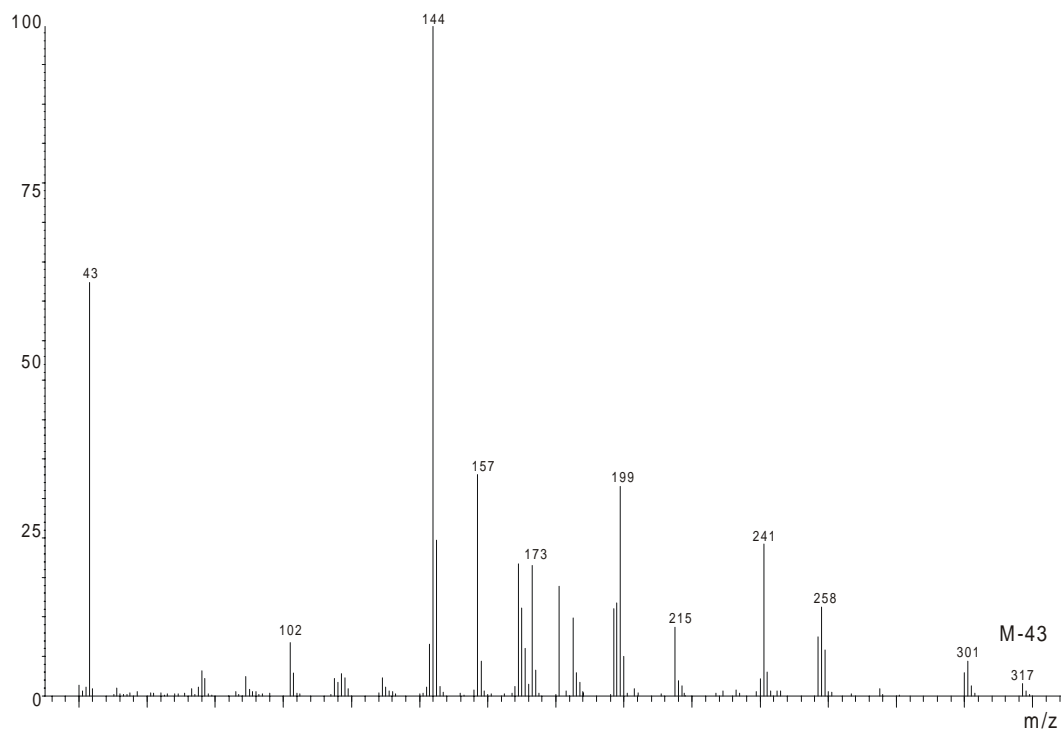


Abbildung 73: Massenspektrum des acetylierten 3-Desoxyoson-chinoxalins

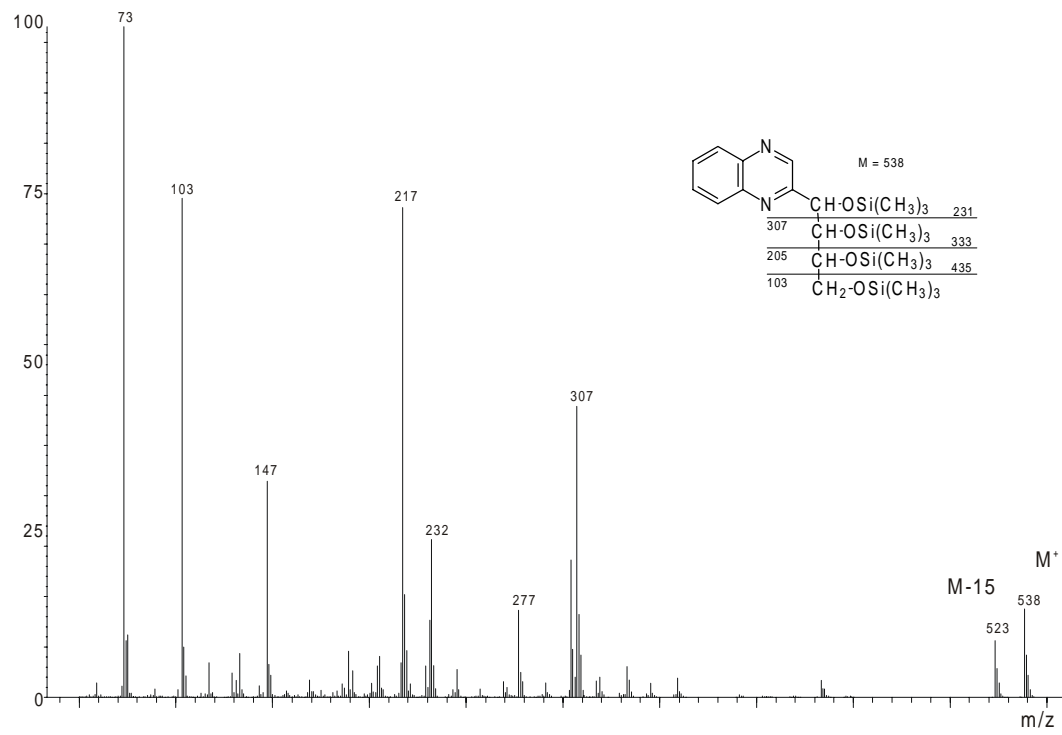


Abbildung 74: Massenspektrum des silylierten D-Glucoson-chinoxalins

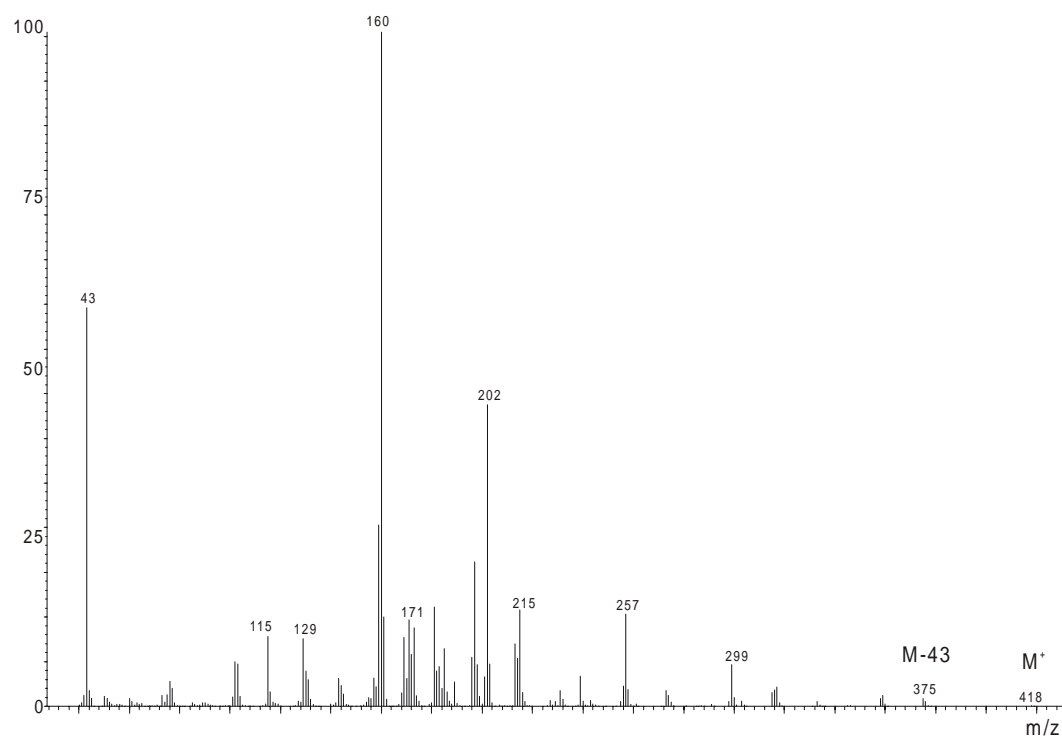


Abbildung 75: Massenspektrum des acetylierten D-Glucoson-chinoxalins

### 9.3 FT-IR-Spektren

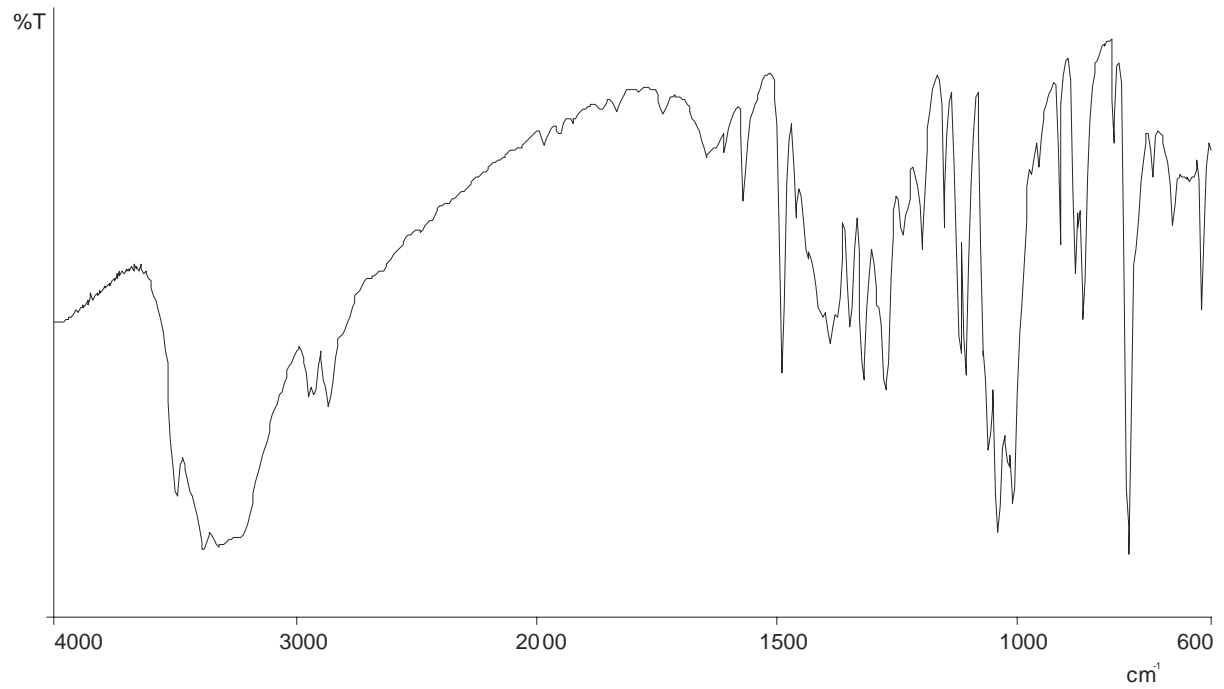


Abbildung 76: FT-Infrarot-Spektrum des 1-Desoxyoson-chinoxalins

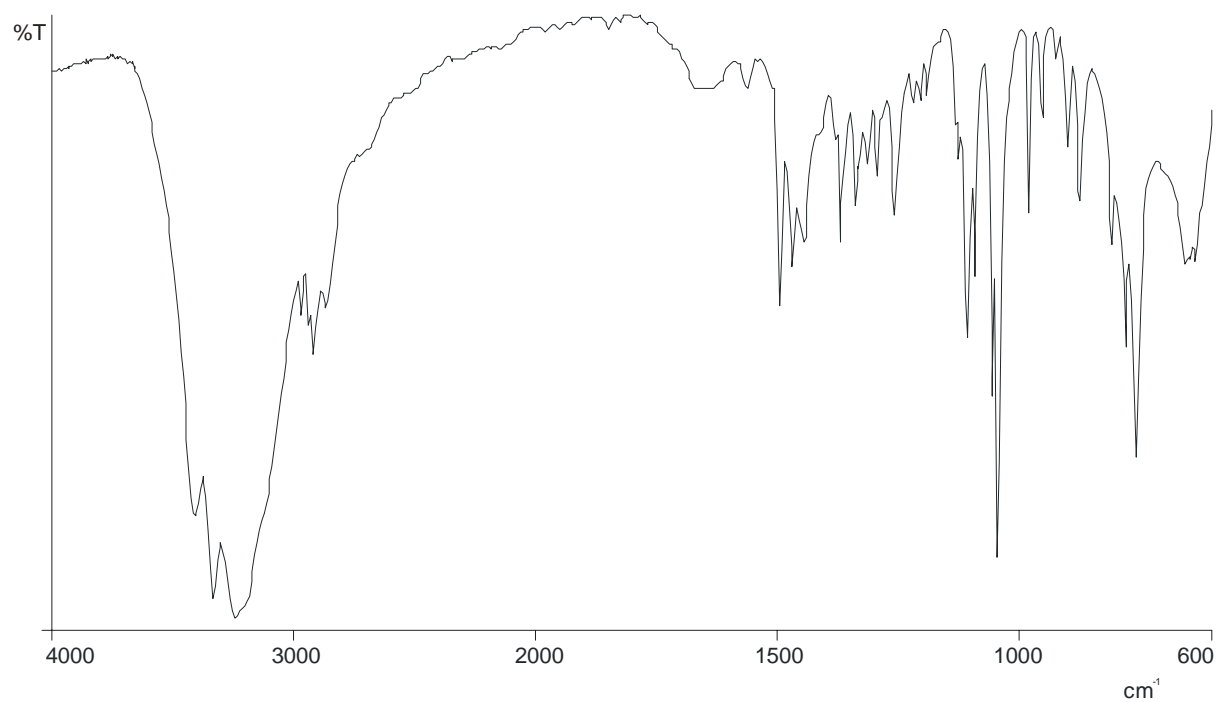
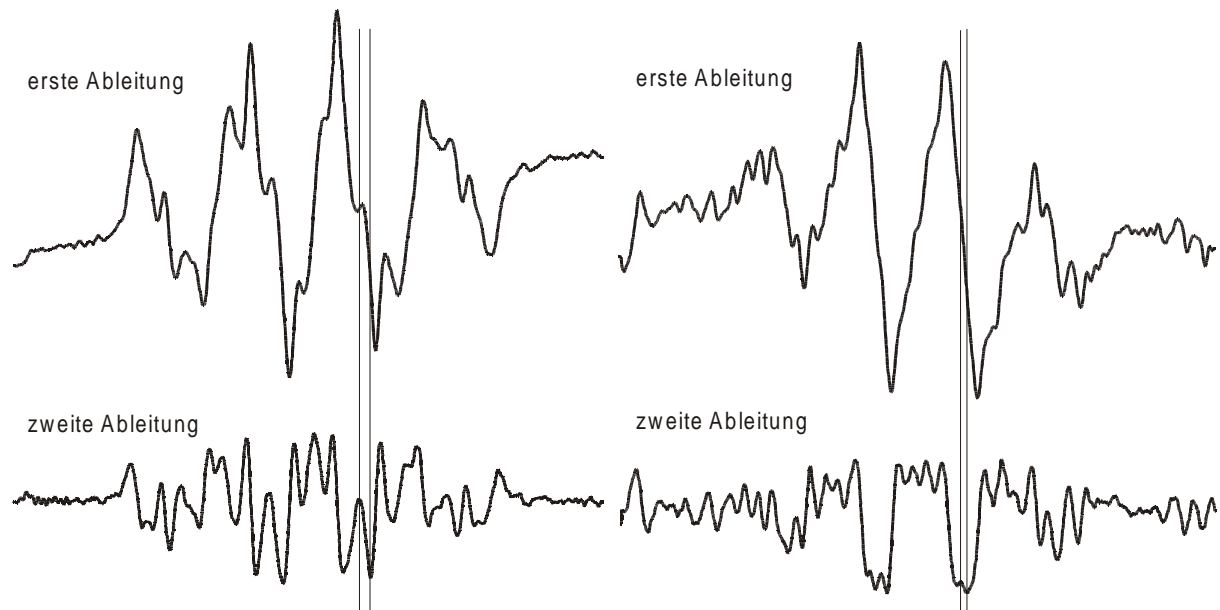


Abbildung 77: FT-Infrarot-Spektrum des D-Glucoson-chinoxalins

## 9.4 ESR-Spektren



**Abbildung 78:** ESR-Spektren der DMPO-Addukte einer bestrahlten Fructose-Alanin Lösung (links) und einer Lösung unter Kupfer-Katalyse (rechts). Dargestellt ist die erste und zweite Ableitung der Intensität nach der Feldstärke B.

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K. Eichner danke ich für die Überlassung des Themas und die ständige Bereitschaft zur Diskussion - und dafür, daß alle seine Anregungen wirklich als Anleitungen zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten zu verstehen sind.

Herrn Dr. Wiezorek danke ich für die Hilfestellung bei der Aufnahme und der Auswertung der ESR-Spektren im CVUA, Münster. In diesem Sinne gilt mein Dank auch Frau Karin Laerbusch und ihren Zivis, die immer eine Ecke in ihrem Labor für mich frei hatten.

Der Bergischen Löwen-Brauerei GmbH & Co. KG danke ich für die Überlassung des hellen Darrmalzes (5 kg waren mehr als genug!).

Herrn Dr. M. Lange-Aperdanner und Herrn Daniel Feldhaus möchte ich für die aufwendige Betreuung des Netzwerkes im Institut danken. Ohne ein funktionierendes Computer-System wäre diese Arbeit nicht denkbar.

server quit ;-)





## Lebenslauf

---

### Ralf Liedke

geboren am 27.12.1968

in Münster

verheiratet

---

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Eltern:</b>                  | Georg Liedke<br>Elli Liedke, geb. Reißberg   |
| <b>Schulbildung:</b>            | August 1975 - Juli 1979<br>Bodelschwingh-Grundschule, Münster<br>August 1979 - Juni 1988<br>Ratsgymnasium, Münster   |
| <b>Hochschulreife:</b>          | 31.05.1988   |
| <b>Studium:</b>                 | 14.09.1988 - 07.06.1993<br>Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-<br>Universität Münster  |
| <b>Promotionsstudiengang:</b>   | Beginn: 12.03.1996   |
| <b>Praktisches Jahr:</b>        | 01.08.1993 - 31.07.1994<br>Jahrespraktikum am Chemischen Landes- und Staatlichen<br>Veterinäruntersuchungsamt NW   |
| <b>Prüfungen:</b>               | 09.04.1991<br>Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker<br>07.06.1993<br>Erste staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker<br>14.09.1994<br>Zweite staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker        |
| <b>Ersatzdienst:</b>            | 02.11.1994 - 31.01.1996<br>als Zivildienstleistender im Institut für Arbeitsmedizin der<br>Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  |
| <b>Tätigkeiten:</b>             | 01.03.1996 - 28.02.1998<br>Wissenschaftliche Hilfskraft<br>seit 01.03.1998<br>Wissenschaftlicher Mitarbeiter<br>am Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen<br>Wilhelms-Universität Münster |
| <b>Beginn der Dissertation:</b> | 01.03.1996<br>am Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen<br>Wilhelms-Universität Münster bei Prof. Dr. K. Eichner  |

