

**Quantitative Studien zu Vorkommen und metabolischem Transit  
alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

staatl. gepr. Diplom-Lebensmittelchemikerin Anke Förster  
geboren am 23. August 1974 in Soltau

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. T. Henle  
Prof. Dr. rer. nat. K.-H. van Pée  
Dr. sc. nat. T. Bütler

Eingereicht am: 15.02.2006

Tag der Disputation: 04.07.2006



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b> .....	<b>3</b>
2.1	Bildung ausgewählter Maillard-Reaktions-Produkte (MRPs).....	3
2.1.1	Frühphase der Maillard-Reaktion – Bildung von Amadori-Produkten.....	3
2.1.2	Fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion – Bildung reaktiver Dicarbonylverbindungen .....	4
2.1.3	Finalphase der Maillard-Reaktion – Bildung hoch- und niedermolekularer Endprodukte.....	6
2.1.3.1	Pyrralin .....	6
2.1.3.2	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin (CML).....	8
2.1.3.3	Maltosin.....	10
2.1.3.4	Quervernetzungsprodukte – Pentosidin.....	13
2.2	Maillard-Reaktions-Produkte in Lebensmitteln .....	14
2.2.1	Vorkommen und Bestimmung in Lebensmitteln .....	15
2.3	Maillard-Reaktions-Produkte <i>in vivo</i> .....	20
2.3.1	Analytik von MRPs in physiologischen Medien.....	27
2.3.2	Zusammenhang von MRPs mit Stoffwechselerkrankungen .....	29
2.4	Physiologische Konsequenzen exogener MRP-Quellen .....	34
2.4.1	Resorption, Metabolisierung und Exkretion von Aminosäuren und Proteinen....	35
2.4.2	Resorption und Exkretion von MRPs.....	36
2.4.3	Abbau glykosylierter Proteine <i>in vivo</i> .....	41
2.4.4	Einfluss der Ernährung auf MRP-Gehalte <i>in vivo</i> .....	42
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>46</b>
3.1	Chemikalien.....	46
3.2	Material und Geräte .....	47
3.3	Untersuchungsmaterialien .....	51
3.3.1	Bestimmung von Lysin und Lysinderivaten in Lebensmitteln.....	51
3.3.2	Bestimmung von Pyrralin in Milchprodukten und anderen Lebensmitteln .....	52
3.3.3	Bestimmung von Maltosin in Milchprodukten.....	52
3.4	Ernährungsstudie .....	53

3.5	Statistische Auswertung .....	55
3.5.1	Ausreißertest.....	55
3.5.2	Signifikanzen.....	55
3.6	Synthesen von Referenzmaterialien .....	55
3.6.1	Synthese von N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin.....	55
3.6.1.1	Prüfung auf das Vorhandensein von freien Aminogruppen .....	56
3.6.2	Synthese von N <sup>ε</sup> -Carboxymethylornithin.....	57
3.6.3	Synthese von Isomaltol.....	58
3.6.4	Synthese von N <sup>α</sup> -Hippurylmaltosin.....	59
3.6.5	Synthese von Maltosin .....	62
3.6.6	Gehaltsbestimmung durch Elementaranalyse.....	62
3.6.7	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR).....	62
3.6.8	Massenspektrometrie .....	62
3.7	Analytische Methoden.....	63
3.7.1	Bestimmung des Proteingehaltes nach Kjeldahl .....	63
3.7.2	Hydrolysen .....	64
3.7.2.1	Saure Hydrolyse .....	64
3.7.2.2	Enzymatische Hydrolysen .....	64
3.7.2.3	Bestimmung des Proteolysegrades der enzymatischen Hydrolyse.....	65
3.7.3	Größenausschlussfiltration .....	65
3.7.4	Bestimmung von Fructose- und Lactoselysin als Furosin.....	66
3.7.4.1	Furosin in Lebensmitteln.....	66
3.7.4.2	Furosin im Urin .....	67
3.7.4.3	Berechnung der Amadori-Produkt-Gehalte.....	67
3.7.5	Bestimmung von Pyrralin.....	67
3.7.5.1	Untersuchungen zur Pyrralinbildung während der enzymatischen Hydrolyse ....	68
3.7.5.2	Pyrralin in Lebensmitteln .....	68
3.7.5.3	Pyrralin im Urin.....	69
3.7.5.4	Abschätzung zur Stabilität von Pyrralin im Urin .....	70
3.7.6	Bestimmung von N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin.....	70
3.7.6.1	Kalibration.....	70
3.7.6.2	CML in Lebensmitteln .....	71
3.7.6.3	Freies N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin im Urin.....	73
3.7.7	Bestimmung von Pentosidin.....	74

---

3.7.7.1	Pentosidin in Lebensmitteln .....	74
3.7.7.2	Pentosidin im Urin.....	75
3.7.8	Bestimmung von Maltosin in Lebensmitteln .....	76
3.7.8.1	Referenzlösungen .....	76
3.7.8.2	Probenaufarbeitung.....	76
3.7.8.3	Ionenaustauschchromatographie .....	76
3.7.8.4	Umkehrphasen-HPLC an Polymermaterial (PLRP-HPLC) .....	78
3.7.9	Bestimmung von GOLD und MOLD in Lebensmitteln.....	80
3.7.10	Aminosäureanalyse – Bestimmung von Lysin und Glycin, Nachweis von CML	81
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>82</b>
4.1	Vorkommen von Lysin und Lysinderivaten in Milch und Milchprodukten .....	82
4.1.1	Amadori-Produkt als Lactoselysin .....	82
4.1.2	Lysin und Lysinderivatisierung.....	85
4.1.3	Pyrralin .....	87
4.1.4	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin .....	91
4.1.5	GOLD und MOLD .....	94
4.1.6	Lysinoalanin .....	94
4.1.7	Bilanzierung .....	96
4.1.8	Untersuchungen zum Vorkommen von Maltosin.....	99
4.1.8.1	Synthese von N <sup>α</sup> -Hippurylmaltosin und Maltosin .....	99
4.1.8.2	Bestimmung von Maltosin – Ionenaustauschchromatographie.....	100
4.1.8.3	Bestimmung von Maltosin – Umkehrphasen - HPLC.....	103
4.1.9	Einschätzung zder Relevanz der untersuchten Derivate für die Lysinmodifizierung in Milch und Milchprodukten .....	109
4.2	Untersuchungen zur Exkretion von Lysinderivaten im Urin in Abhängigkeit von der Ernährung .....	111
4.2.1	Testmahlzeiten.....	113
4.2.2	Bestimmung von freiem Amadori-Produkt als Fructoselysin im Urin.....	114
4.2.3	Bestimmung von freiem Pyrralin im Urin.....	116
4.2.3.1	Stabilität von Pyrralin im Urin .....	117
4.2.4	Bestimmung von freiem Pentosidin im Urin.....	119
4.2.5	Bestimmung von freiem N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin im Urin.....	123
4.2.6	Einfluss der Ernährung auf die renale Exkretion ausgewählter freier MRPs.....	127

4.2.7	Renale Exkretion ausgewählter freier MRPs in Abhängigkeit des Verzehrs verschiedener Lebensmittel .....	131
4.2.7.1	Amadori-Produkt .....	131
4.2.7.2	Pyrralin .....	134
4.2.7.3	Pentosidin .....	137
4.2.7.4	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin .....	143
4.2.8	Physiologische Bedeutung alimentärer MRPs .....	145
4.2.8.1	Amadori-Produkt .....	146
4.2.8.2	Pyrralin .....	150
4.2.8.3	Pentosidin .....	151
4.2.8.4	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin .....	152
4.2.8.5	Vergleich der untersuchten alimentären MRPs bezüglich ihrer physiologischen Bedeutung .....	153
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>157</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>161</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGE(s)	advanced glycation endproduct(s)
ALE(s)	advanced lipoxidation endproduct(s)
AP	Amadori-Produkt
ASA	Aminosäureanalyse
AU	arbitrary unit
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
CEL	N <sup>ε</sup> -Carboxyethyllysin
CML	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin
CMO	N <sup>ε</sup> -Carboxymethylornithin
CRP	C-reaktives Protein
DAD	Diodenarraydetektor
3-DF	3-Desoxyfructosulose
3-DG	3-Desoxyglucosulose
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DODIC	Desoxyglucosulose derived imidazolinon crosslink
DOLD	Desoxyglucosulose-Lysin-Dimer
ELISA	Enzyme linked immunosorbend assay
ESI-TOF-MS	electrospray ionization - time of flight - mass spectrometry
et al.	et alii (lat.) – und andere
FFI	2-(2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazolinon
FL	N <sup>ε</sup> -Desoxyfructosyl-1-lysin (Fructoselysin)
Fur	Furosin
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GODIC	Glyoxal derived imidazolinon crosslink
GOLD	Glyoxal-Lysin-Dimer
HipLys	N <sup>α</sup> -Hippuryllysin
HipMal	N <sup>α</sup> -Hippurylmaltosin
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	high pressure liquid chromatography
KD	Kondensmilch
KG	Körpergewicht

## Abkürzungsverzeichnis

---

Krea.	Kreatinin
LacLys	N <sup>ε</sup> -Desoxylactulosyl-1-lysin (Lactoselysin)
LAL	Lysinoalanin
LDL	Low density lipoprotein
MGO	Methylglyoxal
MP	Molkenpulver
MMP	Magermilchpulver
MODIC	Methylglyoxal derived imidazolinon crosslink
MOLD	Methylglyoxal-Lysin-Dimer
MRP(s)	Maillard-Reaktions-Produkt(e)
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduzierte Form
NMR	nuclear magnetic resonance – Kernmagnetische Resonanz
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
past.	pasteurisiert
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLRP	Polymer-Umkehrphase
PM	pasteurisierte Milch
Prot.	Protein
Pyr	Pyrralin
(s)RAGE	(soluble) receptor for advanced glycation endproducts
RP	reversed phase – Umkehrphase
SIM	selected ion monitoring
TFAME	Trifluoressigsäuremethylester
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHT	ultrahecherhitzt
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIS	visible, sichtbar



# 1 Einleitung und Zielstellung

In den letzten Jahren sorgten diverse Lebensmittelskandale, Tierseuchen, die Diskussion um Lebensmittel aus gentechnisch veränderten Organismen, sowie das Aufkommen verschiedener Ernährungsformen dafür, dass die Frage nach Qualität und Sicherheit von Nahrungsmitteln immer weiter in den Blickpunkt des Interesses gerückt ist. Bemessen wird die Qualität am Nähr- aber auch am Genusswert eines Lebensmittels. Für beide Aspekte ist die Maillard-Reaktion, in deren Folge es zur Bildung von Aroma- und Geschmackstoffen aber auch zu Verlusten zum Teil essentieller Aminosäuren wie Lysin kommt, von entscheidender Bedeutung.

Trotz langjähriger Forschungsbemühungen ist es nicht möglich, die bei der Verarbeitung und Lagerung eines Lebensmittels auftretende Lysinderivatisierung vollständig zu erklären. Daten zum Vorkommen einzelner Maillard-Produkte wie N<sup>ε</sup>-Desoxyfructosyl-1-lysin (N<sup>ε</sup>-Fructoselysin) bzw. N<sup>ε</sup>-Desoxylactulosyl-1-lysin (N<sup>ε</sup>-Lactoselysin), N<sup>ε</sup>-Carboxymethyl-lysin (CML) oder 2-Amino-6-(2-Formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-hexansäure (Pyrralin) in ausgewählten Lebensmitteln liegen in der Literatur vor. Für andere Strukturen wie zum Beispiel 2-Amino-6-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-4H-pyridin-1-yl)-hexansäure (Maltosin) wurde die Bildung bislang nur *in vitro* nachgewiesen. Auch eine umfassende Quantifizierung bekannter Derivate im Sinne einer Bilanzierung von Lysinmodifizierung und Derivaten steht noch aus.

Ziel im ersten Teil der vorliegenden Arbeit war es daher, die oben genannten Maillard-Produkte N<sup>ε</sup>-Lactoselysin, CML und Pyrralin sowie die Quervernetzungsprodukte GOLD, MOLD und Lysinoalanin in Milch und Milchprodukten zu bestimmen und der Lysinmodifizierung gegenüber zu stellen, um so eine quantitative Aussage über bisher nicht erfasste Verbindungen zu treffen. Im Anschluss sollte Maltosin in oben genannten Lebensmitteln bestimmt und dessen Beitrag zur Aufklärung der in der Bilanz beobachteten Differenz beurteilt werden. Hierzu war es zunächst nötig, eine entsprechende Referenzsubstanz nach Literaturdaten zu synthetisieren und anschließend eine geeignete Messmethode zu entwickeln.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der physiologischen Relevanz in Nahrungsmitteln enthaltener Maillard-Reaktions-Produkte (MRPs). Gerade in den letzten zwei Jahrzehnten rückten toxikologische und pathophysiologische Aspekte in den Fokus von Forschung und Öffentlichkeit. So stand zum Beispiel das als Karzinogen der Kategorie 3 eingestufte Acrylamid als Maillard-Reaktions-Produkt des Asparagins als produktions- bzw. zubereitungsbedingter Lebensmittelinhaltsstoff mit möglicherweise gesundheitsgefährdendem Potential im Blickpunkt. Auf der anderen Seite finden Produkte der Maillard-Reaktion *in vivo* im Zusammenhang mit alterungs- und stoffwechselbedingten Krankheitsgeschehen großes Interesse. So gilt es als erwiesen, dass Maillard-Produkte durch Proteinquervernetzung an der Eintrübung von Augenlinsen, Versteifung von Gelenken und Geweben sowie Gefäßverengungen beteiligt sind. Erhöhte Gehalte an spezifischen Derivaten wie N<sup>ε</sup>-Fructoselysin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin wurden auch in Serum, Geweben und Urin von Diabetikern und Patienten mit Nierenfunktionsstörungen beobachtet. Unklar ist bislang, ob es sich dabei um eine Ursache oder Folge der Erkrankung handelt.

Auch die Bedeutung täglich durch die Nahrung aufgenommener Aminosäurederivate in Bezug auf pathophysiologische Prozesse wird kontrovers diskutiert. Studien, die sich mit dem Einfluss der Ernährung auf die MRP-Konzentrationen in Plasma und Geweben beschäftigen betrachten die Maillard-Produkte dabei meist in der Gesamtheit. Erhöhung oder Erniedrigung der Gehalte in physiologischen Medien werden häufig über relativ unspezifische Parameter wie die Veränderung der Fluoreszenz erfasst. Eine Unterscheidung zwischen individuellen Reaktionsprodukten erfolgt kaum.

Voraussetzung für Konsequenzen *in vivo* sind zunächst die Freisetzung der im Lebensmittel vorrangig im Proteinverband vorliegenden Aminosäurederivate im Zuge der Verdauung, sowie deren Resorption und Verbleib im Körper. Um Aussagen zur Relevanz individueller alimentärer Maillard-Produkte für das Reaktionsgeschehen *in vivo* treffen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine neuntägige Ernährungsstudie durchgeführt, in deren Verlauf freiwillige Teilnehmer eine Maillard-Produkt-freie Diät bzw. Lebensmittel mit bekannten Gehalten an Maillard-Produkten verzehrten. 24-h-Urinproben wurden über den gesamten Zeitraum gesammelt und bezüglich der täglichen Ausscheidung von Amadori-Produkten, Pyrralin, Pentosidin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin untersucht.

## 2 Theoretischer Teil

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bildung, dem Vorkommen und der Metabolisierung von Lysinderivaten, die vorrangig auf dem Wege der Maillard-Reaktion gebildet werden. Der theoretische Teil orientiert über allgemeine Aspekte der Reaktion sowie über den Stand des Wissens zu Vorkommen und Bedeutung ausgewählter Maillard-Produkte in Lebensmitteln und physiologischen Medien. Der Verlauf der Reaktion wird zunächst allgemein und im Folgenden konkret an ausgewählten Produkten besprochen.

### 2.1 Bildung ausgewählter Maillard-Reaktions-Produkte (MRPs)

Unter dem Begriff „Maillard-Reaktions-Produkte“ (MRPs) wird eine Vielzahl von Verbindungen zusammengefasst, die bei der erstmals von *Louis Camille Maillard (1912)* beschriebenen Reaktion freier Aminogruppen mit den Carbonylfunktionen reduzierender Zucker gebildet werden. Die auch als „nichtenzymatische Bräunung“ bezeichnete Reaktion wurde von *Hodge (1953)* in frühe, fortgeschrittene und Endphase unterteilt. Auf die einzelnen Phasen wird im Folgenden anhand der Bildungsmechanismen für die vorliegende Arbeit relevanter Reaktionsprodukte eingegangen. Einen weiteren Überblick über das Reaktionsgeschehen geben die Reviews von *Mauron (1981)*, *Ledl und Schleicher (1990)* sowie *Friedmann (1996)*.

#### 2.1.1 Frühphase der Maillard-Reaktion – Bildung von Amadori-Produkten

In der Früh- oder Initialphase der Maillard-Reaktion (MR) kommt es nach nukleophiler Addition der freien Aminofunktion von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen an den Carbonylkohlenstoff des reduzierenden Zuckers (Glykosylierung), und anschließender Wassereliminierung zur Bildung instabiler Imine, den Schiffchen Basen. Umlagerungsreaktionen führen zu den durch Keto-Enol-Tautomerie stabilisierten Enaminolen. Aufgrund der in  $\alpha$ -Position befindlichen Hydroxylgruppe entsteht aus einer Aldose über Amadori-Umlagerung eine 1-Amino-1-desoxyketose (Amadori-Produkt). Eine Ketose lagert sich dagegen zur 2-Amino-2-desoxyaldose, dem sogenannten Heyns-Produkt, um. Amadori- und Heyns-Produkte stellen die ersten stabilen Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion dar. Amadori-Produkte fungieren auch als Markerverbindungen für die Beurteilung

von Fortschritt und Ausmaß der Reaktion. In Abbildung 2.1-1 ist die Bildung der Amadori-Verbindung am Beispiel der 1-Amino-1-desoxy-fructose dargestellt.

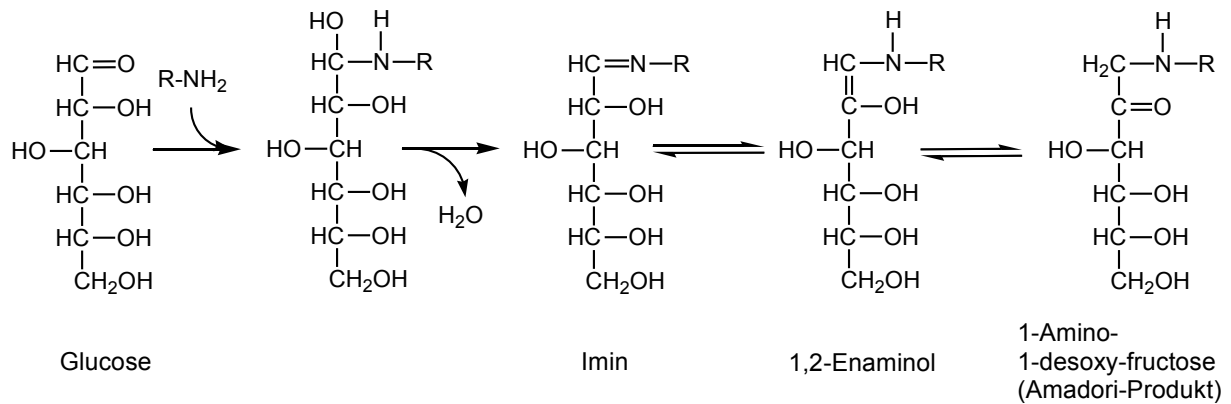


Abbildung 2.1-1: Frühphase der Maillard-Reaktion – Bildung von Amadori-Produkten am Beispiel der 1-Amino-1-desoxy-fructose

### 2.1.2 Fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion – Bildung reaktiver Dicarbonylverbindungen

Die Amadori-Verbindungen als Produkte der frühen Maillard-Reaktion reagieren wegen ihrer begrenzten Stabilität im pH-Bereich von 4 bis 7 meist unter Abspaltung ihrer Aminokomponente zu Desoxyosonen weiter (vgl. Abbildung 2.1-2).

Durch Enolisierung kann zunächst sowohl das 1,2-Enaminol, als auch das 2,3-Enaminol gebildet werden. Im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich liegt das Gleichgewicht auf der Seite des 1,2-Enaminols, das zum 3-Desoxyoson weiterreagiert. Bei höheren pH-Werten entsteht überwiegend das 2,3-Enaminol und damit das 1-Desoxyoson bzw. unter Erhaltung der Aminokomponente das 4-Desoxyoson.

Die Bildung dieser hochreaktiven Dicarbonylverbindungen kann grundsätzlich auch ohne Beteiligung von Aminen ablaufen. Bei pH-Werten < 3 und > 8 sowie unter den Bedingungen der Karamellisierung ( $T > 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) erfolgt die Desoxyosonbildung auch direkt aus Monosacchariden (Kroh, 1994). Den Aminen kommt somit vor allem eine Katalysatorwirkung im für Lebensmittel und physiologische Medien typischen pH-Bereich von 3 bis 8 zu.

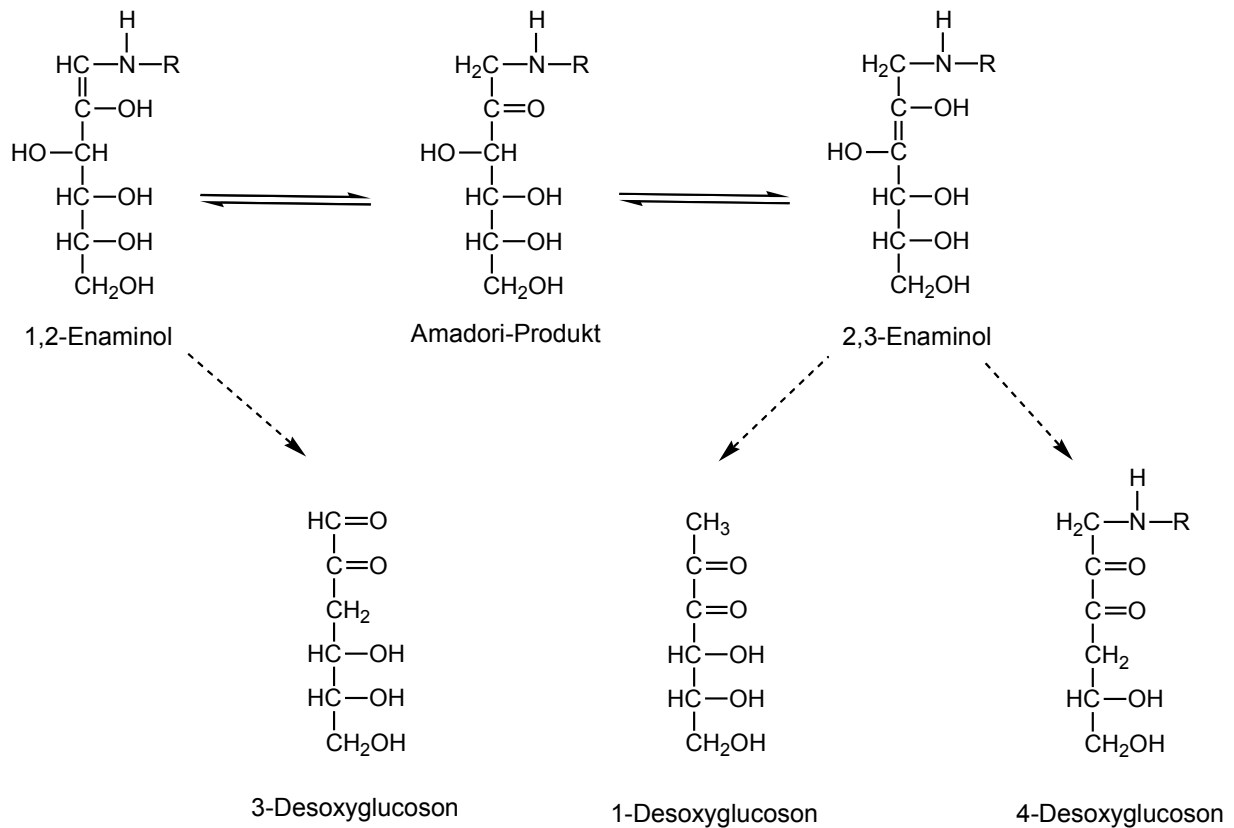


Abbildung 2.1-2: Fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion – Bildung von Desoxyosonen am Beispiel der Glucosone

Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es unter oxidativen Bedingungen durch Retroaldolspaltungen zu Kettenbrüchen im Kohlenstoffgerüst der Desoxyosone. Es entstehen kürzerkettige 1,2-Dicarbonylverbindungen und die entsprechenden Aldehyde. Wichtige Vertreter dieser Spaltungsprodukte sind zum Beispiel Glyoxal, Methylglyoxal und Glycerinaldehyd (vgl. Abbildung 2.1-3).

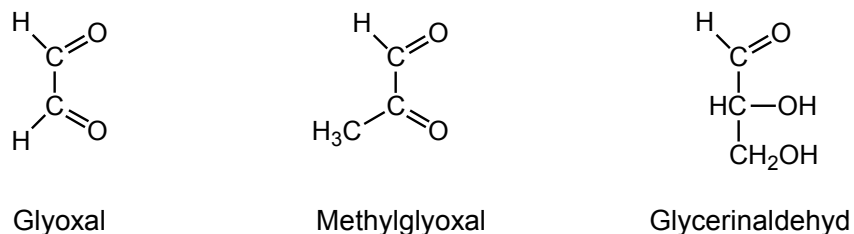


Abbildung 2.1-3: Glyoxal, Methylglyoxal und Glycerinaldehyd

Vor allem die beiden erstgenannten sind sehr reaktiv und unter anderem an der Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) bzw. N<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin (CEL) beteiligt. Glyoxal ist nicht nur ein Produkt der Maillard-Reaktion, sondern entsteht auch im Zuge der

Glucoseautoxidation (*Glomb et al., 1995*) sowie bei der Lipidperoxidation (*Fu et al., 1996*), wodurch es auch auf diesem Wege zur CML-Bildung kommt.

### 2.1.3 Finalphase der Maillard-Reaktion – Bildung hoch- und niedermolekularer Endprodukte

Die Endphase der Maillard-Reaktion ist gekennzeichnet durch Abbau- und Polymerisierungs- bzw. Weiterreaktionen der hochreaktiven Dicarbonylverbindungen aus denen eine Vielzahl von Folgeprodukten resultiert. Bei Anwesenheit von Aminokomponenten kommt es nach Enolisierung, Zyklisierung und Wasserabspaltung zur Bildung stickstoffhaltiger Heterozyklen. Beispiele für das breite Produktspektrum sind Pyrrol- und Pyridinderivate, Pyrazine, Imidazole, Furan- und Pyraninderivate. Außerdem entstehen hochmolekulare, farbige Verbindungen, die zusammenfassend als Melanoidine bezeichnet werden. Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Lysinderivate vorgestellt.

#### 2.1.3.1 Pyrralin

Als Folgeprodukt der 3-Desoxyglucosulose entsteht durch Wasserabspaltung und Zyklisierung leicht 2-Hydroxymethylfurfural (HMF), welches als Erhitzungsindikator in kohlenhydratreichen Lebensmitteln wie Honig zu Bedeutung gelangt ist. Bei Anwesenheit von primären Aminen werden stattdessen die entsprechenden N-alkylierten Pyrrolaldehyde, wie zum Beispiel  $\epsilon$ -(2-Formyl-5-hydroxymethyl-1-pyrrolyl)-Norleucin (Pyrralin) durch Reaktion mit Lysin, gebildet (vgl. Abbildung 2.1-4).

Die dem Hydroxymethylfurfural analoge Pyrrolstruktur ist säurelabil und war daher zunächst analytisch schwer zugänglich. *Nakayama et al. (1980)* isolierten und identifizierten Pyrralin aus einem Modellansatz, in welchem Glucose mit Lysin in wässriger Lösung bei 105 °C für 6 h umgesetzt wurde. Reaktionspartner der Aminosäure ist nach *Sengl (1988)* das aus der 3-Desoxyglucosulose entstehende 3,4-Didesoxyoson, welches mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins unter Abspaltung von zwei Mol Wasser zyklisiert.

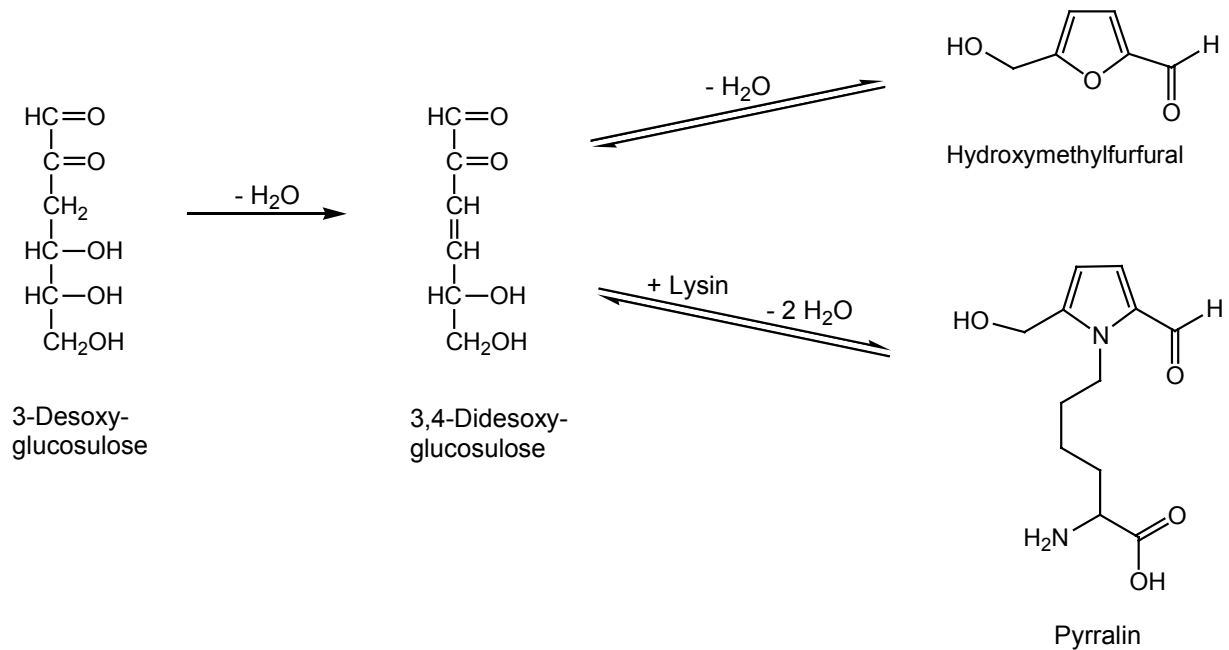


Abbildung 2.1-4: Bildung von Hydroxymethylfurfural und Pyrralin

In Modellstudien mit trocken bei 100 °C erhitzten Casein-Lactose-Mischungen belegten *Henle et al. (1993)*, dass die Pyrralinbildung unabhängig von der frühen MR und damit von Bildung und Abbau des Amadori-Produktes ist. Demnach stammt das als Prekursor fungierende Didesoxyoson vorrangig aus dem direkten Zuckerabbau. Ebenfalls in Modellstudien zeigten *Njoroge et al. (1987)* die Bildung analoger Pyrrolstrukturen unter physiologischen Bedingungen aus D-Glucose und Neopentylamin nach zehntägiger Inkubation bei pH 7,2 und 37 °C. Ende der 80er Jahre wiesen *Sengl et al. (1989)* sowie *Schüßler und Ledl (1989)* das peptidgebundene Derivat erstmals nach alkalischer Hydrolyse von Rinderserumalbumin bzw.  $\beta$ -Casein nach Reaktion mit Glucose nach. Verschiedene Ansätze zur präparativen Synthese über eine Vielzahl von Zwischenstufen führte zunächst nur zu geringen Ausbeuten von maximal 15 % (*Miller et al., 1985, Schüßler und Ledl, 1989*). *Henle und Bachmann* beschrieben 1996 eine vereinfachte und optimierte Strategie ausgehend von  $N^\alpha$ -t-Butyloxycarbonyl-L-lysin und 3-Desoxyglucosulose und erreichten so einen Umsatz von 31 %.

Mittlerweile wurde Pyrralin mit chromatographischen, spektrometrischen und immunochemischen Methoden als freies und, nach enzymatischer oder alkalischer Hydrolyse, als peptidgebundenes Derivat in erhitzten Lebensmitteln (*Chiang, 1988, Henle und Klostermeyer, 1993*) und physiologischen Medien wie Plasma (*Hayase et al., 1989*), Urin (*Portero-Otin et al., 1997a*) und Bindegewebe (*Portero-Otin et al., 1995*) nachgewiesen.

Über den Hydroxymethylrest des Derivates ist eine Quervernetzung möglich. Entsprechende über Ether- und Thioetherbrücken verknüpfte Produkte mit Cystein bzw. zweier Moleküle Pyrralin wurden in Modellansätzen nachgewiesen (*Nagaraj et al., 1996*). Im Ames-Test zeigte Pyrralin mutagene Wirkung (*Omura et al., 1983*). Darüber hinaus berichteten *Öste et al. (1987)* von der Inhibierung der Proteinasen Aminopeptidase A und Carboxypeptidase A durch proteingebundenes Pyrralin.

### 2.1.3.2 N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML)

Für die Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) werden verschiedene Mechanismen beschrieben. Einen Weg stellt die oxidative Spaltung des Amadori-Produktes zwischen C2 und C3 des Zuckerrestes (vgl. Abbildung 2.1-5 (1)) dar. Als Reaktionsprodukt entsteht neben der Carboxymethylaminosäure Erythronsäure (*Ahmed et al., 1986, Büser et al., 1986a und b*). Die Reaktion läuft bevorzugt über einen metallkatalysierten Mechanismus unter Beteiligung von Hydroxylradikalen ab (*Nagai et al., 1997*). Neben Fructoselysin können auch andere Glucosamine oxidativ zu Carboxymethyllysin gespalten werden. So zeigten *Dunn et al. (1990)* die spontane CML-Bildung unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4, 37 °C) aus N<sup>ε</sup>-Threoselysin, welches aus der Reaktion von Ascorbat bzw. Dehydroascorbat mit Lysin hervorgeht. Außer dem Amadori-Produkt wird auch die Schiffische Base als CML-Prekursor diskutiert (*Glomb und Monnier, 1995*). Der Bildungsweg verläuft dann über die Fragmentierung der Base mit anschließender Oxidation analog einer Retroaldol-Reaktion (vgl. Abbildung 2.1-5 (2)).

Neben der direkten Glykoxidation wird die CML-Bildung auch durch die Reaktion von Lysin mit Glyoxal über eine intramolekulare Cannizzaro-Reaktion beschrieben (vgl. Abbildung 2.1-5 (3), *Wells-Knecht et al., 1995, Glomb und Monnier, 1995*). Die Dicarbonylverbindung kann dabei sowohl aus der Glucoseautoxidation als auch der oxidativen Spaltung der Schiffischen Base (Namiki-Pathway, *Namiki et al. 1977*) oder des Amadori-Produktes sowie Lipidperoxidationsprozessen resultieren. Gleiches gilt offenbar für Carboxymethyllysin, welches *Ahmed et al. (1997)* in Ansätzen von N<sup>α</sup>-Acetyllysin und Rattenkollagen mit Glucose, Glucoson, 3-Desoxyglucosulose, Ascorbinsäure, Ribose, Glyceraldehyd-3-phosphat, Dihydroxyacetonphosphat und Methylglyoxal nachweisen konnten.



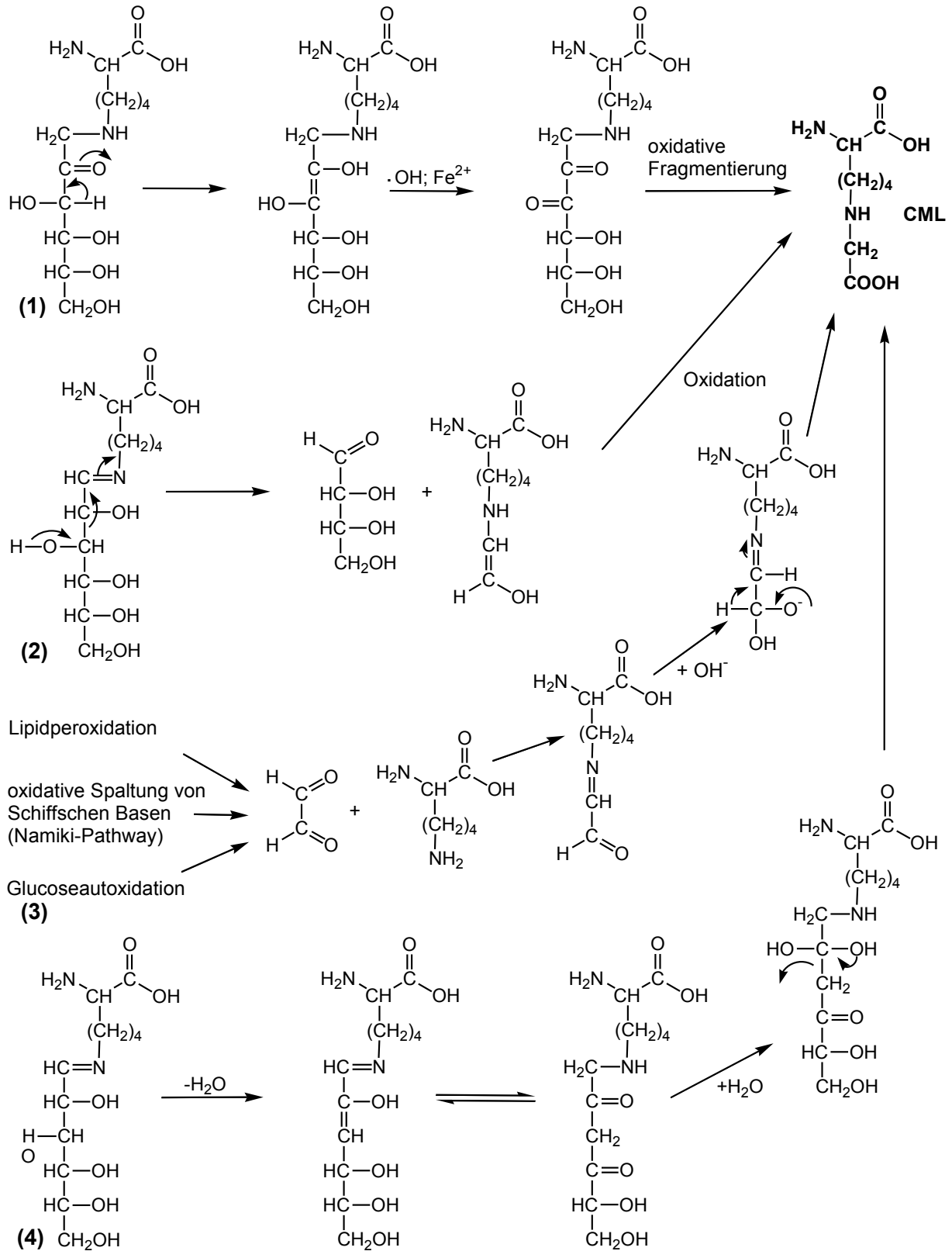


Abbildung 2.1-5: Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine durch (1) oxidative Spaltung des Amadori-Produkts unter Beteiligung von Hydroxylradikalen und Fe<sup>2+</sup>-Ionen (2) Spaltung und Oxidation der Schiffischen Base analog einer Retroaldol-Reaktion (3) Reaktion von Lysin mit Glyoxal im Sinne einer intramolekularen Cannizaro-Reaktion (4) nicht oxidative Spaltung eines durch Tautomerisierung aus dem 1-Lysino-3-Desoxyglucosons gebildeten 2,4-Dioxoderivates

Aktuelle Studien von *Kasper und Schieberle (2005)* postulieren die nicht oxidative Spaltung eines 2,4-Dioxoderivates, welches durch Tautomerisierung eines an Lysin gebundenen 3-Desoxyosons entsteht (Abbildung 2.1-5 (4)).

Für die Beurteilung der Relevanz der einzelnen Bildungswege sind offenbar die Randbedingungen wie Phosphat- und Metallionenkonzentration sowie das Angebot an Glucose und Amadori-Produkt als mögliche Edukte von entscheidender Bedeutung. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4, 37 °C) gilt die oxidative Fragmentierung des Amadori-Produktes als dominierender CML-Bildungsweg. Bei einer Erhöhung der Konzentration an Glucose, wie im Serum von Diabetes-Patienten vorhanden, könnte die CML-Bildung über Glyoxal als Prekursor an Bedeutung gewinnen (*Glomb und Monnier, 1995, Wells-Knecht et al. 1995*).

Die vielfältigen Bildungswege und die Beobachtung, dass CML auch bei der klassischen Säurehydrolyse aus Fructoselysin gebildet wird (*Knecht et al., 1991, Hartkopf et al., 1994*) erschweren eine exakte quantitative Erfassung des proteingebundenen Lysinderivates. Als Alternative kommen zur Bestimmung der proteingebundenen Carboxymethylaminosäure vor allem immunochemische Methoden zum Einsatz, bei denen auf eine Hydrolyse verzichtet wird.

### 2.1.3.3 Maltosin

Reduzierende Disaccharide nehmen grundsätzlich analog den Monosacchariden am Reaktionsgeschehen teil. Aus Maltose entsteht so über das 1-Desoxymaltoson vorrangig das Pyranonderivat, Maltol, während Lactose über 1-Desoxylactosulose zunächst das furanoide Galaktosylisomaltol und nach anschließender Abspaltung des Zuckerrestes 3-Hydroxy-2-furyl-methylketon, Isomaltol, bildet. Isomaltol entsteht in geringem Ausmaß auch aus Maltose (*Ledl et al., 1989, Belitz, 2001*).

Die Reaktion von Isomaltol mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins führt, wie in Abbildung 2.1-6 dargestellt, zur Bildung von 2-Amino-6-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-4H-pyridin-1-yl)-hexansäure, (Maltosin), welches *Ledl et al. (1989)* nach Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyllysin mit Lactose und anschließender Deacylierung identifizierten. Für die präparative Maltosinsynthese setzten die Autoren anstelle des Disaccharides Isomaltol ein.

Da dieses aufgrund seines pKs-Wertes von 5,7 Säurecharakter besitzt, wird der Furanring schon in wässrigen Lösungen hydrolysiert und die endständige Hydroxylgruppe reagiert beim Erhitzen in Gegenwart einer Aminosäure in saurem Milieu unter Ringbildung und Wassereliminierung zu einem Pyridiniumderivat (*Hodge und Nelson, 1961*). Schließlich bildet sich aus diesem durch Umlagerungsreaktionen das Pyridonderivat. *Ledl et al. (1989)* erreichten so eine Ausbeute von 40 %. Untersuchungen zur Bildung von Maltosin aus Monosacchariden ergaben dagegen nur minimale Ausbeuten (*Ledl et al., 1989*).

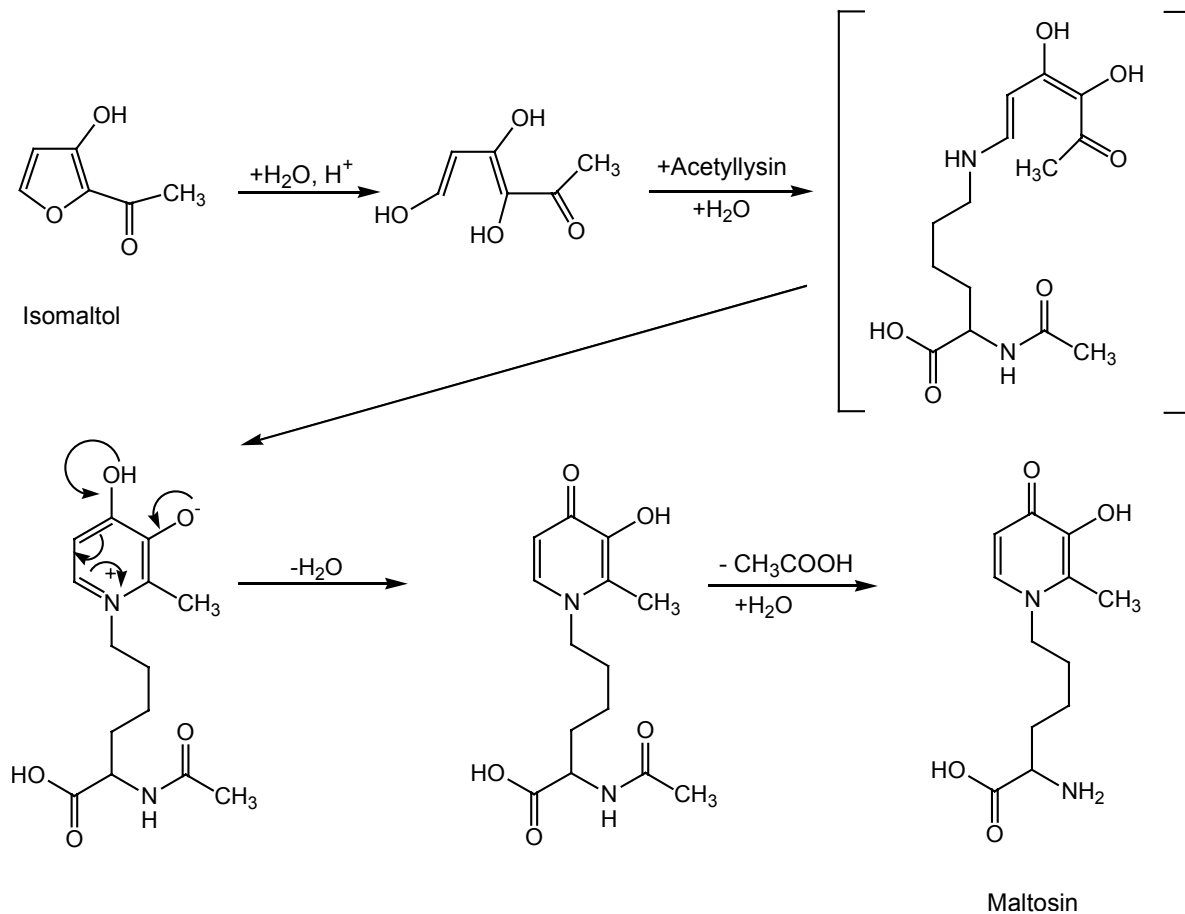


Abbildung 2.1-6: Bildung von Maltosin, Syntheseweg nach *Ledl et al. (1989)*

*Sturzbecher (2005)* beschrieb eine Maltosinsynthese ausgehend von kommerziell erhältlichem Maltol anstelle von Isomaltol. Hierbei wurde die Hydroxylgruppe des Maltols mit einer Benzylschutzgruppe verethert und das Pyrandervat anschließend im basischen Milieu mit N<sup>α</sup>-Acetyllysine zum Acetylmaltosinbenzylether umgesetzt. Die Deacylierung erfolgte enzymatisch mit Acylase. Zur Abspaltung des Ethers wurde mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre hydriert. Die Ausbeuten betrug 76 % und war damit deutlich höher als die von *Ledl et al. (1989)* erreichte.

Maltosin besitzt wie viele 3-Hydroxy-4-pyridinon-Verbindungen stark komplexometrische Eigenschaften, die zum Beispiel beim dünn-schicht-chromatographischen Nachweis zur Anfärbung mit Eisen(III)chlorid genutzt werden (*Kontoghiorghes et al. 1985, Ledl et al., 1989, Sturzbecher, 2005*).

Studien an Ratten belegen darüber hinaus einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit essentieller Spurenelemente wie Eisen und Zink (*Rehner und Walter, 1991*). Die Autoren beobachteten eine Verminderung der Eisenresorption sowie eine Erhöhung der renalen Exkretion infolge Fütterung mit stark mit Maltosin angereichertem Futter.

Strukturell ähnelt Maltosin dem Maltol, bei welchem der über das Stickstoffatom der  $\epsilon$ -Aminogruppe eingebundene Lysinrest durch ein Sauerstoffatom im Heterozyklus ersetzt ist. Weiterhin besteht Analogie zu Pyridosin, einem Produkt der sauren Hydrolyse von Fructoselysin, bei dem ebenfalls ein Lysinrest in den Heterozyklus eingebunden ist, sowie zum natürlich vorkommenden Tyrosinaseantagonisten Mimosin (vgl. Abbildung 2.1-7). Mimosin wird in Mimosenarten (Mimosaceae) wie der als Futterpflanze in der Viehzucht eingesetzten wilden Tamarinde (*Leucaena leucocephala*) gebildet und kann bei unvollständigem mikrobiellen Abbau im Verdauungstrakt der Tiere zu Wachstumshemmungen, Alopecia und Kropfbildung führen (*Hammond, 1995*).

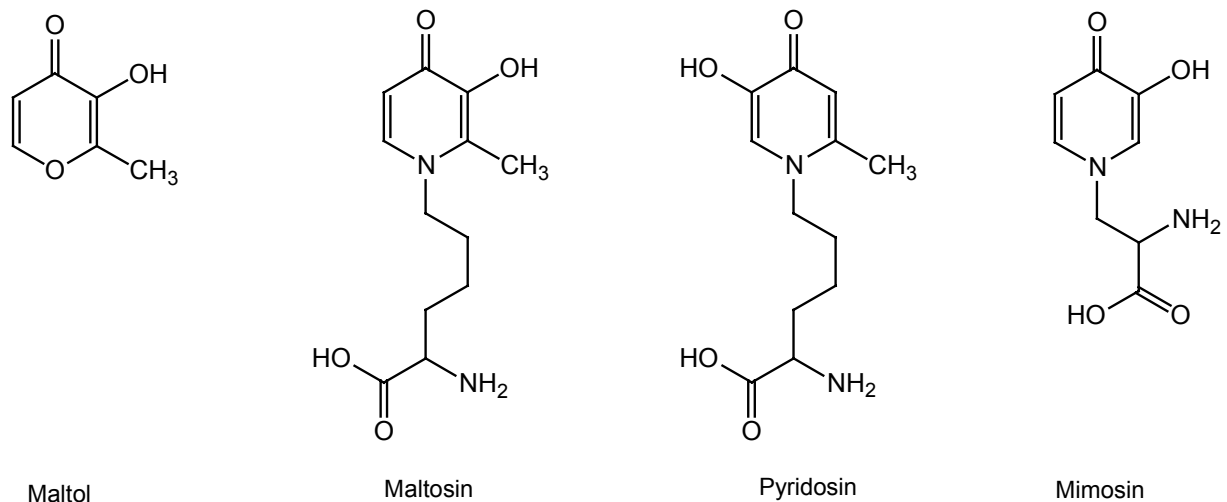


Abbildung 2.1-7: Maltosin und strukturanaloge Verbindungen

Aus der Ähnlichkeit zum Pyridosin ergeben sich Probleme für die quantitative Erfassung von proteingebundenem Maltosin bei Anwesenheit von Amadori-Produkten, da die Verbindungen bei Anwendung gängiger chromatographischer Systeme nach Säurehydrolyse wie zum Beispiel bei der Aminosäureanalyse koeluierten. Eine Verfälschung der bisher so gewonnenen

Pyridosingehalte durch Quantifizierung der Summe aus Pyridosin und Maltosin ist denkbar. Quantitative Daten zu originär in Lebensmitteln enthaltenem oder durch Verarbeitung und Lagerung gebildetem Maltosin existieren bislang nicht. Erste Hinweise auf die Bildung in erhitzten Milch- und Molkenpulvern erbrachten *Henle et al. (1995b)*.

#### 2.1.3.4 Quervernetzungsprodukte – Pentosidin

Eine weitere Klasse der Maillard-Reaktions-Produkte stellen die Quervernetzungsprodukte dar. Hierbei kommt es zum einen zur direkten Kondensation von monomeren Endprodukten wie für Pyrralin beschrieben und zum anderen zur Vernetzung von freien oder proteingebundenen Aminosäuren über Zucker- oder Dicarbonylverbindungen wie Glyoxal und Methylglyoxal. Einige Produkte unter Beteiligung von Lysin sind in Abbildung 2.1-8 aufgeführt.

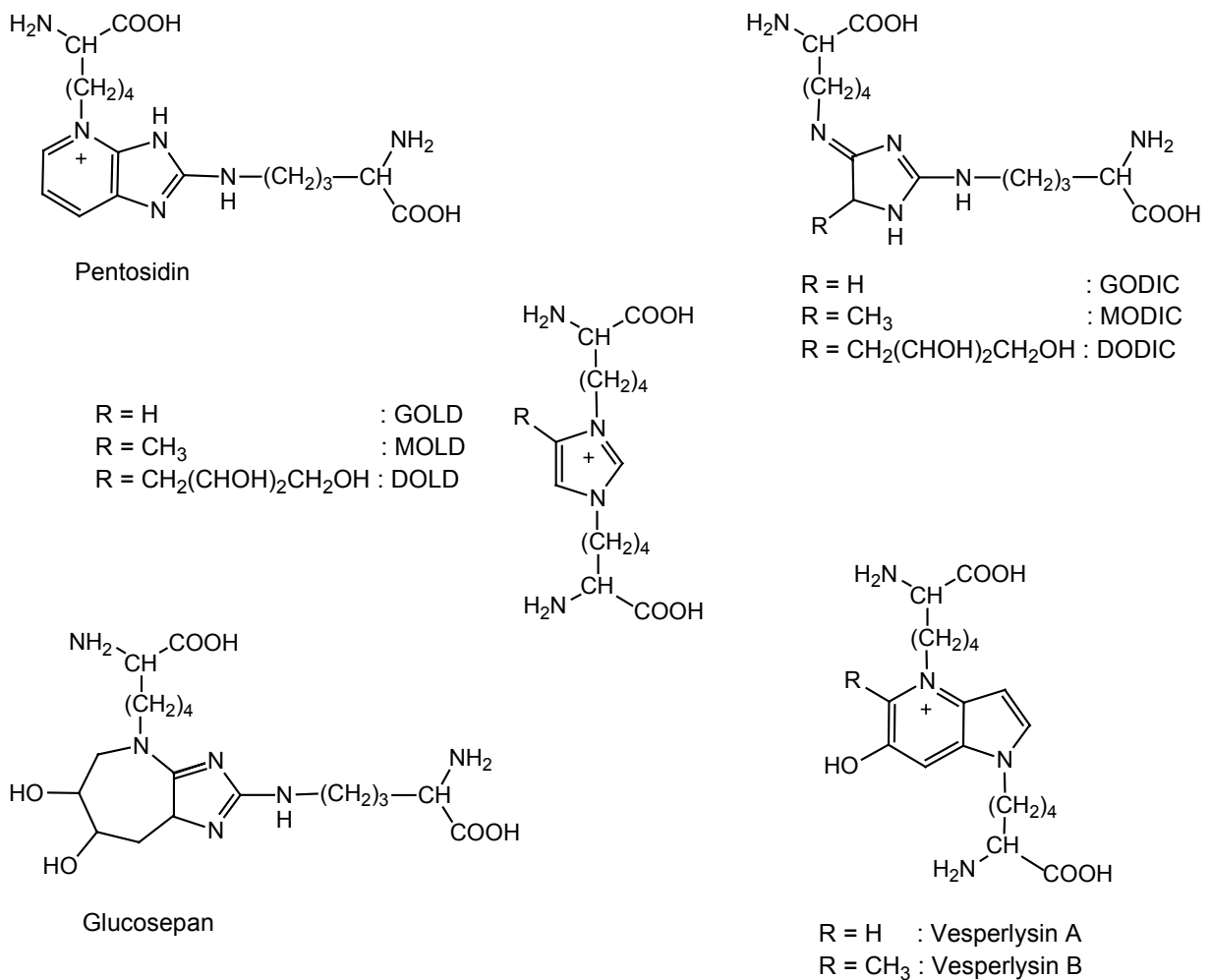


Abbildung 2.1-8: Beispiele für Quervernetzungsprodukte des Lysins

Das säurestabile Imidazolpyridiniumsystem Pentosidin, in dem ein Lysinrest über eine Pentose mit einem Argininrest verknüpft ist, wurde von *Sell und Monnier (1989)* entdeckt und besitzt eine charakteristische Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{ex}} = 335$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 385$  nm. Die Isolierung gelang aus Modellansätzen von L-Arginin und L-Lysin mit D-Ribose, Glucose oder Ascorbinsäure (*Grandhee und Monnier, 1991, Dyer et al., 1991*). Der Nachweis in Körperflüssigkeiten und Bindegewebe erfolgte kurz darauf (*Odetti et al., 1992, Takahashi et al., 1993*). *Monnier et al., (1992)* betrachten die Verbindung als *in vivo* Indikator der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion.

Glyoxal-, Methylglyoxal- und Desoxyglucosulose-Lysin-Dimer (GOLD, MOLD und DOLD) entstehen durch Reaktion der  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins mit Glyoxal (*Wells-Knecht et al., 1995*), Methylglyoxal (*Brinkmann et al., 1995, Nagaraj et al., 1996*), bzw. 3-Desoxyglucosulose (*Skovsted et al., 1998*) und wurden *in vivo* und in Lebensmitteln nachgewiesen (*Siegl, 2003, Biemel et al., 2001a und 2002*). Gleiches gilt für die Imidazolinon-Crosslinks GODIC, MODIC und DODIC (Glyoxal-, Methylglyoxal- und Desoxyglucosulose- derived Imidazolinon-Crosslink) sowie Glucosepan und Vesperlysin A und B (*Lederer et al., 1999a und b, Biemel et al., 2001 und 2002, Nakamura et al., 1997*).

## 2.2 Maillard-Reaktions-Produkte in Lebensmitteln

Maillard-Reaktions-Produkte (MRPs) werden in nahezu jedem verarbeiteten, zubereiteten oder gelagerten Lebensmittel gebildet. Als Ausgangsverbindungen fungieren als Zuckerkomponente im wesentlichen die Monosaccharide Glucose und Fructose, in einigen Fällen auch reduzierende Pentosen wie Ribose, sowie die Disaccharide Maltose und Lactose. Nicht reduzierende Di- und Oligosaccharide können nach hydrolytischer Freisetzung reduzierender Zucker an der Reaktion teilnehmen. Als Aminokomponenten reagieren vorrangig die  $\alpha$ -Aminogruppen freier und endständiger peptid- oder proteingebundener Aminosäuren aber auch andere primäre Aminogruppen funktioneller Aminosäureseitenketten wie die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins oder in der Guanidinogruppe des Arginins vorhanden. Sekundäre Aminogruppen sind aufgrund ihrer geringen Konzentration in Lebensmitteln von geringerer Bedeutung für die Bildung von MRPs. Die Maillard-Reaktion führt in Lebensmitteln zur Bildung einer großen Vielfalt hoch- und niedermolekularer Verbindungen, die essentiell für den sensorischen Eindruck des Nahrungsmittels sind. So ist zum Beispiel die

Bräunung von Brotkruste und Braten genauso auf die Reaktion zurückzuführen wie die Entstehung von Röstaromen im Kaffee, aber auch von Fehlparomen, zum Beispiel in Milchprodukten wie Käse. Zum Aroma tragen außer den über eine Strecker-Reaktion gebildeten Aldehyden auch niedermolekulare Kondensationsprodukte mit Aminosäuren bei. Neben diesen den Genusswert bestimmenden Folgen hat die Entstehung von Maillard-Produkten auch Auswirkungen auf den Nährwert von Lebensmitteln. Durch irreversible Modifizierung essentieller und semiessentieller Aminosäuren wie Lysin oder Arginin können diese für den menschlichen Organismus unverwertbar werden. Von besonderem Interesse ist diese Nährwertminderung bei der Herstellung von diätetischen Produkten wie beispielsweise Säuglingsnahrung. Neben dem Verlust an essentiellen Aminosäuren können Maillard-Produkte auch Einfluss auf die Versorgung mit anderen Nährstoffen nehmen. So haben einige Verbindungen die Möglichkeit zur Komplexbildung mit Mineralstoffen wie Eisen, Kupfer und Zink, welche so dem menschlichen Stoffwechsel nicht mehr zur Verfügung stehen. Außer der Blockierung oder dem Entzug von Nährstoffen werden einige Produkte auch aus toxikologischer Sicht diskutiert. Aktuelle Beispiele hierfür sind die Bildung von Acrylamid aus Asparagin sowie Lysin-derivate wie Pyrralin, die in Tierversuchen mutagene bzw. kanzerogene Eigenschaften aufwiesen (*Ledl und Schleicher, 1990*).

### 2.2.1 Vorkommen und Bestimmung in Lebensmitteln

Erste in Lebensmitteln nachweisbare Maillard-Produkte sind Aminoketosen und -aldosen. Amadori-Verbindungen wurden in erhitzten, gelagerten und getrockneten Lebensmitteln wie Sojasoße, getrocknetem Obst und Milchprodukten sowie in Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung nachgewiesen. Die Gehalte steigen dabei von feuchten zu trockenen sowie mit Dauer und Ausmaß von Erhitzungsprozessen an. Hauptvertreter in Milchprodukten ist das Lactoselysin. Da die Bildung zeit- und temperaturabhängig ist (*Ledl und Schleicher, 1990, Belitz und Grosch, 1992*), wird der Gehalt an Amadori-Produkten in einem Lebensmittel als Indikator für Ausmaß und Fortschritt des Reaktionsgeschehens und damit zur Einschätzung der Lysinblockierung herangezogen. Untersuchungen an Milchprodukten zeigten dabei Blockierungsgrade von 10 - 20 %, in Einzelfällen bis zu 70 % (*Finot et al., 1981, Henle et al., 1991*). Die Bestimmung von Amadori-Produkten erfolgt in der Regel indirekt nach standardisierter Salzsäurehydrolyse über Furosin, N<sup>ε</sup>-(2-Furoylmethyl)-lysin, das neben Lysin, Pyridosin und Carboxymethyllysin als Hydrolyseprodukt gebildet wird (vgl. Abbildung 2.2-1), mittels Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-

Nachsäulenderivatisierung (*Resmini et al., 1990*). Der Rückschluss auf den ursprünglichen Amadori-Produkt-Gehalt ist möglich, da die Produkte abhängig von Säurekonzentration, Hydrolysedauer und -zeit in konstanten Verhältnissen entstehen (*Resmini et al., 1990, Krause, 2005*).

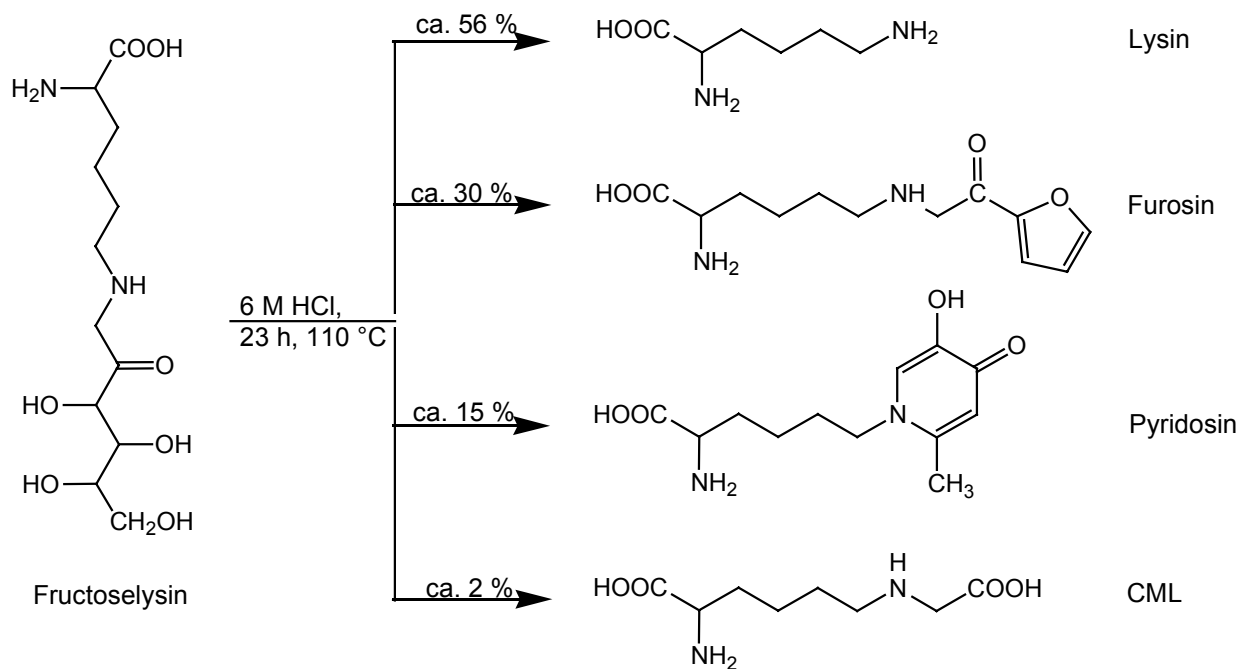


Abbildung 2.2-1: Produkte der Säurehydrolyse (6 M HCl, 23 h, 110 °C) von Fructoselysin, Quantitative Daten nach *Krause (2005)*

Im Gegensatz zu den Produkten der fortgeschrittenen Reaktion sind die Amadori-Produkte bereits in wenig bzw. unter milden Bedingungen behandelten Lebensmitteln wie Roh- und pasteurisierter Milch nachweisbar. Sie stellen damit die quantitativ bedeutendsten MRPs in Lebensmitteln dar. Ähnliche Größenordnungen im Bereich von mg/ kg Protein werden für Pyrralin, Pentosidin und CML erst bei stärkerer thermischer Behandlung erreicht. Die größten Mengen an Amadori-Produkten wurden in stark erhitzten Milchpulvern (bis zu 12 g Furosin/ kg Protein) und Backwaren (bis zu 6 g Furosin/ kg Protein) bestimmt (*Henle et al., 1995a*).

Eine Übersicht über die Gehalte an verschiedenen MRPs in Lebensmitteln gibt Tabelle 2.2-1. Das Amadori-Produkt ist dabei als Furosin dargestellt.



Tabelle 2.2-1: MRP-Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln in mg/ kg Protein; Amadori-Produkt dargestellt als Furososin im Säurehydrolysat in mg/ kg hydrolysiertes Protein

Lebensmittel	Furososin <sup>1</sup>	Pyrralin <sup>2</sup>	Pentosidin <sup>3</sup>	CML <sup>4</sup>
Roh- und pasteurisierte Milch	20 - 78	< 2	n.n.	138 (PM)
UHT und Sterilmilch	110 - 12 000	< 2 - 260	n.n. - 2,6	100 - 750
Milchpulver	1800 - 12 000	< 2 - 1150	n.n. - 0,4	1100 - 2126
Nudeln	400 - 8500	< 2 - 125	-	-
Backwaren	200 - 6000	20 - 3680	n.n. - 22,8	58 - 3194
Röstkaffeepulver	-	-	10,8 - 39,9	198
Fleisch und Wurstwaren	-	-	-	23 - 336

-: keine Angaben; PM: pasteurisierte Milch; n.n.: < 50 µg/ kg; <sup>1</sup>Resmini et al. (1992), Henle et al. (1995a), Clawin-Rädecker et al. (1996), V. Renterghem et al. (1996), Knobloch (1999); <sup>2</sup>Henle et al. (1994); <sup>3</sup>Henle et al. (1997); <sup>4</sup>Büser et al. (1986a und b), Hartkopf et al. (1995), Ruttkat et al. (1996), Drusch et al. (1998) Richter (2001)

Der Nachweis von Pyrralin in Lebensmitteln wurde zunächst für das freie Derivat in wasserlöslichen Fraktionen von Trockenmilch, Nahrungseratzpulver, Soßen und Fleischbrühpulvern geführt (Chiang et al., 1988). Erste Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung des proteingebundenen Pyrrols in Lebensmitteln folgten durch Henle und Klostermeyer (1993). Nach Freisetzung des proteingebundenen säurelabilen Derivates mittels enzymatischer Hydrolyse erfolgten Trennung und Detektion durch Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung. Die Nutzung eines Diodenarraydetektors ermöglichte die Bestimmung neben anderen Aminosäuren und die Abgrenzung zum koeludierenden Phenylalanin, da dieses keine Absorption bei  $\lambda = 297$  nm, im UV-Maximum von Pyrralin, zeigt. Im Gegensatz zum Amadori-Produkt ist Pyrralin erst in stärker erhitzten Lebensmitteln wie UHT- oder Sterilmilch nachweisbar (Henle et al., 1994). Die hier ermittelten Werte liegen allerdings um den Faktor 10 bis 50 unter den Furososingehalten. In Backwaren wurden dagegen vergleichbare Mengen von bis zu 3,7 g/ kg Protein gemessen. Bachmann (1994) ersetzte die Ionenaustauschchromatographie durch die weniger zeitaufwendige Ionenpaarchromatographie an einer Umkehrphase, wandte das System allerdings nicht für die Bestimmung in Handelsproben an.

Der Nachweis von CML erfolgte zunächst als Produkt der Hitzeschädigung von Modellproteinen (Ahmed et al., 1986) und kurz darauf in erhitzten Milchprodukten (Büser und Erbersdobler, 1986b). Im gleichen Jahr bestimmten Büser et al. (1986a) mittels Gaschromatographie mit Stickstoff-sensitivem Detektor erste quantitative Werte in kommerziellen Lebensmitteln. In den 90er Jahren wurden verschiedene

flüssigchromatographische Methoden nach Derivatisierung mit einem Fluorophor zur CML-Bestimmung entwickelt (*Hartkopf, 1993, Ruttkat, 1996, Drusch et al., 1998*). *Richter (2001)* etablierte eine gaschromatographische Methode mit massenspektrometrischer Detektion auf Grundlage einer zuvor von *Knecht et al. (1991)* für die Bestimmung im Urin beschriebenen Methode. Aufgrund der unterschiedlichen Derivatisierungs-, Trenn- und Detektionsmethoden sind die in der Literatur angegebenen Werte nur schwer untereinander vergleichbar. Von besonders großem Einfluss auf das Analyseergebnis ist die Hydrolyseführung, da es unter oxidativen Bedingungen zur CML-Nachbildung aus Amadori-Produkt und Schiffscher Base kommt. *Hartkopf (1994)* zeigte in Modelluntersuchungen zur CML-Bildung in Lebensmitteln, dass bis zu 90 % der messbaren Gehalte während der klassischen Säurehydrolyse von Lebensmitteln aus Fructoselysin gebildet werden. Auch Phosphat und Nitrit katalysieren die Nachbildung von CML (*Hartkopf, 1994*). Daraus folgt die Notwendigkeit, das Amadori-Produkt vor Hydrolyse zu reduzieren, bzw. unter nicht oxidativen Bedingungen zu arbeiten, um so eine CML-Nachbildung auszuschließen.

*Richter (2001)* bestimmte auch das dem CML analoge N<sup>ε</sup>-Carboxyethyllysin (CEL) in Lebensmitteln. In Milch und Milchprodukten war der Nachweis negativ, in Bockwurst und Zwieback wurden Gehalte von 27 mg/ kg Protein und 577 mg/ kg Protein bestimmt. Sie berechnete eine durchschnittliche tägliche Zufuhr von 33 mg CML und 5 mg CEL.

Dem Nachweis von Pentosidin in Lebensmitteln ging die Isolierung aus humanem Kollagen (*Sell und Monnier, 1989*) und verschiedenen anderen physiologischen Matrices voraus. Erste Daten zum Pentosidingehalt verschiedener Milchprodukte, Backwaren und Röstkaffee ermittelten *Henle et al. (1997)* unter Anwendung der Ionenaustauschchromatographie mit Fluoreszenzdetektion. Die höchsten Werte wurden dabei in alkalibehandelten Proben wie Laugengebäck mit bis zu 22,8 mg/ kg Protein erzielt. Insgesamt ist Pentosidin allerdings als Minorkomponente unter den Produkten der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln anzusehen.

Als weitere Quervernetzungsprodukte konnten die Lysindimere GOLD und MOLD in Backwaren nachgewiesen werden (*Biemel et al., 2001, Siegl, 2003*). In Milch und Milchprodukten sowie Kaffee war der Nachweis dagegen negativ. Darüber hinaus bestimmten *Biemel et al. (2001)* auch GODIC, MODIC, DODIC und Glucosepan in Lebensmitteln. MODIC identifizierten sie mit Werten von bis zu 151 mg/ kg Protein als den wichtigsten Quervernetzer in dieser Matrix.

Neben den oben aufgeführten Produkten der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion wurde auch das Vorkommen der entsprechenden Prekursoren untersucht. So beziffern *Weigel et al. (2004)* das Vorkommen von 3-Desoxyglucosulose in verschiedenen Honigen mit 1,3 bis 79 mg/ kg Honig. Methylglyoxal und Glyoxal sind dagegen nur in Mengen von 0,4 - 5,4 bzw. 0,2 - 2,7 mg/ kg enthalten. Die Gehalte nahmen dabei mit der Lagerdauer bzw. der thermischen Behandlung zu. Im gleichen Jahr untersuchte *Rättich (2004)* die Gehalte an 3-DG in erhitzten Milchprodukten. Mit 65 bis 140 mg/ kg Protein in Kondensmilch und 314 mg/ kg in UHT-Milch liegen die Werte im Bereich der oben beschriebenen fortgeschrittenen Maillard-Produkte.

Aus den dargestellten Werten schätzte *Henle (2003)* die tägliche Zufuhr an frühen und fortgeschrittenen Maillard-Produkten ab. Bei einem durchschnittlichen Verzehr von einem Liter Milch, 500 g Backwaren und 400 ml Kaffee pro Tag nimmt der Mensch demnach 500 bis 1200 mg Amadori-Produkte, berechnet als Fructoselysin, sowie 25 bis 75 mg der fortgeschrittenen Produkte, vor allem Pyrralin und CML, auf. Den größten Anteil haben dabei Backwaren wohingegen Fleisch und Wurstwaren einen eher geringen Beitrag leisten.

Im Gegensatz hierzu veröffentlichten *Goldberg et al. (2004)* eine Liste mit 250 Lebensmitteln, die mittels ELISA-Technik auf Basis von monoklonalen anti-CML-Antikörpern bezüglich ihrer CML-Gehalte untersucht wurden. Die einzelnen Werte sind schlecht mit den oben angegebenen vergleichbar, da die angewandte Methode eine Angabe in Units/ Lebensmittel, Protein oder Fett bedingt. Die höchsten Gehalte wurden in der „Fettgruppe“, vor allem in Brotaufstrichen wie Butter (265 kU/ g) sowie in Mayonnaise (94 kU/ g) und Olivenöl (120 kU/ g) gefunden, im Durchschnitt  $100 \pm 19$  kU/ g. Es folgen Fleisch und Fleischersatz mit durchschnittlich  $43 \pm 7$  kU/ g. Die Gehalte in Backwaren, Milch und Obst werden dagegen um mehr als eine Zehnerpotenz niedriger angegeben. Die hohen Gehalte in fettigen Lebensmitteln führen die Autoren auf hohe Konzentrationen freier Radikale zurück, die durch Lipidperoxidationsprozesse entstehen und dann zur Bildung fortgeschrittener Maillard-Produkte und sogenannten „advanced lipoxidation end products“ (ALEs) führen. CML-ähnliche Produkte werden demnach auch in Ölen gebildet, obwohl die dort vorhandenen Proteingehalte vernachlässigbar sind.

Für eine Reihe der bisher in Modellversuchen nachgewiesenen Maillard-Produkte steht die Quantifizierung in Lebensmitteln noch aus. Als Beispiel sei an dieser Stelle Maltosin genannt, dessen Erfassung Ziel der vorliegenden Arbeit war.

### 2.3 Maillard-Reaktions-Produkte *in vivo*

Neben dem Vorkommen in Lebensmitteln konnten MRPs auch als freie und proteingebundene Derivate in physiologischen Medien wie Plasma, Urin und Geweben nachgewiesen werden. Als Edukte der Maillard-Reaktion *in vivo* stehen je nach Lokalisierung der teilnehmenden Proteine extrazellulär Glucose und intrazellulär auch andere Zucker wie Fructose oder Glycerinaldehyd-3-phosphat zur Verfügung. Letztgenannte sind um ein vielfaches reaktionsfreudiger, da sie überwiegend in der reaktiveren Kettenform vorliegen. Zielstrukturen der Glykierung sind vor allem Gewebe- und extrazelluläre Proteine wie Hämoglobin, Albumin und Kollagen, Linsenproteine, Apoproteine des Low Density Lipoproteins und Proteine der Erythrozytenmembran (*Bunn et al., 1975, Ahmed et al., 1997 und 1986, Dunn et al., 1991, Knecht et al., 1991, Ledl und Schleicher, 1990*).

Beim gesunden Menschen liegen ca. 5 - 8 % des Hämoglobins in glykierter Form (HbA<sub>1</sub>) vor, wobei vorrangig der N-terminale Valinrest der  $\beta$ -Kette modifiziert ist (*Bunn et al., 1975*). Bei erhöhtem Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie), wie bei Diabetikern, liegen die Werte bei bis zu 12 % und damit deutlich höher. Da die Reaktion irreversibel ist, stellen die im Körper vorhandenen modifizierten Proteine in Abhängigkeit ihrer biologischen Halbwertszeit ein Langzeitgedächtnis für Dauer und Ausprägung hyperglykämischer Phasen dar, was in der klinischen Diagnostik genutzt wird. Die mittlere Glykierung von Gewebeproteinen beläuft sich auf 1 bis 3 % aller Lysinreste (*Ledl und Schleicher, 1990*).

Zusätzlich zur ursächlichen Glykierung konnten auch Produkte der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion nachgewiesen werden. *Vlassara et al. (1984)* führten die Bezeichnung „advanced glycation end products“ (AGEs) für meist proteingebundene Produkte der fortgeschrittenen Reaktion *in vivo* ein. Der Nachweis erfolgte zunächst phänomenologisch, da mit dem Alter oder erhöhtem Blutzuckerspiegel neben einer Molmassenerhöhung auch die Fluoreszenz von Geweben zunahm (*Pongor et al., 1984*). Als spezifische Strukturen konnten sowohl Pyrralin (*Hayase et al., 1989*), als auch CML (*Ahmed et al., 1986*), welches schon Mitte der 70er Jahre durch *Wadman et al. (1975)* im Urin nachgewiesen wurde, und Pentosidin (*Sell und Monnier, 1989*) identifiziert werden. Tabelle 2.3-1 gibt einen Überblick über die Gehalte spezifischer MRPs in physiologischen Medien.

Tabelle 2.3-1: MRP-Gehalte in physiologischen Medien gesunder Probanden

Derivat	Matrix	Gehalt	Autoren
Fructose- lysin	Serumalbumin, Nägel, Haare	nachgewiesen	<i>Schleicher und Wieland, 1981</i>
	Urin	4,0 ± 2,8 µg/ mg Krea. 12,3 ± 7,2 mg / d bis 77,9 ± 18,8 mg/ d 2 - 12 mg Furosin/ d	<i>Knecht et al., 1991</i> <i>Erbersdobler et al., 1986</i>  <i>Henle et al., 2000</i>
Pyrralin	Plasma- und Linsenprotein, Kollagen, Albumin,	nachgewiesen	<i>Hayase et al., 1989, Yoshihara et al. 2001, Miyata, 1992, Nagaraj, 1996</i>
	Plasma	gebunden: 8,7 ± 1,3 mg/ kg Prot. frei: 20,3 ± 7,6 mg/ kg Prot.	<i>Odani et al., 1996</i>
	Urin	1 µg/ mg Krea. 0,137 µmol/ kg KG/ 24 h 1,42 ± 0,65 µmol/ mmol Krea. 32,9 ± 27,1 nmol/ mg Krea.	<i>Odani, 1996</i> <i>Portero-Otin et al. 1997a /b</i> <i>Yoshihara, 2001</i> <i>Tsukahara et al. 2003</i>
CML	Urin, Linsenprotein, Sehnen, Haut, Lunge, Niere, Darm, Arterien	nachgewiesen	<i>Wadman et al., 1975, Ahmed et al., 1986, Schleicher et al., 1997, Dunn et al., 1989 und 1990</i>
	Urin	0,6 bis 1,1 µg/ mg Krea. 1,76 ± 0,62 mg/ d	<i>Knecht et al., 1991, Friess et al., 2003, Wagner et al., 2001</i>
	Plasma	0,8 - 2,2 mg/ kg Prot. 15 - 42 mg/ kg Prot.	<i>Schleicher et al., 1997</i> <i>Van de Merbel et al., 2004</i>
	Serum	4,0 ± 0,9 mg/ kg Prot.	<i>Wagner et al., 2001</i>
CEL	Linsenprotein	nachgewiesen	<i>Ahmed et al., 1997</i>
Pentosidin	Urin	27,6 nmol/ mmol Krea. 2,04 ± 0,31 nmol/ mmol Krea.	<i>Yoshihara et al., 1998</i> <i>Iwashige et al., 2004</i>
	Serum	15 ng/ mg Krea.	<i>Tsukahara et al., 2003</i>
	Plasma	346 nM 25,9 ± 1,0 ng/ ml	<i>Takahashi et al., 1993</i> <i>Sell und Monnier, 1989</i>
	Kollagen	1,63 ± 0,07 pmol/ mg Prot. bis 330 pmol/ mg Prot.	<i>Sanaka et al., 2001</i> <i>Sugiyama et al., 1998</i>

Krea.: Kreatinin; Prot.: Protein; KG: Körpergewicht

Neben Pentosidin, das nach *Miyata et al. (1996)* im Plasma zu mindestens 90 % an Albumin gebunden vorkommt, konnten auch GOLD und MOLD (*Nagaraj et al., 1996, Odani et al., 1998, Tessier et al., 1999, Chellan et al., 1999*), Glucosepan (*Lederer et al., 1999, Biemel et al., 2002*), GODIC, MODIC, DODIC (*Biemel et al., 2002*) sowie Vesperlysin A (*Eble et al., 1983*) als Quervernetzungsprodukt *in vivo* nachgewiesen werden. Glucosepan soll dabei mit 13 bis 20 pmol/ mg Protein in humanem Serumalbumin und bis zu 240 pmol/ mg Linsenprotein das Hauptprodukt darstellen (*Biemel et al., 2002*).

Beim gesunden Menschen kommt es mit zunehmender Lebensdauer durch permanente Gegenwart von Zuckern in der Zirkulation über Jahre zu einer kontinuierlichen Bildung und Anreicherung von MRPs in langlebigen Geweben. Abbildung 2.3-1 orientiert schematisch über den zeitlichen Ablauf der MRP-Bildung *in vivo*.

Altersabhängige Zunahmen der Glykierung sind zum Beispiel bekannt für fructosylierte Sehnen- und Aortengewebe (*Schleicher und Wieland, 1986*), für Pentosidingehalte in Urin, Serum und Kollagen (*Yoshihara et al., 1998, Sell und Monnier, 1989*), sowie die Anreicherung von CML in Augenlinsenproteinen, Gewebekollagen (*Dunn et al., 1989, Dyer et al., 1993*) und der Haut (*Dunn et al., 1991*). Die Fructoselysinkonzentration in der Linse nimmt dagegen nur im Kindesalter zu (*Dunn et al., 1989*).

Entsprechend einer stärker altersbedingten Zunahme von CML und Pentosidin im Vergleich zu Fructoselysin (*Dyer et al., 1993*) steigt nicht nur der CML-Gehalt von Geweben, sondern auch das Verhältnis von CML zu Fructoselysin, was auf eine kontinuierliche Bildung von AGEs aus den Amadori-Produkten hindeutet (*Dunn et al., 1989, Knecht et al., 1991*). CML wird allgemein als das Hauptglykierungsprodukt *in vivo* angesehen (*Dunn et al., 1989*), wobei der Großteil proteingebunden vorkommt (*Makita et al., 1992*).

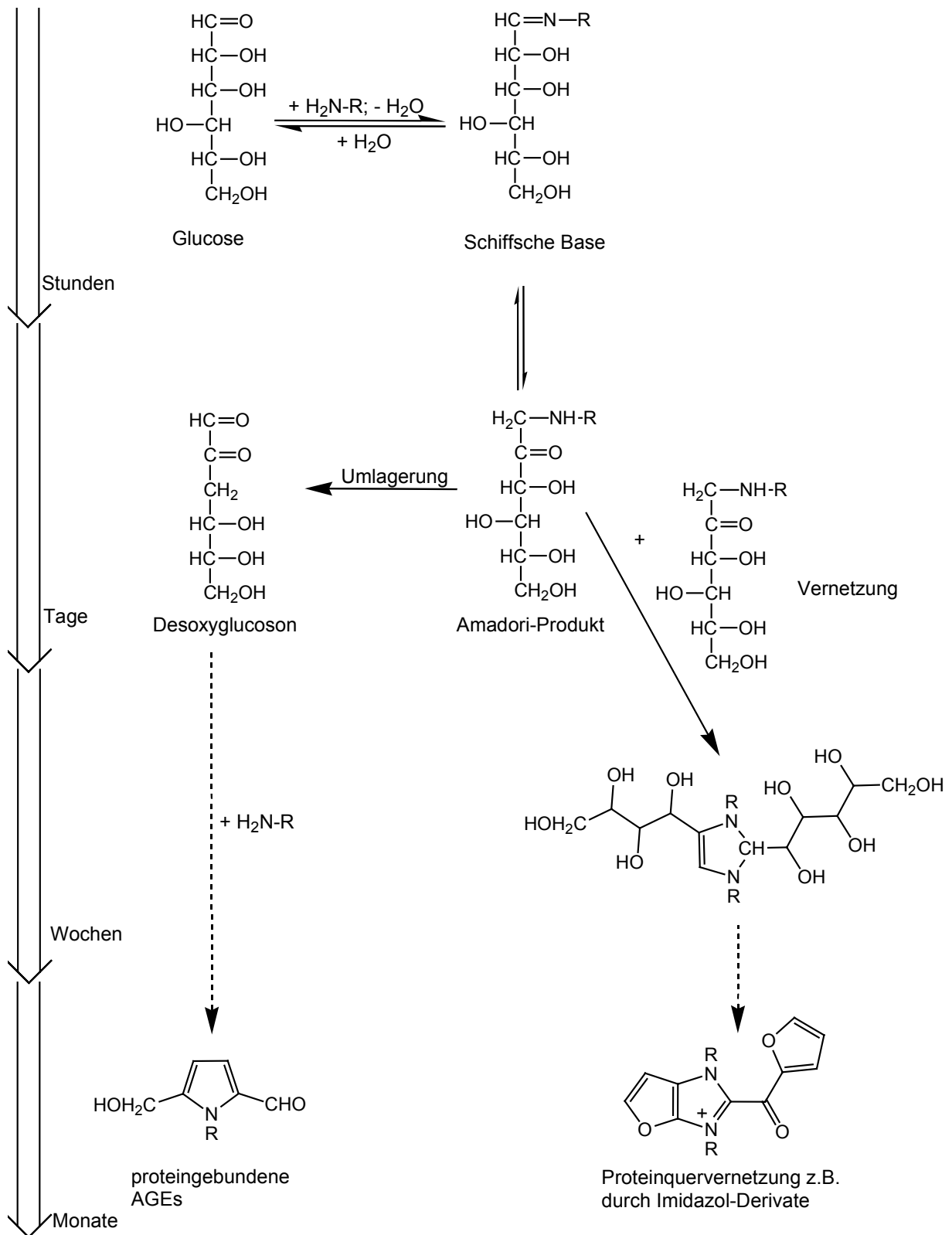


Abbildung 2.3-1: Zeitliches Schema der Maillard-Reaktion *in vivo* nach Till (1999); R: Aminosäurerest

Die Glykierung von Körperproteinen beeinflusst durch Modifizierung der räumlichen Struktur auch deren funktionelle Eigenschaften und führt zum Beispiel durch Quervernetzungsreaktionen zu einer verminderten Elastizität von Lungen, Arterien, Haut, Gelenken und Knochen. Auch die Eintrübung von Augenlinsen wird beschrieben (*Stevens et al., 1978*). Diese Erscheinungen treten bei Diabetikern aufgrund des erhöhten Blutzuckerspiegels beschleunigt auf (*Sell und Monnier, 1989, Baynes et al., 1991, Dunn et al., 1991, Dyer et al., 1993*). Daneben kann es zu einer Beeinflussung von Enzym- und Hormonaktivitäten kommen. Beobachtet wurden die Inhibierung von gastrointestinalen Proteasen durch Pyrralin (*Öste et al., 1997*) und eine Hemmung des Antithrombin III, was zu einer vermehrten Bildung von Fibrinpeptiden und damit zu Thrombosen führen kann (*Ledl und Schleicher, 1990*). Auch AGE-vermittelte Ablagerungen von plasmatischen Komponenten wie dem Low Density Lipoprotein (LDL) und Immunoglobulin durch verminderte Bindung an die entsprechenden Rezeptoren (*Brownlee et al., 1983, Witztum et al., 1982, Schleicher et al., 1985*) werden diskutiert. Darüber hinaus sind DNA-Veränderungen durch Reaktionen an Kernproteinen (Histonen) und Aminogruppen enthaltenden Basen (v.a. Guanin und Adenin bzw. Desoxyguanosin und Desoxyadenosin) im Sinne einer chemischen Desaminierung bis hin zu DNA-Strangbrüchen, verminderter DNA-Reparatur, -Replikation und -Transkription bekannt (*Lee und Cerami, 1990, Pischetsrieder et al., 1999, Schneider et al., 2004, Frischmann et al., 2005*).

Außer den direkten, Rezeptor-unabhängigen Wirkungen der AGEs auf die Funktionalität von Proteinen durch Glykierung und Quervernetzung wird auch die Beteiligung an rezeptorvermittelten Entzündungsgeschehen diskutiert. Durch Bindung an bestimmte Rezeptoren wie den Makrophage scavenger receptor und so genannte RAGE (receptor for advanced glycation endproducts), soll eine Signalkaskade ausgelöst werden, die zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Immunoglobulinen, Interleukinen und Tumornekrosefaktoren (TNF) führt. Bei RAGE handelt es sich um einen multiliganden Rezeptor aus der Superfamilie der Immunoglobuline. Er wurde auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen wie Makrophagen, Phagozyten, Lymphozyten, vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen sowie Organen wie Lunge und Niere nachgewiesen. Zu den Liganden zählen neben AGEs auch sogenannte S100/ Calgranuline, denen proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Als Konsequenz kommt es zur Proliferation von Bindegewebs-, Endothel- und glatten Muskelzellen sowie zu einer gesteigerten Kollagensynthese. Die Stimulation von RAGE führt darüber hinaus zur



Expression von bestimmten Gewebefaktoren, zur Produktion von Endothelin-1 sowie zur Bildung hochreaktiver O<sub>2</sub>-Spezies. Folgen sind eine verminderte Thromboresistenz, Vasokonstriktion und die Förderung oxidativer Modifikationen des LDL, was wiederum dessen Ablagerung in den Gefäßen begünstigt (*Till, 1999*).

Eine im Vergleich zu gesunden Melanozyten erhöhte RAGE-Expression wurde in Hautkrebszelllinien beobachtet. Die Zugabe von Glyceraldehyd- und Glykolaldehyd-AGEs nicht aber Glucose-, Methylglyoxal- und Glyoxal-AGEs zu den Zellmedien führte zu einer Stimulation des Wachstums, der Migration und Invasion der Zellen. *In vivo* konnten in Hautkrebszellen nur höhere Glyceraldehyd-AGE-Gehalte nachgewiesen werden (*Abe et al., 2004*). Auch *Takeuchi und Yamagishi (2004)* sehen in Glyceraldehyd-, Glykolaldehyd- und Acetaldehyd-AGEs die Hauptvertreter „toxischer AGEs“ während andere Strukturen wie CML, Pyrralin und Pentosidin als nicht toxisch eingeschätzt werden.

Neben seiner Rolle bei der Auslösung von Entzündungen diskutieren *Vlassara et al. (2001)* RAGE im Zusammenhang mit dem Abbau von AGEs (vgl. Kapitel 2.4.3), stellen aber das inflammatorische Potential durch Zusammenspiel von AGE und RAGE in den Vordergrund.

Entgegen diesen negativen Wirkungen auf den Organismus werden einigen MRPs auch positive, antioxidative und antikanzerogene Wirkungen zugeschrieben. Diskutiert werden zum Beispiel das Abfangen von Sauerstoffradikalen (*Aeschenbach et al., 1990, Hayase et al., 1990*) sowie eine Verminderung der Absorption von Mutagenen durch deren Bindung an Melanoidine, wie am Beispiel von Kaffee beobachtet (*Powrie et al., 1986*). Eine antioxidative Aktivität von erhitzten Mischungen von Casein, Histidin, Lysin oder Arginin mit Glucose zeigten *Chuyen et al. (1990)* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Fütterung der Präparate an Ratten mit induziertem Vitamin E-Mangel. In späteren Untersuchungen zeigte die Fütterung von glykiertem Sojaprotein und Casein an diabetische Ratten im Vergleich zu einer mit nicht glykiertem Protein gefütterten Kontrollgruppe keinen Effekt auf die Lipidperoxidlevel in Leber, Niere und Linsen der Tiere sowie die Aktivität der Superoxiddismutase in den Erythrozyten der Leber. Die Kontrollgruppe wies eine leicht höhere Tendenz zur Entwicklung eines Kataraktes auf (*Chuyen et al., 2005*). *Lindenmeier et al. (2002)* zeigten die antioxidative Aktivität von alkoholischen Brotkrustenextrakten sowie eine Aktivierung der Glutathion-S-Transferase (Phase II Enzym) und eine Hemmung der Aktivität der NADPH-Cytochrom C Reduktase (Phase I Enzym) in intestinalen Caco 2 Zellen. Phase I Enzyme gelten als

Aktivatoren von Karzinogenen, Phase II Enzyme sind an der Detoxifizierung beteiligt. Als aktive Verbindung identifizierten die Autoren in Modellansätzen pronylierte Aminosäuren wie Pronyllysin, denen sie eine chemopräventive Aktivität zuschreiben. Die Bildung von Pronyllysin in Lebensmitteln wie Brot bzw. Brotkruste beschreiben *Somoza et al. (2005a)*, wie in Abbildung 2.3-2 dargestellt, durch Reaktion des aus Glucose gebildeten Acetylformoins mit Lysin. Sie beobachteten auch *in vivo* eine erhöhte antioxidative Kapazität sowie die Aktivierung chemopräventiver Enzymsysteme nach Fütterung von Brotkruste und pronyliertem Albumin an Ratten.

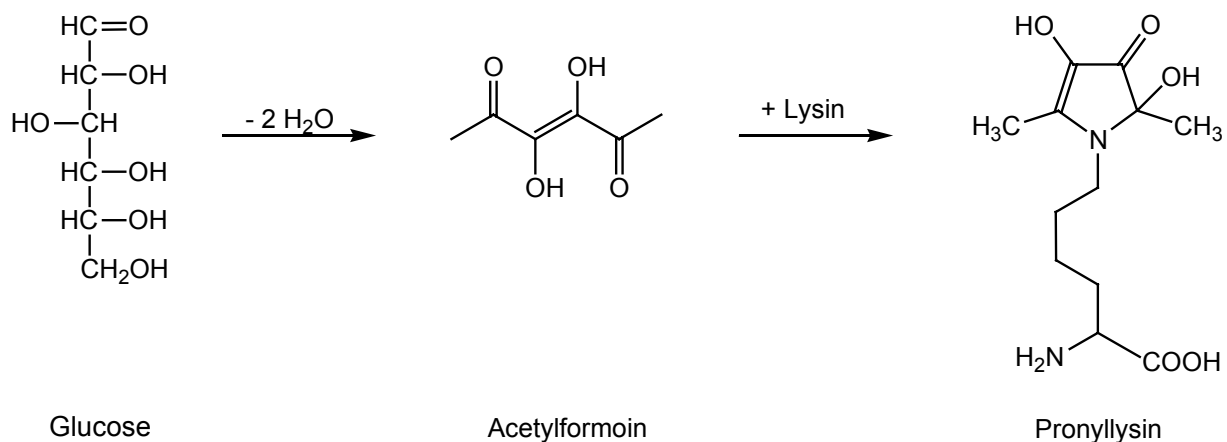


Abbildung 2.3-2: Bildung von Pronyllysin aus Glucose und Lysin

Die Inkubation von humanen Magenkrebszellen mit UV-aktiven Furan- und Pyrankondensationsprodukten führte *in vitro* zu einer Wachstumsinhibierung der Tumorzellen durch Apoptose und Unterbrechung des Zellzyklus (*Marko et al., 2003*).

*Borelli et al. (2004)* diskutieren neben antioxidativen auch prebiotische Eigenschaften von Melanoidinen und führen den für Silberhäutchen gerösteten Kaffees beobachteten bifidogenen Effekt zum Teil auf deren Gehalt an Maillard-Produkten zurück. Ähnliche Ergebnisse erhielten sie bei Untersuchungen zur prebiotischen Wirkungen von Brotkrustenmelanoidinen. Nach enzymatischer Hydrolyse der Kruste mit Pronase E und Auftrennung des erhaltenen wässrigen Extraktes zeigte die Molmassenfraktion  $> 10$  kDa eine wachstumsfördernde Wirkung auf Bifidobakterien *in vitro* während potentiell pathogene Darmbakterien wie Clostridien und coliforme Bakterien nicht beeinflusst wurden (*Borrelli und Fogliano, 2005*).

Die grundsätzliche Fähigkeit von Darmbakterien, Melanoidine > 3 kDa zu metabolisieren und als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu nutzen zeigten *Ames et al. (1999)* durch Inkubation von Bakterienkulturen mit Melanoidinen aus erhitzten Reaktionsmischungen von Lysin und Glucose.

### **2.3.1 Analytik von MRPs in physiologischen Medien**

Bei Nachweis und Bestimmung von MRPs in physiologischen Medien dominierten zunächst phänomenologische und immunologische bzw. immunohistochemische Methoden. Als Messgröße dienen dabei Auftreten und Veränderung der für AGEs als spezifisch angesehenen Fluoreszenz oder Reaktionen mit mehr oder minder spezifischen Antikörpern. AGEs werden so als Summenparameter erfasst und die beobachteten Effekte nicht auf definierte Verbindungen zurückgeführt.

Immunologische Methoden werden oft zur Bestimmung von proteingebundenen AGEs herangezogen um die für chromatographische Trennungen nötigen Aufarbeitungsschritte wie Hydrolysen und Derivatisierungen zu umgehen. ELISA („enzyme linked immuno sorbent assay“) -Techniken kommen daher häufig bei der Bestimmung von CML zum Einsatz (z.B. *Schleicher et al., 1997*). Als problematisch anzusehen ist bei diesen Methoden, dass die Kalibration der immunologischen Systeme meist nicht mit dem eigentlichen Analyten erfolgt, sondern mit ähnlichen Verbindungen wie zum Beispiel den Caproylderivaten bei der Bestimmung von CML und Pyrralin. Neben möglichen Kreuzreaktionen ist daher auch die Vergleichbarkeit des Verhaltens der verwendeten Standardsubstanz mit dem eigentlichen Analyten sowie unterschiedliche Zugänglichkeit der Zielstrukturen in verschiedenen Matrices bzw. Proteinen zu berücksichtigen. Kreuzreaktivitäten bzw. unspezifische Wechselwirkungen wiesen *Richter et al. (2005)* für den polyklonalen AGE-Antikörper K2189 mit den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Valin und Methionin nach deren Inkubation mit verschiedenen Carbonylverbindungen, sowie für den monoklonalen CML-Antikörper 4G9 mit Carbonyl-modifizierten Argininseitenketten nach. Aus diesen Gründen kommen in den letzten Jahren vermehrt chromatographische und massenspektrometrische Methoden zum Einsatz. Im Folgenden wird konkreter auf die Analytik der für die Arbeit relevanten Verbindungen eingegangen.

Die Bestimmung von Amadori-Produkten bzw. Fructoselysin erfolgt im allgemeinen wie in Kapitel 2.2.1 für Lebensmittel beschrieben durch die Furosinmethode nach saurer Hydrolyse der jeweiligen Probe und Berechnung des ursprünglichen Amadori-Produkt-Gehaltes. Daneben nutzten *Miyata et al. (1996a)* ein Testkit von Roche Ltd. Japan, das die Reduktionseigenschaften von Fructoselysin im alkalischen Milieu zur colorimetrischen Bestimmung ausnutzt.

Den Nachweis der Pyrralinbildung unter physiologischen Bedingungen führten *Njoroge et al. (1987)* in Modellsystemen. 1989 entwickelten *Hayase et al.* einen ELISA-Test zur Bestimmung von proteingebundenem Pyrralin in Blutproben. Der Immunoassay war allerdings relativ unspezifisch, da Lysyl-pyrralin nur eine Affinität von 2 % bezogen auf das Standardimmunogen Caproylpyrralin aufwies. *Odani et al. (1996)* entwickelten Mitte der 90er Jahre eine HPLC-ESI-MS Methode zur Bestimmung von freiem und proteingebundenem Pyrralin. Die Freisetzung des gebundenen Derivates erfolgte nach Fällung der Proteinfraction und enzymatischer Hydrolyse. Der Bestimmung des freien Derivates ging eine Größenausschlussfiltration zur Trennung von der Proteinfraction voraus. *Portero-Otin et al. (1997a und b)* koppelten die Hochleistungsflüssigchromatographie mit UV-Detektion zur Bestimmung von Pyrralin in Urinproben.

Die Bildung von CML zeigten *Ahmed et al. (1986)* durch den Nachweis der Spaltung von N<sup>α</sup>-Formyl-N<sup>ε</sup>-Fructoselysin unter physiologischen Bedingungen zu CML und Erythronsäure. Die Nachbildung von CML aus Fructoselysin führt bei der Bestimmung nach saurer Hydrolyse zu überhöhten Werten (*Dunn et al., 1990, Knecht et al., 1991*). *Schleicher et al. (1997)* umgingen dieses Problem durch Verwendung eines kompetitiven ELISAs auf Basis eines Kaninchen-CML-Antiserums. Der Antikörper reagierte gegenüber dem proteingebundenen CML 50fach empfindlicher als gegenüber dem freien Derivat und erfasste damit vorrangig die gebundene Carboxymethylaminosäure. *Friess et al. (2003)* beschrieben eine HPLC-Methode an Umkehrphasen mit Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) zur Bestimmung von freiem und proteingebundenem CML in Urin. Problematisch bei dieser Methode ist die Stabilität der OPA-Derivate sowie die Vollständigkeit der Umsetzung. Gleiches gilt für die von *Knecht et al. (1991)* zur Bestimmung in Urin beschriebene GC-MS-Methode nach Derivatisierung zu den Trifluoressigsäuremethylestern.

Bei der Bestimmung von Pentosidin macht man sich dessen natürliche Fluoreszenz zunutze. Erste quantitative Daten in physiologischen Medien ermittelten *Sell und Monnier (1989)* mittels Umkehrphasen-HPLC mit Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 335$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 385$  nm. Die Bestimmung durch ELISA-Techniken wurde von *Taneda und Monnier (1994)* eingeführt. *Miyata et al. (1996 und 1998)* wiederum nutzten die HPLC-Methode zur Bestimmung der isotonenmarkierten Verbindung in Blut, Plasma, Urin und Geweben, sowie anti-Pentosidin-Antikörper zum immunohistochemischen Nachweis des Imidazols in Geweben.

Erste Multimethoden zur Bestimmung verschiedener freier und proteingebundener AGEs basieren auf flüssigchromatographischen Trennungen gekoppelt mit Fluoreszenz- (*Ahmed et al., 2002*) oder Tandem-Massenspektrometrie mit Multireaktionsmonitoring (*Ahmed et al., 2003* und *Ahmed et al., 2005*). Der Fluoreszenzdetektion geht, soweit die Produkte keine Fluorophore sind, eine Derivatisierung mit 6-Aminochinoly-N-hydroxysuccinimidylcarbammat voraus. Die Quantifizierung nach massenspektrometrischer Detektion erfolgt mit Hilfe der isotonenmarkierten Analyten als interne Standards. Erfasst werden mit beiden Methoden Derivate des Lysins, wie Fructoselysin, Pyrralin und CML, und des Arginins, wie Argpyrimidin und Hydroimidazolone, sowie deren Quervernetzungsprodukte, wie Pentosidin, GOLD und MOLD. Zur Freisetzung der peptidgebundenen AGEs aus dem Proteinverband nutzen die Autoren ein enzymatisches Hydrolysesystem. Als entscheidend für die Aussagekraft der Ergebnisse ist in diesem Zusammenhang der auf diesem Wege erreichbare Hydrolysegrad anzusehen, der in Abhängigkeit der abzusplittenden Verbindung stark variieren kann. Zudem ist die Nachbildung von Maillard-Reaktions-Produkten wie Pyrralin während der Hydrolyse nicht auszuschließen, da mehrere Tage entsprechend der pH-Optima der verwendeten Enzyme im zum Teil neutralen bis basischen Bereich inkubiert wird.

### **2.3.2 Zusammenhang von MRPs mit Stoffwechselerkrankungen**

Beobachtungen, dass die extrazelluläre Matrix betroffener Gewebe bei Diabetikern verstärkt nichtenzymatisch glykosyliert ist, führten zu einer intensiveren Betrachtung des Zusammenhanges von Alterungserscheinungen und Stoffwechselerkrankungen mit den Gehalten an Glykierungsprodukten *in vivo*. Im Blickpunkt stehen hier vor allem Diabetes mellitus und Nierenfunktionsstörungen bzw. deren (vaskuläre) Folgeerkrankungen, sowie typische Alterskrankheiten wie Morbus Alzheimer und grauer Star. Auf einen Zusammenhang

von Hyperglykämie und Diabetesfolgeerkrankungen deuteten Untersuchungen hin, die belegen, dass die Schwere solcher Folgeerkrankungen mit dem Ausmaß der Gewebeglykierung korreliert (*Vogt et al., 1982*). In Schaumzellen und arteriosklerotischen Plaques wurden besonders hohe Gehalte an CML nachgewiesen (*Schleicher et al., 1997*). Nicht nur Gewebe sondern auch Matrices wie Plasma, Serum und Urin weisen bei Diabetikern und Nierenkranken im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Gehalte an Pyrralin, Pentosidin, Fructoselysin und CML auf (*Brownlee et al., 1980, Erbersdobler et al., 1986, Knecht et al., 1991, Odetti et al., 1992, Portero-Otin et al., 1997a, Schleicher et al., 1997*). Als Ursache hierfür wird bei Diabetikern eine verstärkte endogene Bildung infolge hyperglykämischer Stoffwechsellagen angeführt. Belegt wird diese These durch Beobachtungen die zeigen, dass Gehalte und renale Exkretion von Pyrralin und Fructoselysin bei Diabetikern mit den HbA<sub>1c</sub>-Werten, also dem Glucose-modifizierten Hämoglobin, und damit mit der Blutzuckereinstellung korrelieren (*Knecht et al., 1991, Portero-Otin et al., 1997a*). Darüber hinaus wird eine Anreicherung der im Vergleich zu Glucose 10 mal reaktiveren Fructose (*McPherson et al., 1988*) in diabetischen Geweben durch verstärkte Glucosemetabolisierung über den Polyolweg beschrieben (*Malone et al., 1980, Cohen et al., 1987*). Folgeerscheinungen des Diabetes wie diabetische Retinopathie gehen bei Patienten mit schlechter Blutzuckerkontrolle mit extrem hohen AGE-Gehalten einher und korrelieren direkt mit Dauer und Grad der Hyperglykämie (*Xu et al., 2003*).

Erhöhte Pyrralingehalte führen *Portero-Otin et al. (1997a)* darüber hinaus auf eine Anreicherung des Pyrralin-Prekursors 3-DG infolge dessen verminderten Abbaus zurück.

3-DG wird *in vivo* durch die Enzyme Aldehydreduktase und Aldosereduktase abgebaut, deren Aktivität bei Diabetikern stark variiert. Darüber hinaus wurde eine glykierte Form mit verminderter Aktivität nachgewiesen (*Takahashi et al., 1995*). Gegen eine verstärkte Pyrralinbildung aus 3-DG, welches *in vivo* entsteht, spricht, dass die Blockierung des Desoxyglucosons durch Aminoguanidin nur einen geringen Einfluss auf den Pyrralinplasmalevel in diabetischen Ratten (*Yamada et al., 1994*) hat. Als weiteren möglichen Grund für erhöhte Pyrralinwerte im Urin ziehen *Portero-Otin et al. (1997a)* die vermehrte Ausscheidung des Lysinderivates aufgrund einer ineffizienten glomerulären Barriere und damit einhergehend einer verminderten Retention in Betracht.

CML gilt *in vivo* als Marker für die oxidative Proteinschädigung (*Baynes et al., 1991, Dyer et al., 1991, McCance et al., 1993, Schleicher et al., 1997*). Wie für Pyrralin und Fructoselysin

beobachtet zeigten sich erhöhte Gehalte im Serum von Diabetikern (*Schleicher et al., 1997*) und ein im Vergleich zu gesunden Probanden beschleunigter altersabhängiger Anstieg in Geweben (*Baynes et al., 1991, McCance et al., 1993, Schleicher et al., 1997, Degenhardt et al., 1997*). Im Gegensatz zum Amadori-Produkt und zum Pyrrol beobachteten *Knecht et al. (1991)* allerdings nur wenig erhöhte CML-Gehalte im Urin von Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden ( $1,2 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,3$   $\mu\text{g} / \text{mg}$  Kreatinin). *Friess et al. (2003)* berichten von einer um 30 % erhöhten Gesamt-CML-Ausscheidung bei Diabetikern, wobei die Exkretion von freiem CML (40 % des Gesamtwertes) nicht beeinflusst wird. Wie auch *Wagner et al. (2001)* sehen sie keine Korrelation zu Markern der Blutzuckereinstellung, der Dauer des Diabetes sowie Folgeerscheinungen wie Neuropathien oder Retinopathien, aber zur Exkretion von Albumin bzw. Proteinen. Die Korrelation zu Albuminurie deutet auf endogene CML-Quellen hin, da Albumin langlebig und lysinreich ist.

In Hinblick auf die Quervernetzungsprodukte zeigten sich bei Diabetikern im Vergleich zu Gesunden nur für Glucosepan und DODIC erhöhte Serumgehalte (*Biemel et al. 2002*). Glucosepan zeigte darüber hinaus Korrelation zur Blutzuckereinstellung.

Im Falle von Nierenfunktionsstörungen wird neben der verstärkten endogenen Bildung auch eine verminderte glomeruläre Filtration und Exkretion von AGEs als Ursache von erhöhten Serum-, Plasma- und Gewebekonzentrationen diskutiert (*Gugliucci et al., 1996, Miyata et al., 1998*). In der Literatur sind erhöhte Gehalte bei Nierenfunktionsstörungen für Gesamt-AGE (ELISA) (*Papanastasiou et al., 1994, Dolhofer-Bliesener et al., 1996*), fluoreszierende AGE (*Henle et al., 1999, Gerdemann et al., 2000, Münch et al., 1997*), niedermolekulare AGE (*Makita et al., 1991 und 1994*) sowie für die individuellen Verbindungen CML, Pentosidin und Pyrralin (*Odetti et al., 1992, Hricik et al., 1993, Degenhardt et al., 1997, Friedlander et al., 1995 und 1996, Miyata et al., 1997, Odani et al., 1996*) nachgewiesen. Die Serumwerte für CML liegen bei Niereninsuffizienz im Endstadium drei bis viermal (*Weiss et al., 2000, Gerdemann et al., 2000*), und für Pentosidin fünf- bis fünfundzwanzigfach höher als bei Diabetikern oder Gesunden mit normaler Nierenfunktion (*Makita et al., 1994*). Die Exkretion, zum Beispiel von CML, ist bei eingeschränkter Nierenfunktion dagegen erniedrigt und korreliert invers mit der Kreatininclearance (*Wagner et al., 2001*). Die Anwendung von Hämodialyse führte zu einer weiteren signifikanten Erhöhung der Gehalte an proteingebundenem Pyrralin im Plasma während das freie Derivat nicht beeinflusst wurde (*Odani et al., 1996*). Letzteres wird demnach dem Kreatinin vergleichbar durch die Dialyse

eliminiert, während das gebundene schon aufgrund seiner Größe nicht entfernt wird. Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Dialysemembranen bei der Hämodialyse zeigten eine Abhängigkeit der Clearance und damit der Serumwerte von CML und Pentosidin von der Porengröße der Dialysemembran (*Agalou et al., 2003*).

Der Einfluss der Nierenfunktion auf die *in vivo* Level von AGEs ist ein Indiz für den Stellenwert der Niere für die AGE-Metabolisierung (*Schleicher et al., 1997*). Deutlich wird dies auch in Studien von *Miyata et al. (1996)*, die zeigten, dass die Eliminierung von oral oder intravenös appliziertem freiem Pentosidin aus dem Plasma mit zunehmender Nierenfunktionsstörung verzögert wird.

Neben den AGEs sind auch Prekursoren wie 3-Desoxyglucosulose (3-DG) im Plasma von Diabetikern signifikant erhöht (*Niwa et al., 1999*) und korrelieren mit den Blutzuckergehalten und den HbA<sub>1c</sub>-Werten (*Wells-Knecht et al., 1994, Xu et al., 2003*). Keine Korrelation konnte zum Lebensalter oder zur Dauer des Diabetes festgestellt werden (*Tsukushi et al., 2002*).

Allgemein steigen die Serumlevel in der Reihenfolge: Gesunde < Diabetiker < undialysierte Urämiker < Urämiker mit Hämodialyse < Urämiker mit kontinuierlicher Peritonealdialyse. Bei Urämie scheint eine verminderte 3-DG-Reduktaseaktivität, möglicherweise durch Glykierung des Enzyms, entscheidend für die Anreicherung zu sein, da es so zu einer verminderten Detoxifizierung von 3-DG zu 3-Desoxyfructose (3-DF) kommt. 3-DF erscheint im Urin Gesunder Probanden als Metabolit des Glucosons (*Niwa et al., 1999*). Die Autoren gehen davon aus, dass 3-DG in Hinsicht auf biologische Konsequenzen von größerer Bedeutung sein könnte als AGEs. Imidazolone wurden als Folgeprodukte von 3-DG bereits *in vivo* in Amyloidablagerungen von Hämodialyse-Patienten und in den Nieren, Aortengewebe arteriosklerotischer Läsionen und Erythrozyten von Diabetikern nachgewiesen (*Niwa et al., 1997*).

Noch unklar ist, ob erhöhte AGE-Gehalte *in vivo* Ursache oder Folge von pathophysiologischen Ereignissen darstellen. Als Hinweis auf die direkte Beteiligung am Krankheitsgeschehen deuten *Wautier et al. (1998)* die Beobachtung, dass eine Blockierung des AGE-Rezeptors (RAGE) in hyperglykämischen diabetischen Mäusen (db/db Mäuse) funktionelle und strukturelle Veränderungen in der Niere unterdrückte. Im Humantest zeigte Aminoguanidin als Inhibitor der AGE-Bildung einen Trend zur Verbesserung der



Nierenfunktion bei Diabetikern mit Nephropathie (*Wendt et al., 2003*). Als kompetitiver Hemmstoff der AGE-RAGE-Wechselwirkung untersucht wird auch der freie Rezeptor, sogenannter sRAGE (löslicher RAGE).

Zu berücksichtigen ist bei den Rezeptor-vermittelten Wirkungen insgesamt, dass es sich bei RAGE um einen Multiligandrezeptor handelt, der nicht ausschließlich AGEs bindet.

Der Frage, welche Strukturen genau notwendig sind um an RAGE zu binden, gingen *Valencia et al. (2004a und b)* nach. Es zeigte sich, dass die Affinität von glykiertem Rinderserumalbumin (BSA) in Abhängigkeit der Zucker- bzw. Carbonylkomponente in der Reihenfolge Glycolaldehyd > Ribose > Fructose > Glucose >> Glyoxylsäure abnimmt. Die Bindung konnte dabei weder auf Gehalte an spezifischen AGEs wie CML und Pentosidin noch auf Eigenschaften wie die Fluoreszenz zurückgeführt werden. Einzig der Gehalt freier Aminogruppen korrelierte mit der Affinität zum Rezeptor. Dies deutet zum einen darauf hin, dass es nicht nur auf Menge sondern möglicherweise auch auf die Position oder Zugänglichkeit der Modifizierung ankommt. Zum anderen sind wohl auch nicht fluoreszierende Komponenten entscheidend an der Bindung beteiligt. Allen RAGE-Liganden gemeinsam scheint eine negative Gesamtladung der Verbindungen bei physiologischem pH-Wert zu sein. Eine eindeutige Aussage, wie ein Molekül beschaffen sein muss, um eine Immunantwort über die Bindung an RAGE auszulösen, kann bis zum heutigen Zeitpunkt nicht getroffen werden.

Einen ursächlichen Zusammenhang von Plasma-AGEs und pathophysiologischen Ereignissen widersprechen Daten von *Schwedler et al. (2002)*, die mehr als 300 Hämodialysepatienten über einen Zeitraum von 32 Monaten bezüglich Sterblichkeit und Todesursache beobachteten. Die Patienten wurden dabei entsprechend ihrer Serumgehalte an CML, AGE-Fluoreszenz und C reaktivem Protein (CRP), einem Marker für akute Entzündungsgeschehen, erfasst. Es zeigte sich, dass Patienten mit hohen CML- bzw. Fluoreszenzwerten im Serum im beobachteten Zeitraum eine signifikant niedrigere Sterblichkeitsrate aufwiesen als die entsprechende Vergleichsgruppe. Die höchste Sterblichkeit zeigten Teilnehmer mit niedriger Fluoreszenz- und hohen CRP-Werten. Der Einfluss der Fluoreszenz war dabei größer als der der CML-Gehalte. Die Autoren diskutierten die beobachteten AGE- und CML-Gehalte als Konsequenz des Ernährungszustandes der Teilnehmer. Sie schlossen einen generellen Zusammenhang zwischen erhöhten AGE-Levels und pathophysiologischen Ereignissen nicht aus, stellten aber

die Eignung der Serumwerte der entsprechenden Verbindungen als Maß in Frage. Sie verwiesen auf die möglicherweise größere Relevanz intrazellulärer AGEs.

### **2.4 Physiologische Konsequenzen exogener MRP-Quellen**

Vor dem Hintergrund von Studien zu erhöhten AGE-Gehalten in physiologischen Medien und mit dem Wissen um die vergleichsweise großen MRP-Mengen in der täglichen Nahrung stellt sich die Frage nach der Rolle exogener MRP-Quellen im Zusammenhang mit Stoffwechselerkrankungen und Alterserscheinungen.

Hinweise auf die Nahrung als wichtige Quelle für zirkulierende AGEs ergeben sich aus Beobachtungen von *Miyata et al. (1996a)*, die Pentosidin im Plasma gesunder Ratten erst nach Fütterung mit entsprechend angereichertem Futter nachweisen konnten. Untersuchungen, die zeigten, dass der Anteil an freiem Pyrralin den des proteingebundenen in humanem Plasma übersteigt, deuteten *Odani et al. (1996)* als Indiz für die Bedeutung der Ernährung für zirkulierende AGEs. *Thornalley (1990)* und *Takeuchi et al. (2000)* sehen die Nahrung als Hauptquelle für Plasma-AGEs an. Dem entgegen stehen Studien, die belegen, dass AGEs grundsätzlich renal ausgeschieden werden. Neben dem Nahrungsmiteleinfluss beschäftigen sich auch vereinzelte Studien mit dem Effekt des Rauchens, zielen aber nicht konkret auf AGEs ab. So berichten *Cerami et al. (1997)* von erhöhten AGE-Gehalten in Serum, Arterien und Augenlinsen von Rauchern.

Da es sich bei Lebensmitteln grundsätzlich um eine sehr komplexe Matrix handelt, fällt es schwer, beobachtete Effekte konkret einzelnen Ursachen zuzuschreiben. Hinzu kommt, dass Studien zum Einfluss der Ernährung auf Krankheitsgeschehen vorrangig an vorerkrankten Personen durchgeführt wurden, deren Physiologie nur eingeschränkt auf den gesunden Menschen übertragbar ist. Untersuchungen zum generellen Einfluss der Ernährung auf die Gehalte an Maillard-Produkten in physiologischen Medien existieren kaum. Grundvoraussetzung für die Teilnahme am Reaktionsgeschehen *in vivo* ist die Resorption der im Lebensmittel meist proteingebundenen Aminosäurederivate. Im Folgenden wird der Wissensstand zu Resorption und Metabolismus von Aminosäuren und -derivaten dargestellt.

### 2.4.1 Resorption, Metabolisierung und Exkretion von Aminosäuren und Proteinen

Nahrungsproteine werden bei der Verdauung im Gastrointestinaltrakt unter anderem durch Pepsin und Trypsin enzymatisch zu Aminosäuren und kleineren Peptiden hydrolysiert. Diese Abbauprodukte werden anschließend über die Mukosazellen der Darmzotten resorbiert. Beim Säugling kommt es außerdem in geringem Maß zur Aufnahme von intakten Proteinen. In den Mukosazellen enthaltene zytoplasmatische Peptidasen spalten aufgenommene Peptide zu Aminosäuren, die dann ins Pfortaderblut abgegeben werden und dem Stoffwechsel zur Verfügung stehen. Im Darmtrakt verbleibende Proteinen und Aminosäuren unterliegen im Dickdarm bakteriell induzierten Abbaureaktionen, die durch Decarboxylierung zur Bildung toxischer biogener Amine führen können. Diese werden zum Teil resorbiert und über die Pfortader zur Leber transportiert wo sie durch Sulfatierung oder Glucuronierung entgiftet, nierengängig gemacht und im Anschluss renal ausgeschieden werden. Von der Pfortader gelangen die Aminosäuren zunächst in die Leber, wo sie der Biosynthese von Proteinen zur Verfügung stehen oder unter Ammoniakabspaltung in Ketocarbonsäuren umgewandelt werden, die dann wiederum in die Lipo- oder Gluconeogenese eingehen können. Ein weiterer Teil gelangt in den Systemkreislauf und damit in Muskeln und andere Gewebe und dient hier der Proteinbiosynthese. In diese Neogenese fließen auch Aminosäuren aus dem Proteinkatabolismus wieder ein. Im Gegensatz zu den Peptiden existieren für Aminosäuren spezifische, sekundär aktive, energieabhängige Transportsysteme, die gegen ein Konzentrationsgefälle arbeiten. Bislang wurden zwei spezifische Transportproteine identifiziert, die für die Aufnahme von basischen bzw. neutralen Aminosäuren zur Verfügung stehen. Beide Transporter wurden auch im renalen Tubulusepithel nachgewiesen. Gelangen freie Aminosäuren in die Nieren werden sie so zu einem Großteil rückresorbiert und stehen dem Organismus wieder zur Verfügung. Nicht wiedergewonnene Verbindungen <10 kDa werden in der Niere frei filtriert und über den Harn ausgeschieden (*Löffler und Petrides, 2003*). Die Zusammensetzung des Harns variiert im Tagesverlauf und in Abhängigkeit von der Ernährung und des Gesundheitszustands des Einzelnen. Beim gesunden Erwachsenen enthält der 24-h-Urin neben anorganischen Ionen, Harnstoff und anderen organischen Verbindungen ca. 70 mg Glucose, 60 mg Protein, 2 g Aminosäuren, 0,5 g Ammoniak und 1,2 g Kreatinin (*RÖMPP Online, Version 2.8, 13. Update*).

### 2.4.2 Resorption und Exkretion von MRPs

Da sowohl für den Transport als auch für die enzymatische Hydrolyse von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren funktionelle Einheiten wie Aminosäureseitenketten oder die Peptidbindung als solche von entscheidendem Einfluss sind, können sich Modifizierungen auf Verdaubarkeit, Resorption und Exkretion auswirken. Studien zum Metabolismus von MRPs wurden zunächst vor allem an Tier- und Zellmodellen sowie mit relativ undefiniert modifizierten Proteinen und wenigen Einzelsubstanzen durchgeführt. Studien am Menschen existieren lediglich für das Amadori-Produkt Fructoselysin.

Am Beispiel von verschieden lang mit Glucose inkubiertem Casein studierten *Mori und Nakatsuji (1977)* und *Finot und Magenat (1981)* den Einfluss der Erhitzung bzw. des Fortschrittes der Maillard-Reaktion auf die Verstoffwechslung von Lysin und dessen Derivaten. Im Tierversuch zeigten sie, dass die Exkretion der Lysinderivate über den Urin und vor allem über die Fäzes mit dem Erhitzungsgrad zunimmt, die Bioverfügbarkeit des Proteins demnach sinkt. Bei stark erhitzten Proben entsprachen die ausgeschiedenen Mengen der Lysinblockierung, während dies bei kürzerer Erhitzung nicht der Fall war. Offenbar unterliegen die früheren Produkte anderen metabolischen Mechanismen als die fortgeschrittenen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen bereits *Valle-Riestra und Barnes (1970)* bei Fütterung von mit Glucose erhitztem Hühnereiweiß an Ratten.

Weitere Studien (*Finot und Magenat, 1981, Homma und Fujimaki, 1981*) unterscheiden zwischen dem Metabolismus niedermolekularer Premelanoidine und hochmolekularer Melanoidine. Fütterungsstudien an Ratten zeigten, dass beide „Produktklassen“ grundsätzlich im Darm resorbiert und über die Nieren ausgeschieden werden können, wobei dies in größerem Ausmaß auf die niedermolekularen Verbindungen zutrifft. Der überwiegende Teil der gefütterten Melanoidinen (ca. 90 %) und Premelanoidinen (ca. 60 %) wurde jedoch in den Fäzes der Tiere wiedergefunden und demnach nicht resorbiert. Insgesamt gehen die Autoren davon aus, dass Melanoidine und Premelanoide vom Körper nicht verwertet werden, da sie entweder nicht resorbiert oder nach der Resorption, eventuell modifiziert, über den Urin ausgeschieden werden.

Mit dem Metabolismus definierter Maillard-Produkte beschäftigten sich ebenfalls *Finot und Magenat (1981)*, die durch Fütterung von freiem Fructoselysin an Ratten zeigten, dass 60 bis

70 % des ungebundenen Derivates über den Urin ausgeschieden und somit zunächst resorbiert werden. 10 % wurden in den Fäzes nachgewiesen. Bei einer analogen Studie mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Fructoselysin fanden sich 35 % der applizierten Strahlungs-dosis nach direktem Sonden in den Magen in der Atemluft der Tiere wieder. Bei intravenöser Gabe lag die Wiederfindung dagegen bei 2 %. Eine Veratmung findet demnach nur nach Darm-passage statt, was auf eine mikrobielle Verstoffwechslung hindeutet.

Zur Untersuchung von Resorption und Exkretion des proteingebundenen Derivates nutzten sie verschiedene Milchprodukte mit bekannten Amadori-Produkt-Gehalten. Die renale Exkretion der verfütterten Dosen lag bei 10 bis 15 %. Auch in den Fäzes lag die Wiederfindung mit 2 bis 3 % unter den für das freie Derivat beobachteten Werten. Ursache für die schlechtere Resorbierbarkeit des proteingebundenen Amadori-Produktes ist möglicherweise dessen unvollständige hydrolytische Freisetzung im Verdauungstrakt. Um diesen Prozess zu simulieren hydrolysierten sie die Proteinfractionen der Milchprodukte nach *Mauron et al. (1955)* mit Pepsin und Pankreatin, schlossen eine Dialyse an und bestimmten das Derivat in Dialysat und Retentat. Der Hauptanteil fand sich als peptidgebundenes Amadori-Produkt im Dialysat, freies Amadori-Produkt wurde nicht gefunden. Es erfolgt demnach keine vollständige Hydrolyse.

Weitere Hinweise auf eine verminderte Verdaubarkeit und Resorption von definierten Verbindungen erbrachten Arbeiten von *Erbersdobler et al., (1972, 1981, 1989)* die durch *in vitro* Studien an Darmpräparaten einen aktiven Transport von Lysin, nicht aber von fructosylierten Aminosäuren aus dem Darmtrakt zeigten. Weitere Untersuchungen mit abgebundenen Darmsegmenten ergaben, dass die Resorption von  $\epsilon$ -Fructoselysin durch passive Diffusion möglich, wenn auch im Vergleich zu Lysin stark verzögert ist. Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten *Sgarbieri et al. (1973)* die zeigten, dass die Absorption von glykierten Aminosäuren vor allem im Dickdarm stattfindet.

*Mori et al. (1977)* analysierten Urin, Dünndarminhalte, Fäzes und Atmungsgase von Ratten, denen mit Glucose inkubiertes Casein verfüttert wurde, dessen Lysinreste  $\text{U-}^{14}\text{C}_6$ -markiert waren. Durch die relativ unspezifische Markierung am Lysinrest wurden neben Fructoselysin auch andere Lysinderivate und die unmodifizierte Aminosäure miterfasst. Insgesamt gaben die Autoren die Verdaubarkeit von Fructoselysin mit 34 % an.

Ähnliche Experimente wurden von *Erbersdobler et al. (2001)* publiziert, wobei hier die Isotopenmarkierung über die zur Proteininkubation eingesetzte  $^{14}\text{C}_1$ -Glucose erfolgte, die Strahlung somit spezifisch für glykiertes Protein war. Beim Vergleich der im Urin wiedergefundenen Strahlungsdosis mit den durch Aminosäureanalyse ermittelten Fructoselysingehalten zeigte sich, dass letztere Methode niedrigere Werte lieferte. Die Autoren folgerten daraus, dass Fructoselysin *in vivo* zu ninhydrinnegativen Produkte abgebaut wird. Verdaubarkeit, Absorption und renale Ausscheidung von proteingebundenem Fructoselysin schätzten sie auf 10 bis 20 %. Noch geringere Werte von 6 bis 9 % gab *Finot (1973)* für Lactoselysin an, welches darüber hinaus als Fructosylaminosäure über den Urin ausgeschieden wurde, während in den Fäzes das ursprüngliche Derivat nachweisbar war. Weitgehend biologisch unverfügbar sind die Amadori-Produkte Fructosetryptophan (*Tanaka et al., 1975*), Fructoseleucin (*Sgarbieri et al., 1973*), und Fructosemethionin (*Horn et al., 1968*). Studien mit isotopenmarkierten Präparaten ergaben, dass eine signifikante Aufnahme erst nach Dickdarmpassage stattfindet, was auf die Notwendigkeit eines mikrobiellen Abbaus vor der Resorption hindeutet.

Auch das Auftreten von isotopenmarkiertem Kohlendioxid in den Atemgasen nach entsprechender Fütterung, wie von *Mori et al. (1977)*, *Finot et al. (1981)* und *Erbersdobler et al. (2001)* beschrieben, wird auf eine mikrobielle Verstoffwechslung von nicht resorbiertem Amadori-Produkt im Dickdarm zurück geführt. Weitere Belege lieferten *Erbersdobler et al. (1970 und 2001)*, die bei der Inkubation von fructosyliertem Protein mit Darminhalten von Schweinen bzw. Ratten, und damit mit der entsprechenden Mikroflora, eine Fructoselysinabnahme nachwiesen.

Humanstudien zeigten, dass auf den Verzehr von 1,2 bis 7,2 g Fructoselysin innerhalb von 12 h eine schnelle Ausscheidung über den Urin erfolgt, während die Exkretion über die Fäzes bis zu 72 h dauert (*Erbersdobler et al., 1991, Lee und Erbersdobler, 1994*). Die absolute Exkretion über Urin und Fäzes ist dabei mit  $< 5\%$  der applizierten Menge sehr gering. Die Ausscheidung über den Urin nimmt mit steigendem Verzehr sogar weiter ab. Deutlich höhere Wiederfindung zeigten sich bei Kleinkindern (*Niederweiser et al., 1975*), die grundsätzlich eine bessere Resorption höhermolekularer Verbindungen aufweisen. *Knecht et al. (1991)* geben für einen gesunden Menschen mit 70 kg Körpergewicht eine durchschnittliche Fructoselysinausscheidung von 5,6 mg pro Tag an. Dies entspricht nach *Brownlee et al. (1980)* etwa 10 % der täglichen Ausscheidung glykosylierter Aminosäuren. Auch das dem Fructoselysin analoge Amadori-Produkt des Disaccharids Lactose, Lactoselysin, wird

grundsätzlich über die Niere eliminiert. *Henle et al. (2000)* fanden nach definierter Lactoselysinzufuhr (1,9 g) ca. 2 % der verzehrten Menge im Urin der Probanden wieder und damit ähnlich geringe Exkretionsraten wie für Fructoselysin beschrieben.

Während *Finot und Magenat (1981)* von der unmodifizierten Ausscheidung von Fructoselysin über den Urin ausgingen, zeigten *Zyzak et al. (1995)*, dass N-Formyl-Fructoselysin und mit Amadori-Produkten modifiziertes Kollagen unter physiologischen Bedingungen *in vitro* verschiedene Zucker und 3-DG abspalten. 3-DG wiederum wird enzymatisch zu 3-Desoxyfructosulose (3-DF) abgebaut (*Kato et al., 1990*). Die 3-DF-Gehalte im Urin von Ratten entsprachen allerdings nur einer Wiederfindung von 1,4 % bezogen auf die Fructoselysin-zufuhr.

Als eine weitere mögliche Erklärung für die, im Vergleich zum Verzehr, geringe Fructoselysinausscheidung beschrieben *Zyzak et al. (1995)* den Abbau des Amadori-Produktes unter physiologischen Bedingungen *in vitro*. Ein Abbauprodukt stellt dabei CML dar. *Knecht et al. (1991)* schätzten das Ausmaß der Umsetzung zu CML auf durchschnittlich 30 %. Belegt wird dies auch durch den Nachweis von Erythronsäure in humanem Urin und die Beobachtung, dass Ratten nach Verzehr von mit Fructoselysin angereichertem Futter eine erhöhte CML-Ausscheidung aufwiesen (*Liardon et al., 1987, Wenzel et al., 2000*).

Untersuchungen zum Metabolismus von CML sind im Vergleich zu Fructoselysin rar. *Liardon et al. (1987)* beobachteten bei Ratten eine renale Exkretion von 4 bis 19 % des über die Nahrung zugeführten Derivates. Auf den Prozess der Resorption als limitierenden Faktor für diese relativ niedrige Wiederfindung lassen Studien von *Bergmann et al. (2001)* schließen. Sie verfolgten die *in vivo*-Verteilung und Eliminierung von intravenös appliziertem <sup>18</sup>F-markiertem CEL und CML in Ratten mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Nach schneller Distribution über den Blutkreislauf und vorübergehender Akkumulation in der Leber erfolgte innerhalb weniger Stunden eine zügige und nahezu vollständige Exkretion der intakten Verbindungen über die Nieren. Die schnelle Kinetik mit Anreicherung der Carboxyalkylaminosäuren in der Leber als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt weisen auf einen First-pass-Effekt hin. Eine Anreicherung in anderen Geweben wurde nicht beobachtet. Geringe Strahlungsdosen um 1 % wurden im Darm nachgewiesen, was auf einen geringen Transport der Verbindungen oder möglicher Stoffwechselprodukte aus der Leber über die Galle in den Intestinaltrakt hindeutet. Mit der Möglichkeit der Metabolisierung von AGEs

durch die Leber befassten sich auch *Smedsrod et al. (1997)* und *Svistounov et al. (2004)*, die im Modellsystem die Aufnahme proteingebundener AGEs in Leberendothelzellen über Scavenger-Rezeptoren nachwiesen. Im Gegensatz dazu schließen *Ahmed et al. (2003 und 2004)* eine Metabolisierung von AGEs durch die Leber weitgehend aus, da sie weder freie noch peptidgebundene Derivate in zu oder wegströmendem arteriellem und venösem Plasma der Leber nachweisen konnten. Dies wiederum führen *Svistounov et al. (2004)* auf die hohe Geschwindigkeit der Aufnahme in die Endothelzellen bzw. die daraus resultierenden geringen extrazellulären Konzentrationen zurück.

In Bezug auf die Verstoffwechslung von Pentosidin dokumentierten *Miyata et al. (1996a)* Belege für die Niere als Schlüsselorgan für dessen Eliminierung. Freies Plasmapentosidin (ca. 5 %) konnten sie in Ratten nur bei eingeschränkter Nierenfunktion nachweisen. Orale und intravenöse Gabe führte zu schneller Elimination bei gesunden und zu verzögerter bei nierengeschädigten Tieren. Darüber hinaus korrelierten die Plasmapentosidingehalte mit den Kreatiningehalten, was ebenfalls auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Elimination und der Nierenfunktion hinweist. Immunohistochemisch zeigten *Miyata et al. (1998)* zunächst eine Anreicherung von 30 % des Derivates in der Niere der Ratten, während in Urin, Blut, Plasma und Leber weniger als 1 % zu finden war. Nach 72 h waren 83 % der Strahlung über den Urin eliminiert. Nur 20 % davon konnten flüssigchromatographisch als intaktes Pentosidin identifiziert werden. Bei durch Gentamycin herbeigeführter tubulärer Fehlfunktion wurden bis zu 30 % intaktes Pentosidin im Urin wiedergefunden. Freies Pentosidin wird demnach bei Ratten durch die renalen Glomeruli gefiltert und in den proximalen Tubuli reabsorbiert und metabolisiert. Außerdem wurde eine schnelle Assoziation von Pentosidin an Körperproteine beobachtet. Einen Abbau im Urin selbst schlossen die Autoren aus, da bei 24-stündiger Inkubation von Pentosidin bei Raumtemperatur in Urin keine Verluste auftraten. Keine Angabe machen die Autoren zu möglichen Metaboliten sowie zur Resorption der peptidgebundenen Derivate nach oraler Gabe. Von Reabsorption, Abbau- und Modifizierung von AGE-BSA in der Niere berichten auch *Gugliucci et al. (1996)*, ebenfalls auf Basis von Untersuchungen an Ratten.

Ähnlich detaillierte Untersuchungen stehen für Pyrralin noch aus. Verminderte Gehalte im Urin bzw. Anreicherungen im Plasma bei eingeschränkter Nierenfunktion sprechen jedoch auch hier für die Niere als entscheidendes Organ für die Eliminierung. Befunde von *Portero-Otin et al. (1997a)* zeigten, dass die Pyrralingehalte im Urin von Diabetikern um eine



Größenordnung höher sind als die von Pentosidin, während im Plasma ähnliche Werte ermittelt wurden (*Hayase et al. 1989, Odetti, 1992*). Dies deutet auf eine im Vergleich zu Pentosidin verstärkte Elimination hin. Wie für Pentosidin gibt es noch keine Studien zu Verdaubarkeit und Resorption des proteingebundenen Pyrrolderivates.

Die Ursachen für die Diskrepanz zwischen MRP-Verzehr und -Exkretion sind vielschichtig. Denkbar sind die mikrobielle Verstoffwechslung im Darm, Metabolisierung und Abbau im menschlichen Körper sowie eine Anreicherung der Verbindungen in Geweben (*Faist, 2001*). Für Fructoselysin konnten alle drei Effekte nachgewiesen werden.

### **2.4.3 Abbau glykosylierter Proteine *in vivo***

*Vlassara et al. (1985)* beschrieben eine mögliche Detoxifizierung glucosemodifizierter Proteine durch rezeptorvermittelte Prozesse zur Entfernung gealterter Makromoleküle. Sie belegten dies mit der Beobachtung nicht näher spezifizierter Wechselwirkungen von peritonealen Mäusemakrophagen mit mit Glucose inkubiertem BSA. Demnach bindet das Protein an einen Rezeptor, wird aufgenommen und abgebaut. Gleiche Effekte wurden für 2-(2-Furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazolinon-BSA, FFI-BSA, als definiertes AGE-Analogon beobachtet. Bei FFI handelt es sich nicht um ein Maillard-Produkt im eigentlichen Sinne, sondern um ein Artefakt der Säurehydrolyse glykosylierter Proteine, dass aus der Reaktion von, ebenfalls bei der Hydrolyse gebildetem, Furosin mit Ammoniak entsteht (*Pongor et al. 1984, Horiuchi et al., 1988*). Die Anwesenheit von FFI-BSA führte zu einer kompetitiven Hemmung der Bindung von AGE-BSA an den Rezeptor. Die Gegenwart von nicht inkubiertem BSA zeigte keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung des AGE-BSA. In späteren Veröffentlichungen beschrieben *Vlassara et al. (1997)* die Aufnahme von AGEs in den intrazellulären Raum, wo sie durch Enzymsysteme zu „second generation AGEs“ abgebaut und anschließend über die Nieren ausgeschieden werden sollen. Auch *Horiuchi et al. (1990)* gehen von einem rezeptorvermittelten Abbau aus, fanden allerdings keine Ligandenaktivität für Pyrralin-BSA in Ratten.

Enzymatische Systeme zum Abbau von glykierten Proteinen sind seit Ende der 80er Jahre bekannt. Grundsätzlich kann zwischen Fructosylaminoxidasen und Fructosylaminkinasen unterschieden werden (*Wu und Monnier, 2003*). Fructosylaminoxidasen oxidieren Fructosylaminosäuren unter Bildung von Wasserstoffperoxid und hydrolytischer Spaltung des

Aminosäurederivates. Produkte sind in der Regel das entsprechende Glucoson und die Aminosäure. Die erste Isolierung einer Fructosylaminoxidase gelang *Horiuchi et al. (1989)* aus *Corynebacterium sp.* Nachgewiesen wurden die Enzyme mittlerweile neben Bakterien vor allem in verschiedenen Pilzen, z.B. Amadoriase I und II in *Aspergillus sp. (Takahashi et al., 1997 a und b, Wu et al., 2000)*, nicht aber in höheren Organismen.

Im Gegensatz dazu wurden Fructosylaminkinasen wie die Fructosamin-3-kinase auch aus Erythrozyten von Säugetieren isoliert (*Delpierre et al., 2000*). Beim enzymatischen Abbau wird das proteingebundene Fructoselysin zunächst am Zuckerrest zum Fructose-3-phosphat phosphoryliert und zerfällt im Folgenden spontan zum 3-Desoxyglucoson, anorganischem Phosphat und dem im Proteinverband verbleibenden Lysin (*Delpierre et al., 2000, Szwegold et al., 2001*). Fructosamin-3-kinasen sind in erster Linie in intrazellulären Medien (v. a. in Erythrozyten) zu finden und tragen hier zum Abbau glykierter Proteine bei, während sie im extrazellulären Raum des Blutes kaum einen Beitrag dazu leisten (*Wu et al., 2003*).

Auf den weiteren Abbau des 3-Desoxyglucosons (3-DG) wurde unter Kapitel 2.3.2 bereits kurz eingegangen. *Kato et al. (1990)* entdeckten 3-Desoxyfructosulose als Metabolit von 3-DG in Rattenurin. Es folgte der Nachweis in humanem Urin und Plasma durch *Wells-Knecht et al. (1992 und 1994)*, während die „Mutterverbindung“ nicht im Urin von gesunden aber von urämischen Probanden nachweisbar war. Ursache könnte eine verminderte 3-DG-Reduktaseaktivität, möglicherweise durch Glykierung des Enzyms, sein.

#### **2.4.4 Einfluss der Ernährung auf MRP-Gehalte *in vivo***

Nachdem gezeigt wurde, dass proteingebundene Maillard-Reaktions-Produkte zumindest teilweise resorbiert und eliminiert werden, stellt sich die Frage nach dem Beitrag alimentärer AGEs zu der im Körper zirkulierenden Gesamtheit. Verschiedene Arbeitsgruppen diskutieren die Ernährung als Hauptquelle für AGEs *in vivo* und werten deren entzündungsfördernde Wirkung als permanenten Risikofaktor für kardiovaskuläre und renale Schäden (*Vlassara et al., 2002, Goldberg et al., 2004*).

*Koschinsky et al. (1997)* untersuchten mittels eines AGE-ELISAs die Urin- und Serumgehalte ernährungsbedingter AGEs in Abhängigkeit von der Nierenfunktion. Als Testmahlzeiten setzten sie in An- oder Abwesenheit von Fructose erhitztes Eiklar ein. Der Verzehr der mit

Fructose erhitzten Nahrung führte dabei im Vergleich zu der ohne Fructose erhitzten zu einer Erhöhung von AGEs in Serum und Urin, wobei die Höchstwerte nach 4 bis 6 h erreicht wurden. Insgesamt gingen *Koschinsky et al.* (1997) von einer 10 %igen Absorption aus. Die Exkretion lag bei normaler Nierenfunktion innerhalb von 48 h bei ca. 30 % der resorbierten Menge. Mit zunehmender Nierenfunktionsstörung sank die Ausscheidungsrate auf weniger als 5 %. Die Autoren zogen die Möglichkeit der Bindung nicht ausgeschiedener AGEs an Strukturproteine in Betracht und beurteilten die Maillard-Produkte in diesem Zusammenhang als „Glycotoxine“. Sie sehen in der Vermeidung des Verzehrs alimentärer MRPs durch entsprechende Ernährungsempfehlungen und alternative Zubereitungsformen eine mögliche Maßnahme zur Begrenzung der AGE-Gehalte *in vivo*.

Im Tierversuch beobachteten *Vlassara et al.* (2003) das Auftreten nephropathischer Anzeichen bei herkömmlich ernährten, diabetischen Mäusen, während eine AGE-arme Diät selbst bei gleichzeitiger Hyperglykämie nicht dazu führte (*Zheng et al.*, 2000).

Auch *Uribarri et al.* (2003b) sehen in einer „AGE-armen“ Diät eine wirkungsvolle Möglichkeit die Konzentrationen toxischer AGEs *in vivo* zu minimieren und so bei Patienten mit Nierenerkrankungen die Sterblichkeit aufgrund von kardiovaskulären Folgeerkrankungen zu senken. Sie untersuchten mittels ELISA-Technik den Einfluss alimentärer AGEs auf die Serum- und Dialysatgehalte von CML und Methylglyoxal (MGO) bei nicht diabetischen Langzeitdialysepatienten. Die Probanden ernährten sich 4 Wochen durch Einsatz unterschiedlicher Zubereitungsformen „AGE-reich“ bzw. „AGE-arm“. Die in den Untersuchungsmedien gemessenen AGE-Gehalte korrelierten mit der entsprechend des Speiseplans abgeschätzten alimentären Zufuhr und dem jeweiligen Serumalbuminlevel. Die „AGE-arme“ Diät führte zu einer Absenkung der Serum-CML-Werte um 34 % (MGO: 35 %) und der Dialysat-Werte um 39 % (MGO: 40 %). Die „AGE-reiche“ Diät führte zu einem Anstieg der Serum-CML-Gehalte um 29 % (MGO: 26 %) und im Dialysat um 27 %. Die Autoren schlussfolgerten, dass alimentäre MRPs bei Patienten mit Nierenschädigungen zu signifikant erhöhten Gehalten an als „Glycotoxin“ eingeschätzten zirkulierenden AGEs beitragen.

*Peppia et al.* (2004) fanden nach einer „nieder-AGE-Diät“ zwar eine Verringerung der Entzündungsmarker TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), CRP (C reaktives Protein) und VEGF (vascular endothelial growth factor) im Plasma von Langzeitdialysepatienten um 20 bis 40 %,

eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den Werten vor der Ernährungsumstellung wurde jedoch nur für das C-reaktive Protein beobachtet. Keinen Einfluss hatte die Umstellung der Ernährung auf eine „AGE-reiche“ Diät. Auch eine Korrelation zwischen Entzündungsmarkern und Plasma-AGEs konnte nicht nachgewiesen werden.

*Goldberg et al. (2004)* beobachteten bei Senkung der alimentären AGE-Zufuhr eine Abnahme der AGE-Levels im Blutkreislauf und eine Verminderung des Krankheitsfortschritts im arteriosklerotischen und diabetischen Tiermodell. Der gleiche Effekt trat bei Diabetikern und Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion auf. Die Autoren leiteten daraus die Wertung der täglichen Nahrung als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, Entzündungsereignisse und vorzeitige Alterungsprozesse ab. Als Konsequenz wird der Verzehr von fettreduzierten, möglichst wenig erhitzten Nahrungsmitteln sowie eine Einschränkung des Fleischkonsums empfohlen.

Von Krankheitsgeschehen unabhängige Studien zur Auswirkung verschiedener vegetarischer Ernährungsformen sowie einer herkömmlichen Mischkost auf die AGE-Konzentrationen im Plasma, gemessen am CML-Gehalt (ELISA-Test) und der Gesamtfluoreszenz, führten *Sebekova et al. (2001)* durch. Entgegen der Ausgangsthese, dass Omnivoren höhere AGE-Gehalte im Plasma aufweisen als Vegetarier, zeigten die Nicht-Vegetarier sowohl eine niedrigere Plasma-Fluoreszenz als auch geringere CML-Gehalte. Als Begründung diskutierten die Autoren für Vegetarier eine höhere Zufuhr der im Vergleich zu Glucose reaktiveren Fructose durch vermehrten Verzehr von Obst und Trockenfrüchten. Im Tierversuch wiesen *Lingelbach et al. (2000)* dagegen nur einen geringen Einfluss der Art des verfütterten Zuckers auf die Akkumulation von AGEs nach. Als weitere AGE-Quelle wurde der vergleichsweise hohe Konsum an verarbeiteten Getreideprodukten wie Müsli und Backwaren angeführt. Dies deckt sich mit Aussagen von *Henle (2003)*, wonach Backwaren die Hauptquelle für AGEs darstellen, Fleisch und Fleischprodukte hingegen kaum entsprechende Derivate enthalten.

Als für diese Fragestellung problematisch anzusehen ist, dass auch hier im wesentlichen auf phänomenologischer Basis diskutiert wird. Studien, die Serum-, Urin- oder Gewebekonzentrationen von AGEs in Abhängigkeit eines definierten Verzehrs bestimmen, zielen in der Regel auf Veränderungen der Fluoreszenz ab oder nutzen ELISA-Techniken. Als Testmahlzeiten werden meist nur wenig charakterisierte Modelllebensmittel wie in Gegenwart von Zuckern erhitzte Proteine oder durch unterschiedliche Zubereitungsarten hergestellte

„hoch“ oder „nieder-AGE-Diäten“ eingesetzt, deren AGE-Gehalte meist über die oben genannten relativ unspezifischen Methoden bestimmt oder über den Speiseplan und Tabellenwerte (*Goldberg et al., 2004*) abgeschätzt werden. Differenzierte Angaben zum Gehalt individueller AGEs werden nicht gemacht und sind auch in der Literatur nur begrenzt vorhanden. Hinzu kommt, dass Studien häufig unter der Prämisse bestehender Vorerkrankungen der Niere oder des Glucosestoffwechsels durchgeführt werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass man es bei realen Lebensmitteln mit einer komplexeren Matrix zu tun hat, die neben dem großen Spektrum der MRPs eine Vielzahl an Inhaltsstoffen enthält, die gesundheitsschädliche aber auch -protektive Wirkungen haben können. Es fällt daher schwer, beobachtete Effekte konkret auf die An- oder Abwesenheit von Maillard-Produkten zurückzuführen.

Grundlage für Aussagen zur physiologischen Relevanz mit der täglichen Nahrung verzehrter Maillard-Reaktions-Produkte ist die Kenntnis um das Ausmaß der Zufuhr, der Resorption und des Verbleibs bzw. der Elimination individueller MRPs. Die Abkehr von der Betrachtung von AGEs als Gruppe hin zur Untersuchung definierter Strukturen ergibt sich dabei aus der weiten Spannbreite der möglichen Strukturen, einhergehend mit den zu erwartenden Unterschieden in Hinblick auf den metabolischen Transit, das pathogene aber auch das protektive Potential einzelner Verbindungen.

Aufgrund der lückenhaften Datenlage sowohl zum Gehalt definierter Maillard-Produkte in Lebensmitteln, als auch zu deren Resorption und Exkretion, ergab sich die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegende Zielstellung, Lebensmittel bezüglich ihres Gehaltes an individuellen MRPs zu untersuchen und durch definierte Zufuhr und Bestimmung der renalen Exkretion Aussagen zum jeweiligen metabolischen Transit zu treffen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien unter Angabe von Bestellnummer und Hersteller soweit im Text nicht anders vermerkt:

Acetonitril CHROMASOLV<sup>®</sup> gradient grade, 43851, Riedel-de Haën AG, Seelze

N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, A2010, Sigma-Aldrich, Seelze

Ameisensäure p.a., 33015, Riedel-de Haën AG, Seelze

Aminopeptidase M aus Schweinenieren EC 3.4.11.2, 102768, Roche, Mannheim

Ammoniumacetat z.A., 101116, Merck KGaA, Darmstadt

Borsäure z.A., 31146, Riedel-de Haën AG, Seelze

Dichlormethan puriss. (GC), 66749, Fluka, Buchs, Schweiz

Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, z.A., 106580, Merck KGaA, Darmstadt

Essigsäure 100 %, z.A., A0820, AppliChem GmbH, Darmstadt

Ethanol rein, 96% vergällt, 02893, Fluka, Buchs, Schweiz

Ethanol HPLC grade, E/ 0665, Chromatographie-Handel Müller GmbH, Fridolfing

Ethylacetat reinst, 100864, Merck KGaA, Darmstadt

Ethylendiamintetraessigsäure, 1.08418.0100, Merck KGaA, Darmstadt

Furosindihydrochlorid 98,5 %, SC494 G, Neosystems, Straßburg, Frankreich

Heptan-1-sulfonsäure Natriumsalz, H2766, Sigma-Aldrich, Seelze

N<sup>α</sup>-Hippuryllysin, G2275, Bachem, Weil am Rhein

Kaliumchlorid p.a., 60130, Fluka, Buchs, Schweiz

Kaliumdihydrogenphosphat p.a., 60356, Fluka, Buchs, Schweiz

Kationenaustauscher, DOWEX<sup>®</sup> 50W X8 200 - 400 mesh, H<sup>+</sup>-Form, 44519,

Fluka, Buchs, Schweiz

Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (DC - Platten) (5 x 7,5) cm, 105549, Merck KGaA, Darmstadt

Kieselgel 60, 0,04 - 0,063 mm/ 230 - 400 mesh, 109385, Merck KGaA, Darmstadt

Lactose D (+) Monohydrat, 107660, Merck KGaA, Darmstadt

Methanol, z.A., 32213, Riedel-de Haën AG, Seelze

Methanol CHROMASOLV<sup>®</sup> gradient grade, 34860, Riedel-de Haën AG, Seelze

Natriumcaseinat z.A., Rovita GmbH, Engelsberg/Wiesmühl

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Aminosäureanalyse, 106430, Merck KGaA, Darmstadt

Natronlauge 32 %, 30531, Riedel-de Haën AG, Seelze

Pentan-1-sulfonsäure Natriumsalz für die Ionenpaarchromatographie, 513015,  
 Chromatographie-Handel Müller GmbH, Fridolfing  
 Pepsin 10 FIP-U/ mg, 107192, Merck KGaA, Darmstadt  
 Piperidin puriss., 80640, Fluka, Buchs, Schweiz  
 Prolidase 31,0 U/ mg, 33562, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg  
 Pronase E 4000000 PU/ g, 107433, Merck KGaA, Darmstadt  
 Propionsäure z. Synthese, 800605, Merck KGaA, Darmstadt  
 Salzsäure 37% für Hydrolysen, 6011, J.T. Baker, Deventer, Holland  
 Selenreaktionsgemisch nach Wieninger, 108030, Merck KGaA, Darmstadt  
 Schwefelsäure 98 %, zur Stickstoffbestimmung, 84727, Fluka, Buchs, Schweiz  
 Tashiro-Indikator, 36083, Riedel-de Haën AG, Seelze  
 Thymol rein, 89330, Fluka, Buchs, Schweiz  
 Triethylamin > 99%, T0886, Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
 Trifluoressigsäure rein, 91700, Fluka, Buchs, Schweiz  
 TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan z.A., 37180, Serva Feinbiochemica Heidelberg

Alle zu chromatographischen Bestimmungen eingesetzten Fließmittel wurden mit  
 Reinstwasser hergestellt, membranfiltriert und 15 min im Ultraschallbad entgast.

### 3.2 Material und Geräte

Liste der verwendeten Materialien und Geräte sofern nicht an entsprechender Stelle detailliert  
 beschrieben:

Analysenwaage	BP 121S und BP 3100S, Sartorius, Göttingen
Autoklav	Druckreaktor Serie 4565M, Parr Instrument Company, Moline Illinois, USA
Evaporator	TurboVap <sup>®</sup> LV Evaporator, Zymark Ctr., Hopkinton Massachusetts, USA
Festphasenextraktions- Kartuschen	Sep-Pak <sup>®</sup> Classic C18, Waters GmbH, Eschborn Strata C18-E, 500 mg, Phenomenex, Aschaffenburg Strata SCX, 500 mg, Phenomenex, Aschaffenburg

### 3 Material und Methoden

---

Gefriertrocknungsanlagen	ALPHA 1-2, Christ, Osterode BETA 1-8K, Christ, Osterode
Größenausschlussfilter	Vivaspin 2ml, Ausschlussgrenze 5 kDa, VivaScience, Hannover
Inkubationsschrank	ICP 400, Memmert, Schwabach
Kolbenhubpipetten	Eppendorf Reference und Research, unterschiedliche Volumina, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Membranfilter	RC-L-55, regenerierte Cellulose, Durchmesser 47 mm, Porengröße 0,45 µm, unsteril, Schleicher & Schüll, Dassel Spritzenvorsatzfilter SPARTAN 13/0,2 RC, regenerierte Cellulose, Durchmesser 13 mm, Porengröße 0,45 µm und 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel
pH-Meßgerät	inoLab level 2, WTW, Weinheim
Reagenzglasschüttler	MS1 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen
Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2,0 ml, safe-lock, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Rollrandschnappdeckel- gläser	10 ml, VWR International, Darmstadt
Rotationsverdampfer	Laborota 4000, Heidolph, Schwabach
Rühr- und Heizwerk	RH basic mit Thermometer ETS-D4 fuzzy, IKA Labortechnik, Staufen
Schraubreagenzgläser	Duran 12 mm x 100 mm, GL 14 und Duran 16 mm x 160 mm, GL 18, Schott Glaswerke, Mainz
Schüttelwasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Trockenschrank	Modell 200, Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 Super, Bandelin, Berlin
Vakuumpumpenstand	MZ 2C mit Controller, Vacuubrand, Wertheim
Vakuumpumpenkonzentrator	Speed Vac Plus SC 110 AR mit Universal Vacuum System Plus UVS40 A, Avant, Farmingdale, USA
Vakuumpumpe	CVC 2, Vacuubrand, Wertheim
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau Centrifuge 5804R, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg



#### Analytische HPLC-Anlagen

Äkta 10XT mit Autosampler A-900, binärer Hochdruckpumpe P-900, UV-Detektor UV-900 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Säulentermostat IWN CH 100 (JUNEDIS-IWN Elektronik GmbH, Gröbenzell), 4-Kanal Degasser K-5004 (Knauer, Berlin), Fluoreszenzdetektor F-1050 (Merck Hitachi, Darmstadt), Rechnergestützte Datenaufnahme mittels Unicorn 4.1 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Bei Nutzung des Diodenarraydetektors:

Knauer WellChrom HPLC-System, Solvent Organizer K-1500, Pumpe K-1001, Diodenarraydetektor K-2700/K-2701, Säulentermostat, 4-Kanal Degasser K-5004, Autosampler, Rechnergestützte Datenaufnahme mittels Knauer WellChrom (alles Knauer, Berlin)

#### Semipräparative HPLC-Anlage

Knauer WellChrom HPLC-System, Solvent Organizer K-1500, 2 Pumpen K-1001, UV-Detektor K-2501, Fraktionierventil K-16, Säulentermostat, 4-Kanal Degasser K-5004, Rechnergestützte Datenaufnahme mittels Knauer WellChrom (alles Knauer, Berlin)

#### Trennsäulen

Eurospher 100 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 125 mm x 4,6 mm, integrierte 10 mm-Vorsäule, Knauer, Berlin  
semipräparative Eurospher 100 C18, 15  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 16 mm, externe 10 mm-Vorsäule, Knauer, Berlin

Furosine dedicated column, 250 mm x 4,6 mm, Alltech Associates/ Alltech GmbH, Deerfield, Illinois, USA

PLRP-S, 8  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 4,6 mm, 5 mm-Vorsäule, Polymer Laboratories GmbH, Darmstadt

#### Analytische Ionenaustauschchromatographie (Aminosäureanalysator)

4151 Alpha Plus, LKB-Biochrom, Pharmacia-LKB, Freiburg

Trennsäulen: analytische Kationentauscher Serie 686, 6  $\mu\text{m}$ , 125 mm x 4,6 mm und 190 mm x 4,6 mm, Analysentechnik K. Grüning, München

System zur präparativen Ionenaustauschchromatographie

Schlauchpumpe Econo Pump, Fraktionssammler Fraction Collector Modell 2110 (beides Bio-Rad Laboratories, München), Glassäule 30 mm x 400 mm, Sigma, Steinheim

Gaschromatograph mit massenselktivem Detektor

HP GC System 6890 Series, Injector 7683 Series, Autosampler 7683 Series, Mass Selective Detektor 5973 (alles Hewlett Packard, Waldbronn)

Trennsäule: HP-5, 5 % Phenyl-Methyl-Siloxan Kapillarsäule, 30 m, Ø 250 µm, Filmdicke 0,25 µm, Hewlett Packard, Waldbronn

Massenspektrometer

ESI-TOF-MS (electrospray ionization - time of flight - mass spectrometry);

PerSeptive Biosystems Mariner Flugzeitmassenspektrometer mit ESI - Interface;  
Applied Biosystems, Stafford, USA

### 3.3 Untersuchungsmaterialien

#### 3.3.1 Bestimmung von Lysin und Lysinderivaten in Lebensmitteln

Die in Tabelle 3.3-1 dargestellten Lebensmittel werden bezüglich ihrer Gehalte an Lysin, Amadori-Produkt, Pyrralin, CML, Lysinoalanin, GOLD und MOLD mit den in Kapitel 3.7 angegebenen Methoden untersucht. Je eine pasteurisierte Milch und ein Magermilchpulver werden zusätzlich für 1 h und 3 h bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert.

Tabelle 3.3-1: Zur Bestimmung von Lysin und Lysinderivaten eingesetzte Lebensmittel, Proteingehalte bestimmt nach 3.7.1

Lebensmittel	Hersteller	Proteingehalt [%]
<b>Magermilchpulver, sprühgetrocknet</b>		
Heiler Bio-Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell	33,8
Lasana Bio-Magermilchpulver	Humana Milchunion eG, Herford	37,2
SUCOFIN® Magermilchpulver	Trade Service International, Zeven	36,0
<b>ultrahocherhitzte Vollmilch</b>		
Ja!	Vogtlandmilch, Plauen	3,3
Milsani	Vogtlandmilch, Plauen	3,4
Sachsenmilch	Sachsenmilch AG, Leppersdorf	3,3
<b>Pasteurisierte Vollmilch</b>		
Erlenhof	Milchhof Magdeburg, Magdeburg	3,4
Sachsenmilch	Sachsenmilch AG, Leppersdorf	3,3
Bunte Berte	Milchhof Magdeburg, Magdeburg	3,2
Mark Brandenburg	Tuffi Campina emzett GmbH, Berlin	3,3
Bergland	Harzmolkerei Wernigerode GmbH, Silstedt	3,4
<b>Kondensmilch, 7,5 % Fett</b>		
Eifelperle Kaffeeglück	MAY Milch GmbH & Co. KG, Erfstadt	5,1
Hansano Schweriner Kondensmilch	Hansa-Milch Mecklenburg-Holstein e.G., Upahl	6,4
Ja!	REWE Handelsgruppe GmbH, Köln	5,3
Milsani Kondensmilch	Milchwerke Oder-Spree, Beeskow	6,6

### 3.3.2 Bestimmung von Pyrralin in Milchprodukten und anderen Lebensmitteln

Zusätzlich zu den in Kapitel 3.3 dargestellten Milchprodukten werden die in Tabelle 3.3-2 aufgeführten Lebensmitteln nach der in Kapitel 3.7.5.2 angegebenen Methode bezüglich ihrer Pyrraliningehalte untersucht.

Tabelle 3.3-2: Zur Bestimmung von Pyrralin eingesetzte Lebensmittel

Lebensmittel	Hersteller	Proteingehalt [%]*
Rohmilch	Landwirt, Dresdner Umland	3,3
Backwaren	Honigstollen, lokale Bäckerei	5,4
Bier	Feldschlösschen Pilsener und Feldschlösschen Schwarzer Steiger	0,5 0,5
Braumalz	Feldschlösschen AG, Dresden Münchner Typ und Pilsener Typ	9,8
Röstkaffeepulver	Neumarkter Lambsbräu, Neumarkt Melitta® Café Auslese, Melitta Kaffee GmbH, Bremen	13,5
Zartbitter Raspelschokolade	Oranto Dekor, Bad Marienberg	5,3

\* Angabe laut Souci *et al.* (2000)

### 3.3.3 Bestimmung von Maltosin in Milchprodukten

Die in Tabelle 3.3-3 aufgeführten Lebensmittel werden nach enzymatischer Hydrolyse nach Kapitel 3.7.2.2 entsprechend Kapitel 3.7.8 bezüglich ihrer Maltosingehalte untersucht. UHT-Milch, Kondensmilch und Magermilchpulver werden darüber hinaus für 2 h und 4 h, das Molkenpulver für 6 h im Trockenschrank bei 100 °C inkubiert und zur Bestimmung eingesetzt.

Tabelle 3.3-3: Maltosinbestimmung – Untersuchte Lebensmittel

Lebensmittel	Hersteller	Proteingehalt [%]*
Rohmilch	Landwirt, Dresdner Umland	3,3
past. Milch	K-Classic / Milchwerke Oder-Spree, Beeskow	3,4
UHT-Milch	K-Classic / Milchwerke Oder-Spree, Beeskow	3,4
Kondensmilch	Bärenmarke „Leichter Traum“ / Allgäuer Alpenmilch GmbH, Polling	5,8
Magermilchpulver	Lasana / Humana Milchunion, Herford	35,0
Molkenpulver	Hochland AG, Heimenkirch/ Allgäu	12,0

\* Angaben laut Nährwertkennzeichnung

### 3.4 Ernährungsstudie

An der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten neuntägigen Ernährungsstudie nahmen 18 freiwillige Probanden (11 weiblich und 7 männlich) im Alter von 22 bis 42 Jahren teil. Alle Teilnehmer folgten dem in Tabelle 3.4-1 dargestellten Ernährungsplan.

Tabelle 3.4-1: Ernährungsplan

	Gruppe	Ernährung	Probandenzahl
Tag 1	alle	ohne Einschränkung	18
Tag 2 bis 4	alle	MRP-frei	18
Tag 5	„Kontrollgruppe“	MRP-frei	5
	„Salzstangengruppe“	250 g Salzstangen	4
	„Kaffeegruppe“	600 ml Kaffee	4
	„Puddinggruppe“	350 g Pudding	5
Tag 6 bis 8	alle	MRP-frei	18
Tag 9	alle	ohne Einschränkung	18

Kein Proband beendete die Studie vorzeitig. An den Tagen MRP-freier Ernährung waren alle während der Herstellung oder Zubereitung erhitzten Lebensmittel wie Backwaren, Fleisch und Wurstwaren sowie Kaffee zu vermeiden. Einzig ein Liter pasteurisierte Milch pro Tag war als Ausnahme zugelassen. Am Tag 5 teilten sich die Probanden in Gruppen auf und verzehrten vorgegebene Mahlzeiten an Salzstangen, Pudding oder Kaffee. Eine vierte Gruppe diente als Kontrolle und behielt die MRP-freie Diät bei.

Die Mahlzeiten an Tag 5 wurden aus den in Tabelle 3.4-2 angegebenen Zutaten wie folgt zubereitet:

Salzstangen: Unter Berücksichtigung einer Salzmenge von 1 g Salz pro 30 g Salzstangen ergab sich eine Portionsgröße von 258 g Salzstangen pro Person der entsprechenden Gruppe.

Kaffee: Pro Person wurden 45,7 g Röstkaffeepulver mit 800 ml kochendem Wasser übergossen und nach 2 Minuten Ziehen filtriert. Pro Person wurden 600 ml abgemessen und in Thermoskannen abgefüllt.

Pudding: Der Pudding wurde nach Packungsangabe mit 30 g Haushaltszucker gekocht. Anstelle von handelsüblicher Milch wurden 50 g Milchpulver, das vorher 2 h bei 80 °C trocken im Trockenschrank erhitzt wurde, in 500 ml Wasser gelöst und wie die Milch eingesetzt. Die Portionsgröße betrug 350 g Schokoladenpudding pro Person.

### 3 Material und Methoden

Tabelle 3.4-2: Lebensmittel vom Tag 5

Lebensmittel	Hersteller	Proteingehalt [%]
Original Pudding Schokolade z. Kochen, 44,5 g für 500 ml Milch	Dr. Oetker, Bielefeld	4,3*
Salzstangen, Saltlets Sticks, 250 g	Lorenz Snack-World, Neu-Isenburg	9,0**
Melitta® Café Auslese, 500 g, gemahlen	Melitta, Bremen	13,5**

\* Angabe laut Nährwertkennzeichnung; \*\* Angaben laut *Souci et al. (2000)*

Die Teilnehmer sammelten über den gesamten Zeitraum 24-h-Urinproben, die zunächst in Plastikkanistern bei 6 °C gelagert wurden. Nach Bestimmung des jeweiligen Gesamtvolumens am darauffolgenden Tag (vgl. Tabelle 3.4-3) wurde ein Aliquot abgenommen und bis zur Messung bei -18°C gelagert.

Darüber hinaus führten die Probanden ein Ernährungsprotokoll, in das Art und geschätzte Menge der verzehrten Lebensmittel eingetragen wurden.

Tabelle 3.4-3: Tägliche Urinausscheidung der Probanden in ml

	Tag Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9
„Kontrollgruppe“	1	1550	2540	2280	2510	1450	2160	2090	2930	1070
	2	1450	4640	2040	2390	2510	2120	2130	2290	1400
	6	3460	3420	3600	2400	2250	3300	2520	2800	2220
	13	2610	1990	2180	2780	1920	3090	2760	2000	1830
	14	2810	3780	3190	4730	2820	2500	2620	3190	1700
„Salzstangengruppe“	3	1520	2060	1550	1580	1400	2000	1840	1180	740
	9	2150	3800	3870	3640	4450	3650	3050	2430	2730
	10	2480	3040	3190	4180	1850	3100	2770	2990	2800
	16	2600	3800	3860	3560	2590	3540	2630	3330	1280
„Kaffeegruppe“	4	1940	1950	2320	2680	2520	1170	1300	2850	1770
	7	5290	6510	4030	4300	6580	5870	4880	5180	4770
	17	3000	3660	2580	2510	2920	3140	2760	2620	1790
	18	1310	3210	2440	1680	2350	1590	1570	1760	990
„Puddinggruppe“	5	2910	4530	4690	3200	2800	4000	2810	3240	4400
	8	3340	4250	4360	4520	2760	2630	2920	1560	950
	11	2900	2110	2800	2800	3000	2800	3080	2010	1520
	12	850	2030	3350	3220	2280	1500	2370	2250	640
	15	1460	2000	2620	1980	1720	1320	1860	2130	830

## 3.5 Statistische Auswertung

### 3.5.1 Ausreißertest

Bei der Auswertung der Daten der Urinuntersuchungen wird zur Identifizierung von abweichenden Einzelwerten im Sinne von Ausreißern der Ausreißertest nach Dean und Dixon angewendet (*Doerffel, 1990*).

### 3.5.2 Signifikanzen

Für die Bewertung der Daten der Urinuntersuchung im Verlauf der Ernährungsstudie werden ab Tag 5 für jedes analysierte Derivat die Mittelwerte der einzelnen Gruppen mit dem entsprechenden Mittelwert des gesamten Panels am Tag 4 verglichen. Zur Anwendung kommt hierzu der ungepaarte t-Test für zwei Populationen (*Doerffel, 1990*). Ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte wird ab  $p < 0,01$  definiert.

## 3.6 Synthesen von Referenzmaterialien

### 3.6.1 Synthese von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin

Die Synthese von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) erfolgt in Anlehnung an *Liardon et al. (1987)*, modifiziert nach *Krause (2005)*, durch reduktive Alkylierung von N<sup>α</sup>-Acetyllysin. Es werden 1,98 g (10,5 mmol) N<sup>α</sup>-Acetyllysin und 1,27 g (13,8 mmol) Glyoxylsäure-Monohydrat in 20 ml Reinstwasser gelöst, der pH-Wert mit 1,0 M Natronlauge auf pH = 8,7 eingestellt und der Ansatz unter Nachspülen mit Reinstwasser quantitativ in ein 100 ml-Autoklaven-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 50 mg Palladium-Katalysator auf Aktivkohle wird der Autoklav mit Wasserstoff gespült. Anschließend wird unter Rühren 24 h bei 25 °C und einem Druck von 20 bar (Wasserstoff) reduziert. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle wird membranfiltriert und der Acetylrest durch Hydrolyse mit 3 N Salzsäure (3 h bei 110 °C im Sandbad) abgespalten. Die Salzsäure wird durch wiederholte Destillation im Wasserstrahlvakuum abgezogen und der Rückstand durch präparative Säulenchromatographie am Kationenaustauscher (DOWEX 50 WX8 200 - 400 mesh, H<sup>+</sup>-form) gereinigt. Für die Ionenchromatographie werden 60 g des Austauschers in Reinstwasser aufgeschlemmt, in eine 40 cm Chromatographiesäule (∅ = 3,0 cm) überführt (Trennbett ≈ 18 cm) und über Nacht absetzen gelassen. Aktivierung, Konditionierung, Probenaufgabe, Elution, Fraktionierung und

Regeneration erfolgen nach Tabelle 3.6-1 mit Hilfe einer Biorad-Anlage, bestehend aus einer Schlauchpumpe und einem Fraktionssammler (vgl. Kapitel 3.2). Der Probenrückstand wird hierzu in ca. 20 ml Reinstwasser aufgenommen. Die Fraktionsgröße liegt bei 5 bis 6 ml.

Tabelle 3.6-1: Schema der präparativen Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin

	Eluent, Fluss, Fraktionen
Aktivierung	500 ml Salzsäure (6 M), ca. 4 ml/ min
Konditionierung	500 ml Reinstwasser, ca. 4 ml/ min 350 ml Salzsäure (0,01 M), ca. 100 ml/ h
Probenaufgabe	Wässrigen Probenrückstand quantitativ aufgeben und mit 300 ml Salzsäure (0,01 M) bei einem Fluss von 30 ml/ h aufspülen
Elution (Fraktionierung)	500 ml 1 M Salzsäure, Fraktionen 1 bis 90 500 ml 1,5 M Salzsäure, Fraktionen 91 bis 177 700 ml 2 M Salzsäure, Fraktionen 178 bis 265 } je 30 ml/ h
Regenerierung	1000 ml Reinstwasser 700 ml 6 N Salzsäure 1200 ml Reinstwasser } je 4 ml/ min

#### 3.6.1.1 Prüfung auf das Vorhandensein von freien Aminogruppen

2 µl jeder Fraktion werden auf eine Kieselgel 60 DC-Platte (20 cm x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm) aufgetragen, anschließend wird bei 90 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Detektion erfolgt ohne Entwicklung durch Besprühen mit einer 0,1 %igen ethanolschen Ninhydrinlösung (10 mg in 10 ml Ethanol, 96 %) und nachfolgender Inkubation für 10 min bei 90 °C im Trockenschrank. Bei Anwesenheit von freien primären Aminogruppen färben sich die Flecken rot bis rotviolett. 0,2 %ige wässrige Lösungen von CML und Lysin dienen als Positivkontrolle, Reinstwasser als Blindwert. Zur Identifizierung von CML und Lysin werden die ninhydrin-positiven Fraktionen mittels Aminosäureanalyse (ASA) untersucht. Fraktionen in 1 molarer Salzsäure werden hierzu 1 : 4 mit 0,2 molarem Natriumcitratpuffer (pH 2,2) verdünnt. Fraktionen in 1,5 molarer und 2 molarer Salzsäure werden 1 : 5 bzw. 1 : 10 verdünnt. Die Zuordnung von CML erfolgt durch Vergleich mit einer in früheren Arbeiten synthetisierten Referenzsubstanz. CML eluiert zwischen 33 und 35 min.

Die CML enthaltenden Fraktionen (hier Fraktionen 200 bis 255) werden vereinigt und die Salzsäure im Wasserstrahlvakuum abgezogen. Das Präparat wird in Reinstwasser aufgenommen und Destillation und Resolvatisierung bis zur Säurefreiheit wiederholt. Nach Gefriertrocknung erfolgt die Bestätigung der Identität des Präparates durch Kernmagnetische



Resonanzspektrometrie (NMR, siehe Analytische Daten). Die Reinheit des Produktes wird durch Elementaranalyse (siehe Analytische Daten) ermittelt und bezogen auf den Stickstoffgehalt zu 71,3 % CML bestimmt, die Ausbeute beträgt 1,18 g (5,8 mmol) und damit 55,2 % bezogen auf die eingesetzte Menge N<sup>α</sup>-Acetyllysin.

Analytische Daten: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ ppm: 1,43 (2H, m, K-H4), 1,69 (2H, m, K-H5), 1,88 (2H, m, K-H3), 3,04 (2H, t, K-H6), 3,76 (2H, s, CM-H2), 3,90 (1H, t, K-H2); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ/ ppm: 21,83 (s, K-C4), 25,36 (s, K-C5), 29,77 (s, K-C3), 47,40 (s, K-C6), 48,23 (s, CM-C2), 53,52 (s, K-C2), 170,11 (s, CM-C1), 173,08 (s, K-C1); Elementaranalyse, C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> x HCl x 2,9 H<sub>2</sub>O (M<sub>brutto</sub> = 292,93 g/mol) berechnet: C = 33,12 %, H = 7,50 %, N = 9,66 %, C/N = 3,43, gefunden: C = 32,95 %, H = 7,13 %, N = 9,77 %, C/N = 3,37; weißer Feststoff

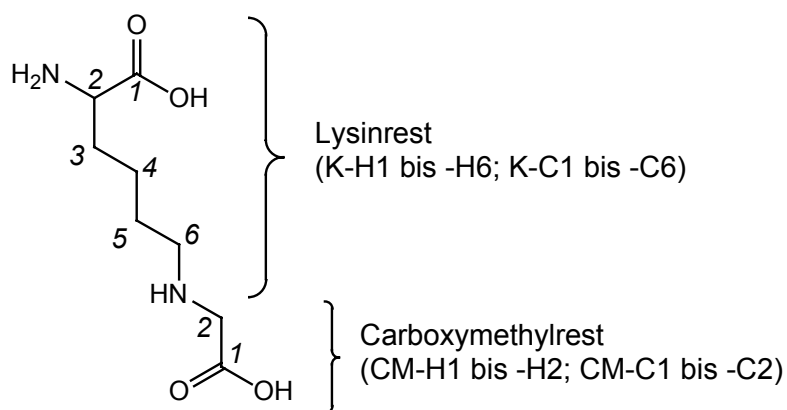


Abbildung 3.6-1: CML - Bezeichnung der Molekülgruppen zur Zuordnung der NMR-Signale

### 3.6.2 Synthese von N<sup>ε</sup>-Carboxymethylornithin

Die Synthese von N<sup>ε</sup>-Carboxymethylornithin (CMO) erfolgt analog der CML-Synthese. Als Edukte werden 280 mg (1,6 mmol) N<sup>α</sup>-Acetylornithin und 190 mg (2,1 mmol) Glyoxylsäure-Monohydrat eingesetzt. Umsetzung, Deacetylierung und Reinigung erfolgen wie unter 3.6.1 beschrieben. Die Identifizierung von CMO in den Fraktionen der Säulenchromatographie erfolgt durch Aminosäureanalyse (Elution bei 27,9 min bekannt aus vorangegangenen Arbeiten). Die entsprechenden Fraktionen (100 - 132) werden vereinigt und wie für CML beschrieben weiterbehandelt. Da CMO für die Verwendung als interner Standard für die Bestimmung von CML über GC-MS synthetisiert wird, erfolgt die Bestätigung von Reinheit

und Identität direkt über die unter 3.7.6.2 beschriebene Methode. Neben dem Signal des CMO-Trifluoressigsäuremethylester tritt im Totalionenstromchromatogramm ein weiterer Peak auf, der aber aufgrund seiner geringeren Retention und durch ein von CMO und CML abweichendes Massenspektrum nicht stört. Der CMO-Gehalt des Präparates wird durch Aminosäureanalyse und Peakflächenvergleich mit einer CML-Standardlösung ermittelt. Dabei wird die Annahme zugrunde gelegt, dass die Carboxymethylaminosäuren gleiches Derivatisierungsverhalten mit Ninhydrin zeigen und die entsprechenden Derivate den gleichen Extinktionskoeffizienten aufweisen. Die Reinheit des Produktes wird zu 9,7 % CMO bestimmt, die Ausbeute beträgt 38,0 mg (0,2 mmol) und damit 12,5 % bezogen auf die eingesetzte Menge N<sup>α</sup>-Acetyllysin.

#### 3.6.3 Synthese von Isomaltol

Die Synthese von Isomaltol erfolgt wie bei *Hodge und Nelson (1961)* beschrieben aus Lactose über Galaktosylisomaltol als Zwischenprodukt.

Synthese von Galaktosylisomaltol:

180 g (0,5 mol) Lactose Monohydrat werden in einen Drei-Hals-Kolben (1000 ml) eingewogen und in 150 ml Ethanol suspendiert. Unter Rühren werden langsam 50 ml Piperidin und 29 ml Eisessig über einen Tropftrichter zugegeben. Nach zweistündigem Erhitzen auf  $78 \pm 2$  °C unter Rückfluss werden 25 ml Triethylamin zugetropft. Nach weiteren 8 h Erhitzung werden nochmals 25 ml Triethylamin zugegeben. Der Ansatz wird bis zu einer Gesamtdauer von 24 h weiter erhitzt, im Eisbad abgekühlt und nach Zugabe von 150 ml Ethanol eine Stunde bei maximal 5 °C weitergerührt. Das ausfallende Galaktosylisomaltol wird abgesaugt, mehrfach mit Ethanol gewaschen und bis zur Massekonstanz über Calciumchlorid getrocknet. Die Identität wird durch Vergleich der UV- und Massenspektren mit Literaturdaten bestätigt. Die Ausbeute beträgt 56,6 g (0,2 mol) und damit 39 % bezogen auf die eingesetzte Menge N<sup>α</sup>-Acetyllysin.

Analytische Daten:

UV-Spektrum (200 - 450 nm in Wasser)  $\lambda_{\max} = 278$  nm; ESI-MS,  $[M-H]^-$  m/z = 287,0; keine Komplexbildung mit Eisen(III)chlorid; brauner Feststoff

Synthese von Isomaltol:

Das oben gewonnene Galaktosylisomaltol (56,6 g) wird portionsweise (jeweils 5 bis 10 g) in einen Kolben überführt und im Sandbad trocken 10 min auf 240 °C erhitzt. Das freigesetzte Isomaltol wird über eine Destillationsbrücke in eine eisgekühlte Vorlage geleitet, wo es als gelber Feststoff auskristallisiert. Um eine Kristallisation an der Brückenwandung zu verhindern wird diese mit einem Heißluftfön erhitzt. Das erhaltene Produkt wird in Wasser suspendiert, zwei bis drei Stunden im Kühlschrank gekühlt, filtriert, mit Eiswasser gewaschen und gefriergetrocknet. Die Prüfung der Identität erfolgt wiederum durch Vergleich von Massen-, UV- und NMR-Spektren mit Literaturdaten. Die Ausbeute beträgt 23,2 g (0,2 mol) und damit 41 % bezogen auf die eingesetzte Menge Galaktosylisomaltol.

Analytische Daten: UV-Spektrum (200 - 450 nm in Wasser)  $\lambda_{\max} = 279$  nm; ESI-MS (Nanospray-Technik),  $[M+H]^+$   $m/z = 127,2$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$ / ppm: 2,30 (3H, m, H1), 3,53 (1H, s, OH4), 6,33 (1H, d, H5), 7,68 (1H, d, H6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO)  $\delta$ / ppm: 26,61 (s, C1), 106,01 (s, C5), 136,16 (s, C4), 147,13 (s, C6), 153,58 (s, C3), 183,30 (s, C2); Komplexbildung mit Eisen(III)chlorid (rot-violett); gelber Feststoff

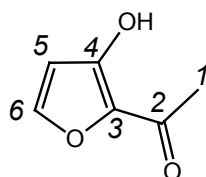


Abbildung 3.6-2: Isomaltol – Bezeichnung der Molekülgruppen zur Zuordnung der NMR-Signale

### 3.6.4 Synthese von N<sup>α</sup>-Hippurylmaltosin

Die Synthese von Hippurylmaltosin erfolgt modifiziert nach *Ledl et al. (1989)* aus Isomaltol und N<sup>α</sup>-Hippuryllysin. 1,65 g (13 mmol) des nach 3.6.3 gewonnenen Isomaltols und 3,0 g (9,8 mmol) N<sup>α</sup>-Hippuryllysin werden in 26 ml destilliertem Wasser gelöst und 20 h unter Rückfluss erhitzt. Der gesamte Ansatz wird am Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und mittels semipräparativer Hochleistungs-Flüssigchromatographie durch Fraktionierung weiter aufgereinigt (siehe auch unten stehende Chromatographieparameter und Tabelle 3.6-2). Dem Chromatographiesystem zugrunde liegt ein in der Arbeitsgruppe für die Trennung von Hippurylaminosäuren etabliertes HPLC-System (*Pickert, 2004*).

#### Parameter der semipräparativen HPLC

Anlage: semipräparative HPLC Knauer WellChrom  
 Säule: Eurospher 100 C18, 15 µm, 250 mm x 16 mm (T = 25 °C)  
 Detektion: UV bei  $\lambda = 280$  nm  
 Injektionsvolumen: 1000 - 1500 µl  
 Elution: binärer Gradient  
 Eluent A: Wasser  
 Eluent B: Methanol

Tabelle 3.6-2: Gradient der semipräparativen HPLC zur Isolierung von Hippurylmaltosin

Zeit [min]	Fluss [ml/ min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	8,0	95	5
6,0	6,5	95	5
32,0	6,5	75	25
40,0	6,0	5	95
46,0	5,0	5	95
51,0	5,0	95	5
60,0	5,0	95	5

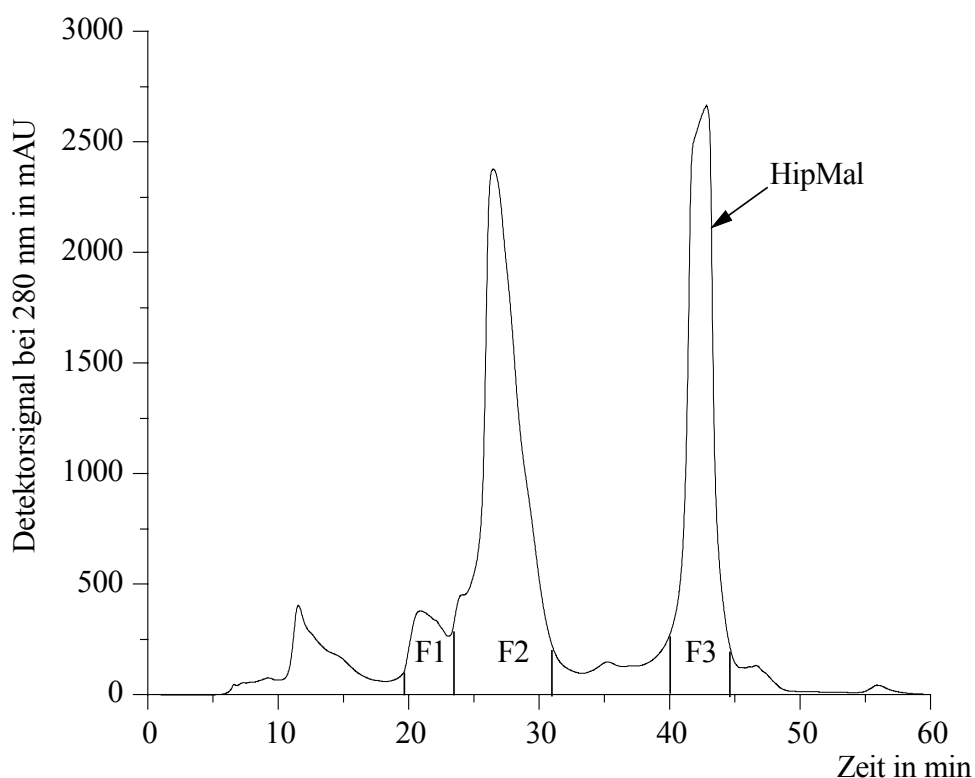


Abbildung 3.6-3: Fraktionierschema der semipräparativen RP-HPLC zur Isolierung von Hippurylmaltosin (HipMal); Fraktionen F1 bis F3; Methanol/ Wasser-Gradient mit UV-Detektion bei  $\lambda = 280$  nm

Die so erhaltenen Fraktionen werden am Vakuumrotationsverdampfer eingengt und Hippurylmaltosin nach Gefriertrocknung durch UV-, Massen- und NMR-Spektroskopie sowie Elementaranalyse in Fraktion 3 identifiziert und charakterisiert. Die Ausbeute beträgt 783 mg (1,8 mmol) und damit 18,0 % bezogen auf die eingesetzte Menge N<sup>α</sup>-Hippuryllysin.

Analytische Daten:

UV-Spektrum (200 - 450 nm in Wasser)  $\lambda_{\max 1} = 218$  nm,  $\lambda_{\max 2} = 280$  nm; ESI-MS,  $[M+H]^+$   $m/z = 416,0$ ; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$ / ppm: 1,32 (2H, m, Mal-H4), 1,63 (3H, m, Mal-H12), 1,75 (1H, t, Mal-H11), 2,26 (2H, s, Mal-H11), 3,87 (2H, m, Mal-H3), 3,92 (2H, m, Mal-H6), 3,97 (2H, m, Hip-H2), 4,23 (1H, m, Mal-H2), 6,10 (1H, d, Mal-H10), 7,46 (1H, m, Hip-H6), 7,49 (1H, m, Hip-H8), 7,52 (1H, m, Hip-H5), 7,55 (1H, m, Hip-H9), 7,87 (1H, d, Hip-NH2), 7,88 (1H, d, Mal-NH2), 8,19 (1H, d, Mal-OH1), 8,72 (1H, t, Mal-OH8); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$ / ppm: 11,32 (s, Mal-C12), 22,16 (s, Mal-C4), 29,80 (s, Mal-C3), 30,71 (s, Mal-C5), 42,37 (s, Hip-C2), 51,64 (s, Mal-C11), 52,68 (s, Mal-C6), 110,62 (s, Mal-C10), 127,34 (s, Hip-C5), 127,34 (s, Hip-C9), 128,37 (s, Hip-C6), 128,67 (s, Hip-C8), 131,41 (s, Mal-C7), 134,05 (s, Hip-C7), 137,58 (s, Hip-C4), 145,48 (s, Mal-C8), 166,55 (s, Hip-C1), 168,83 (s, Hip-C3), 168,99 (s, Mal-C1), 173,53 (s, Mal-C9); Elementaranalyse, C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub> x 1,06 H<sub>2</sub>O, (M<sub>brutto</sub> = 434,56 g/mol) berechnet: C = 58,04 %, H = 9,29 %, N = 9,67 %, C/N = 6,00; gefunden: C = 58,34 %, H = 6,29 %, N = 9,67 %, C/N = 6,04; weißer Feststoff

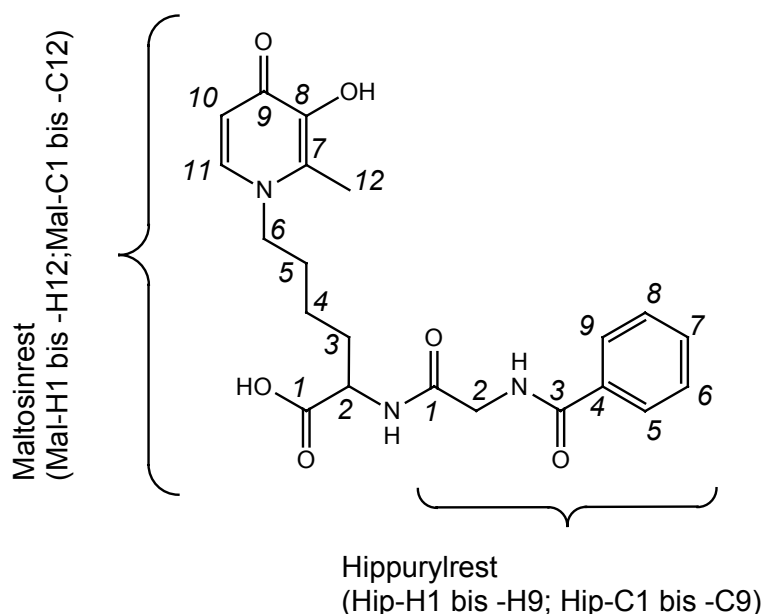


Abbildung 3.6-4: N<sup>α</sup>-Hippurylmaltosin – Bezeichnung der Molekülgruppen zur Zuordnung der NMR-Signale

### 3.6.5 Synthese von Maltosin

Maltosin wird durch saure Hydrolyse des unter Kapitel 3.6.4 dargestellten Hippurylderivates gewonnen. Hierzu werden 14 mg (30  $\mu\text{mol}$ ) Hippurylmaltosin in 4 ml 6 N Salzsäure gelöst und 24 h bei 121 °C im Sandbad im Trockenschrank hydrolysiert. Das Präparat wird in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt und nach mehrfachem Waschen mit Wasser gefriergetrocknet. Die Gehaltsbestimmung erfolgt über die Bestimmung des durch die Hydrolyse freigesetzten Glycins mittels Aminosäureanalyse nach Kapitel 3.7.10. Hierzu wird der Trocknungsrückstand in 1 ml 0,2 M Natriumcitratpuffer (pH 2,2) gelöst, 1 zu 200 mit dem Puffer verdünnt und ein Aliquot von 50  $\mu\text{l}$  zur Aminosäureanalyse eingesetzt. Unter der Voraussetzung einer vollständigen Hydrolyse entstehen Maltosin, Glycin und Hippursäure im äquimolaren Verhältnis, so dass der Gehalt an Maltosin dem ermittelten Glycingehalt gleichgesetzt werden kann. Der Glycin- und damit der Maltosingehalt der verdünnten bzw. unverdünnten Hippurylmaltosinhydrolysatlösung wurde so zu 105 nmol/ ml bzw. 21  $\mu\text{mol/ ml}$  (5,3 mg/ ml) bestimmt. Die molare Ausbeute beträgt damit 70 % bezogen auf die eingesetzte Menge Hippurylmaltosin und 12,6 % bezogen auf die ursprünglich zur Synthese eingesetzte Menge  $\text{N}^\alpha$ -Hippuryllysin.

### 3.6.6 Gehaltsbestimmung durch Elementaranalyse

Die Gehaltsbestimmung der einzelnen Präparate durch Elementaranalyse erfolgte durch Frau Anke Peritz am Institut für Organische Chemie der TU Dresden. Die Bestimmungen werden am Elementar-Analysator Euro EA 3000 (Eurovector, Mailand, Italien) durchgeführt.

### 3.6.7 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte durch Frau Annett Rudolph und Frau Dr. Grunar am Institut für Organische Chemie der TU Dresden. Die Messungen werden an einem NMR Spektrometer DRX 500 (Bruker, Reinstetten) mit 500 MHz für  $^1\text{H}$ -Experimente und 125 MHz für  $^{13}\text{C}$ -Experimente durchgeführt. Zur Messung eingesetzt wurden ca. 1 %ige Lösungen der Präparate in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Deuteriumoxid ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

### 3.6.8 Massenspektrometrie

Die massenspektrometischen Untersuchungen werden an einem Electrospray ionization - time of flight - Massenspektrometer (ESI-TOF-MS) durchgeführt. Die zu vermessenden Proben

werden für die positive Ionisierung zu einer Konzentration von 1 pmol/ µl in Wasser/Acetonitril 50:50 (v/v), 1 %ig an Essigsäure, gelöst und direkt vermessen. Für die negative Ionisierung dient eine 10 mmolare Ammoniumacetatlösung als Lösungsmittel, die Analytkonzentration wird auf 100 pmol/ µl eingestellt.

### 3.7 Analytische Methoden

#### 3.7.1 Bestimmung des Proteingehaltes nach Kjeldahl

Die Bestimmung erfolgt in Anlehnung an die Methode L 02.09-5 „Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung des Proteingehaltes von Caseinen und Caseinaten (Referenzverfahren)“ der *Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG* und den Empfehlungen der Firma Büchi Labortechnik, Flawil, Schweiz. Für die Berechnung des Proteingehaltes wird ein Faktor von 6,38 (Milchprodukte) herangezogen.

Zum Aufschluss der Probe werden ca. 150 mg der Milchpulverproben bzw. 1,5 ml der flüssigen Milchproben auf 1 mg genau in Aufschlusskolben eingewogen, mit 10 ml konzentrierter Schwefelsäure und einer Spatelspitze Katalysatormischung nach Wieninger versetzt und in einer Aufschlusseinheit (Heizblock K-435 mit Scrubber B-414, Büchi, Labortechnik, Flawil, Schweiz) aufgeschlossen bis die Ansätze klar und farblos sind. Die aufgeschlossenen Probelösungen werden mit 30 ml Wasser versetzt und nach dem Abkühlen in der Destillationseinheit der Firma Büchi (Kjeldahl Line B-324, Büchi, Labortechnik, Flawil, Schweiz) entsprechend folgender Parameter einer Wasserdampfdestillation unterzogen.

Destillationsparameter:	Wasserzugabe	15 ml
	Borsäurevorlage	50 ml Borsäurelösung 2 % (m/v)
	Natronlaugezugabe	40 ml Natronlauge 32 % (m/v)
	Destillationsdauer	4 min

Die nachfolgende Titration erfolgt mit einer Titrationseinheit zur manuellen Titration (Dosimat 775 mit Magnetprüher 728, Metrohm, Herisau, Schweiz) mit Schwefelsäure (0,1 N) gegen Tashiro-Mischindikator von grün nach blau-grau.

### 3.7.2 Hydrolysen

#### 3.7.2.1 Saure Hydrolyse

Die Proben werden auf 1 mg genau in Schott®-Schraubreagenzgläser eingewogen, mit Salzsäure bis zu einer Endkonzentration von 6 mol/l versetzt, der Ansatz 2 min mit Stickstoff gespült und nach Verschließen und Umschütteln in einem vorgeheizten Sandbad im Trockenschrank 23 h bei 110 °C hydrolysiert (vgl. Tabelle 3.7-1). Zur Dichtheitskontrolle werden die Reagenzgläser vor und nach der Hydrolyse gewogen. Für die Bestimmung freier MRPs werden Größenausschlussfiltrate nach 3.7.3 zur Hydrolyse eingesetzt. Anschließend werden die Ansätze im Eisbad abgekühlt, nach Filtration über einen Weißbandfilter ein Aliquot abgenommen und in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt. Die Trocknungsrückstände werden bis zur Analyse bei -18 °C im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 3.7-1: Ansätze zur sauren Hydrolyse

Probe	Einwaage	Säurezugabe
Pasteurisierte Milch	CML: 1000 µl Fur: 2000 µl ASA: 500 µl	1000 µl 2000 µl 500 µl } 12 N HCl
UHT-, Steril- Kondensmilch	CML: 500 - 1000 µl Fur: 2000 µl ASA: 500 µl	500 - 1000 µl 2000 µl 500 µl } 12 N HCl
Milchpulver	50 mg	2,5 ml 6 N HCl
Pudding	1,0 - 2,0 g	10,0 ml 6 N HCl
Salzstangen	0,5 g	10,0 ml 6 N HCl
Kaffee	5,0 ml	5,0 ml 12 N HCl
Urinproben	3,5 ml	3,5 ml 12 N HCl

CML: zur Bestimmung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin; Fur: zur Bestimmung von Furosin;  
ASA: zum Einsatz zur Aminosäureanalyse

#### 3.7.2.2 Enzymatische Hydrolysen

Frisch herzustellende Enzymlösungen:

Pepsin-Lösung: 2 mg Pepsin (20 FIP-U) in 1000 µl Salzsäure (0,02 N) lösen

Pronase-Lösung: 2 mg Pronase E (8000 PU) in 1000 µl TRIS/ HCl-Puffer (2,0 M, pH 8,2) lösen

Aminopeptidase: gebrauchsfertige Suspension (20 U/ ml)

Prolidase-Lösung: 15 mg Prolidase (465 U) in 1000 µl Reinstwasser suspendieren



Zur enzymatischen Hydrolyse werden die Proben entsprechend 2 - 3 mg Protein auf 1 mg genau in Rollrandschnappdeckelgläser eingewogen (vgl. Tabelle 3.7-2), in 1 ml 0,02 N Salzsäure gelöst oder suspendiert und zur Konservierung ein Kristall Thymol hinzugefügt. Nach Zugabe von 50 µl der Pepsin-Lösung wird 24 h bei 37 °C im Inkubationsschrank inkubiert. Anschließend werden die Ansätze mit 250 µl TRIS/ HCl-Puffer (2,0 M, pH 8,2) versetzt, 50 µl Pronase-Lösung zugegeben und erneut 24 h inkubiert. Abschließend erfolgt die Zugabe von 20 µl Aminopeptidase M- und 40 µl Prolidase-Lösung. Nach erneuter Inkubation für 24 h werden die Hydrolysate gefriergetrocknet und bis zur Analyse bei -18 °C im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 3.7-2: Einwaagen zur enzymatischen Hydrolyse

Probe	Einwaage
Milchproben	100 µl
Kondensmilch	50 µl
Milchpulver	10 mg
Molkenpulver	30 mg
Pudding	100 mg
Salzstangen	20 mg
Kaffee	1000 µl
Urinproben	1000 µl

Die Urin- und Kaffeeproben werden vor der Hydrolyse im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt und als Feststoff eingesetzt.

### 3.7.2.3 Bestimmung des Proteolysegrades der enzymatischen Hydrolyse

Zur Bestimmung des Proteolysegrades werden die Aminosäuregehalte eines Milchpulvers mittels Aminosäureanalyse wie unter 3.7.10 beschrieben nach saurer und enzymatischer Hydrolyse ermittelt (vgl. 3.7.2). Die nach saurer Hydrolyse erhaltenen Gehalte werden 100 % gesetzt und die nach enzymatischer Hydrolyse bestimmten darauf bezogen.

### 3.7.3 Größenausschlussfiltration

Zur Bestimmung freier, nicht proteingebundener Maillard-Reaktions-Produkte in Lebensmitteln und Urin wird die Proteinfraction durch Größenausschlussfiltration über Zentrifugalfilter mit einer Ausschlussgrenze von > 5000 Da durch Zentrifugation für 30 - 60 min bei einer Beschleunigung von 2500 g abgetrennt und das Filtrat weiter verwendet.

### 3.7.4 Bestimmung von Fructose- und Lactoselysin als Furosin

Die Quantifizierung der Amadori-Produkte erfolgt über die Bestimmung von Furosin nach saurer Hydrolyse mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei  $\lambda = 280$  nm nach *Resmini et al. (1990)* und *Knobloch (1999)*. Zuordnung und Quantifizierung erfolgen durch Vergleich von Retentionszeit und Peakfläche mit kommerziell erhältlichem Referenzmaterial. Die für die externe Kalibrierung eingesetzte Standardlösung wird durch Verdünnung einer Stammlösung (ca. 35 nmol/ ml) hergestellt. Der Furosingehalt der Stammlösung wird vor jeder Kalibration über die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten von  $\varepsilon = 15316$  l/ cm/ mol über das Lambert-Beer'sche Gesetz ( $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ ) berechnet.

#### 3.7.4.1 Furosin in Lebensmitteln

Zur Bestimmung eingesetzt werden die nach Kapitel 3.7.2.1 erhaltenen sauren Hydrolysate. Der eigentlichen Chromatographie geht eine Festphasenextraktion an RP18-Material (Sep-Pak<sup>®</sup> Classic C18, Waters) voraus. Hierzu werden die Kartuschen zunächst mit Methanol konditioniert, die Hydrolysate nach Filtration über Weißbandfilter aufgegeben und anschließend mit 3 N Salzsäure in vorgewogenen Vials eluiert (vgl. Tabelle 3.7-3).

Tabelle 3.7-3: Schema der Festphasenextraktion zur Furosinbestimmung

Aufarbeitungsschritt	
Konditionierung	5 ml Methanol 10 ml H <sub>2</sub> O
Probenaufgabe	500 µl Hydrolysat
Probenelution	3 ml 3 N HCl (500 + 500 + 1000 + 1000 µl)

Nach der Elution werden die Vials erneut gewogen und aus der Massendifferenz durch Division durch den Korrekturfaktor 1,05 (berücksichtigt die Dichte der Salzsäure) auf das tatsächlich eluierte Volumen umgerechnet. 2,5 ml des Eluates werden im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingeengt, in 500 µl Eluent A aufgenommen, membranfiltriert und entsprechend folgender Parameter und Tabelle 3.7-4 zur HPLC eingesetzt.

Anlage:	Analytische HPLC Äkta 10XT
Säule:	Furosine dedicated column (T = 33 °C)
Detektion:	UV bei $\lambda = 280$ nm
Injektionsvolumen:	20 $\mu$ l
Kalibration:	2 bis 100 pmol/ Injektion
Flussrate:	1,0 ml/ min
Elution:	binärer Gradient
	Eluent A: 0,4 % Essigsäure (v/v)
	Eluent B: 0,3 % Kaliumchlorid (m/v) in Eluent A

Tabelle 3.7-4: Trennprogramm zur Furosinebestimmung

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100	0
15,5	100	0
22,5	50	50
25,0	50	50
27,0	100	0
34,0	100	0

### 3.7.4.2 Furosine im Urin

Die Bestimmung von Furosine im Urin erfolgt analog Kapitel 3.7.4.1. Zur Quantifizierung von „freiem“, aus nicht proteingebundenem Amadori-Produkt gebildetem, Furosine werden vorhandene Proteine vor der sauren Hydrolyse mittels Größenausschlussfiltration entsprechend Kapitel 3.7.3 abgetrennt.

### 3.7.4.3 Berechnung der Amadori-Produkt-Gehalte

Die Amadori-Produkt-Gehalte werden nach *Krause et al. (2003)* durch Multiplikation der Stoffmenge mit dem Überföhrungsfaktor 3,1 bzw. 2,9 als Fructose- oder Lactoselysin aus den Furosinegehalten berechnet.

### 3.7.5 Bestimmung von Pyrralin

Die Bestimmung von Pyrralin erfolgt mittels zwei verschiedener HPLC-Methoden mit UV-Detektion bei  $\lambda = 297$  nm. Darüber hinaus kann das Lysinderivat wie in Kapitel 3.7.8.4 beschrieben neben Maltosin und Maltol bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm nach Trennung an einer Polymerphase mit erfasst werden. Zuordnung und Quantifizierung des

Analyten erfolgen durch Vergleich von Retentionszeit und Peakfläche mit im Arbeitskreis synthetisiertem Referenzmaterial. Die Identität des Analyten wird gegebenenfalls durch Aufnahme des gesamten UV-Spektrums am DAD-Detektor abgesichert. Die für die externe Kalibrierung eingesetzte Standardlösung wird durch Verdünnung einer Stammlösung (ca. 60 nmol/ ml) hergestellt. Der exakte Pyrralingehalt der Stammlösung wird vor jeder Kalibration durch Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes (vgl. 3.7.4) über die Extinktion bei  $\lambda = 297 \text{ nm}$  unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 14454,4 \text{ l/ cm/ mol}$  berechnet.

#### 3.7.5.1 Untersuchungen zur Pyrralinbildung während der enzymatischen Hydrolyse

Zur Untersuchung der Pyrralinbildung während der enzymatischen Hydrolyse werden trockene Mischungen aus Natriumcaseinat und Lactose mit steigendem Zuckeranteil zur enzymatischen Hydrolyse eingesetzt und anschließend wie für Lebensmittel beschrieben analysiert. Die Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 3.7-5 wiedergegeben.

Tabelle 3.7-5: Ansätze zur Untersuchung der Pyrralinbildung während der enzymatischen Hydrolyse

Ansatz	Natriumcaseinat [mg]	Lactose [mg]
1	3,0	0,0
2	3,0	0,2
3	3,0	2,4

#### 3.7.5.2 Pyrralin in Lebensmitteln

Zur Bestimmung eingesetzt werden die nach Kapitel 3.7.2.2 erhaltenen enzymatischen Hydrolysate. Die Trocknungsrückstände werden unter Berücksichtigung der zu erwartenden Pyrralingehalte in 500 bis 1000  $\mu\text{l}$  des Eluenten aufgenommen, membranfiltriert und entsprechend der folgenden Parameter zur Ionenpaarchromatographie nach *Bachmann (1994)* eingesetzt. Die Kalibration erfolgt durch Dotierung eines enzymatischen Rohmilchhydrolysates. Es werden jeweils 80  $\mu\text{l}$  Rohmilch, entsprechend ca. 2,6 mg Protein, eingewogen, enzymatisch hydrolysiert und gefriergetrocknet. Die trockenen Hydrolysate werden ausgehend von einer Pyrralinstammlösung (ca. 60 nmol/ ml, genaue Gehaltsbestimmung über die Extinktion bei 297 nm) im Bereich von 75 pmol bis 3,75 nmol dotiert, mit dem HPLC-Fließmittel auf 750  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, membranfiltriert und zur HPLC eingesetzt.

Anlage:	Analytische HPLC Äkta 10XT
Säule:	Eurospher 100 C18, 5 µm, 125 mm x 4,6 mm (T = 30 °C)
Detektion:	UV bei $\lambda = 297$ nm
Injektionsvolumen:	50 µl
Kalibration:	5 bis 250 pmol / Injektion
Flussrate:	1,6 ml/ min
Elution:	isokratisch (t = 28 min)
	Eluent: 7,5 mM Natriumpentansulfonat in 10 % Ethanol, mit Propionsäure auf pH 3,0 einstellen

### 3.7.5.3 Pyrralin im Urin

Zur Bestimmung von Pyrralin im Urin kommt eine modifizierte Methode nach *Portero-Otin et al. (1997a)* zur Anwendung. Für die Quantifizierung des freien, nicht proteingebundenen Derivates wird die Probe membranfiltriert und ohne weitere Aufarbeitung, gegebenenfalls verdünnt oder dotiert, zur HPLC eingesetzt. Zur Erfassung des Gesamtpyrralingehaltes wird die Probe wie in Kapitel 3.7.2.2 beschrieben enzymatisch hydrolysiert, der Trocknungsrückstand in 750 µl des Eluenten A aufgenommen und entsprechend der folgenden Parameter und Tabelle 3.7-6 zur HPLC eingesetzt. Die Kalibration erfolgt ohne Matrix durch Verdünnen der in Kapitel 3.7.5.2 beschriebenen Stammlösung.

Anlage:	Analytische HPLC Äkta 10XT
Säule:	Eurospher 100 C18, 5 µm, 125 mm x 4,6 mm (T = 37 °C)
Detektion:	UV bei $\lambda = 297$ nm
Injektionsvolumen:	50 µl
Kalibration:	20 bis 1000 pmol/ Injektion
Flussrate:	1,0 ml/ min
Elution:	binärer Gradient
	Eluent A: 0,02 M Ammoniumacetat in Reinstwasser, mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,95 einstellen
	Eluent B: 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Wasser/ Acetonitril 50 : 50 (v/v)

Tabelle 3.7-6: Trennprogramm zur Pyrrolinbestimmung in Urin

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100	0
9,5	100	0
22,5	90	10
29,5	0	100
34,5	0	100
39,5	100	0
46,5	100	0

#### 3.7.5.4 Abschätzung zur Stabilität von Pyrrolin im Urin

Frische Urinproben zweier Probanden (A und B) werden undotiert und mit dem Pyrrolinstandard dotiert für bis zu 151 h bei 37 °C im Inkubationsschrank gelagert. Für die Dotierung werden 4960 µl Urin mit 40 µl einer Standardlösung (35,74 µg/ ml) versetzt. Die zugesetzte Menge entspricht 1,43 µg/ 5 ml Probe. Vor der Inkubation (0 h) sowie nach 7, 24, 31 ¼, 50 ½ und 151 Stunden werden Aliquote abgenommen und der Gehalt an freiem Pyrrolin bestimmt.

#### 3.7.6 Bestimmung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine

Zur Bestimmung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine findet eine nach *Knecht et al. (1991)* und *Richter (2001)* modifizierte gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie nach Festphasenextraktion und Derivatisierung des Analyten zum Trifluoressigsäuremethylester Anwendung. Für die Identifizierung des Analyten im Chromatogramm werden Retentionszeit und Massenspektrum mit den entsprechenden Signalen des nach Kapitel 3.6.1 synthetisierten Referenzmaterials verglichen. Die Quantifizierung erfolgt unter Bezugnahme auf N<sup>ε</sup>-Carboxymethylornithin, synthetisiert nach Kapitel 3.6.2, als internen Standard.

Zur Auswahl der Qualifier- und Targetionen für die Messung im SIM-Modus (selected ion monitoring) werden Standard und interner Standard einzeln wie für die Bestimmung in Lebensmitteln derivatisiert und zunächst im SCAN-Modus gemessen. Die Messparameter entsprechen den aufgeführten SIM-Parametern. Gemessen wird im Bereich von m/ z = 50 bis m/ z = 600.

##### 3.7.6.1 Kalibration

Für die Kalibration wird wegen der Abwesenheit von Matrixbestandteilen auf die Festphasenaufarbeitung verzichtet. Aus einer Stammlösung (c = 27,0 µmol/ ml) werden durch

Verdünnung mit 1 N methanolischer Salzsäure CML-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 8 nmol bis 750 nmol pro Ansatz hergestellt, wie unter Kapitel 3.7.6.2 für Lebensmittel beschrieben mit dem internen Standard versetzt und derivatisiert. Die zur Derivatisierung eingesetzten Volumina an Dichlormethan und Trifluoressigsäureanhydrid werden dabei halbiert.

### 3.7.6.2 CML in Lebensmitteln

Zur Bestimmung eingesetzt werden die nach Kapitel 3.7.2.1 gewonnenen sauren Hydrolysate. Der gaschromatographischen Analyse gehen eine Aufreinigung an RP18-Material (Strata C18-E, Phenomenex) und eine Extraktion des Analyten an einer starken Kationenaustauscherfestphase (Strata SCX, Phenomenex) voraus. Nach der Konditionierung der jeweiligen Phase werden die Kartuschen über einen Adapter gekoppelt. Die Parameter der Festphasenextraktion sind in Abbildung 3.7-1 wiedergegeben.

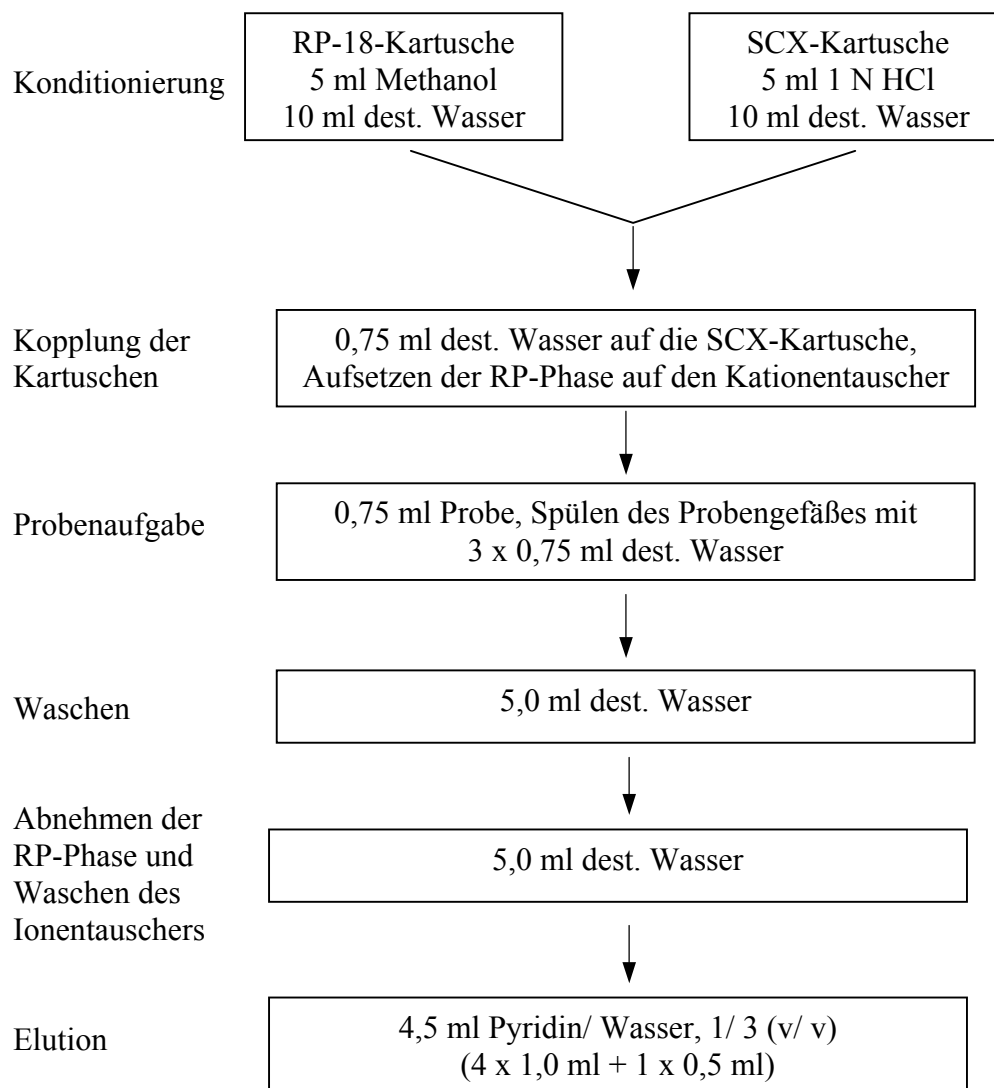


Abbildung 3.7-1: Schema der CML-Festphasenaufarbeitung

Das Eluat wird im Stickstoffstrom getrocknet und anschließend in 2,0 ml 1 N methanolischer Salzsäure aufgenommen. 1,5 ml dieser Lösung werden zur Derivatisierung eingesetzt. Dazu werden 40 µl einer Carboxymethylornithinlösung (2,5 µmol/ ml in 1 N methanolischer Salzsäure; 99,5 nmol im Derivatisierungsansatz) gegeben und 30 min bei 65 °C derivatisiert. Anschließend wird erneut im Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wird in 0,5 ml Dichlormethan aufgenommen und 1,0 ml Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben. Nach einstündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird wieder getrocknet, in 0,3 ml Dichlormethan aufgenommen und zur Gaschromatographie eingesetzt.

Gemessen wird im SIM-Modus, die Parameter der Chromatographie und der Massenspektroskopie sind im folgenden wiedergegeben.

#### Probeneinlass:

pulsed splitless	
Temperatur	250 °C
Druck	59,8 kPa
Pulse pressure	206,8 kPa
Pulse time	0,5 min
Purge flow	10,0 ml/ min
Purge time	0,00 min
Totaler Fluss	13,3 ml/ min
Gas saver	on
Saver flow	15,0 min
Saver time	4,00 min
Trärgas	Helium

#### Säule:

HP-5, 5 % Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule

Länge	30 m
Durchmesser	250 µm
Filmdicke	0,25 µm
Mode	konstanter Fluss
Eingangsfluss	1,0 ml/ min
Eingangsdruck	59,8 kPa
Mittlere Geschwindigkeit	37 cm/s
Ausgangsdruck	Vakuum



## Ofenprogramm:

Anfangstemperatur	70 °C
Temperaturprogramm	5 °C/ min auf 245 °C 15 °C/ min auf 280 °C, 4 min halten 10 °C/ min auf 315 °C, 3 min halten

## Injektor: Front Injektor

Probe waschen	2
Probe pumpen	5
Injektionsvolumen	2 µl
Nach-Injektions-Waschen	15 mal mit Wasser 15 mal mit Methanol

## MS-SIM-Parameter: Solvent Delay 2 min

Resulting EM Voltage	1764,7
MS Quadrupol	150 °C max. 200 °C
MS Source	230 °C max. 250 °C

Tabelle 3.7-7: Parameter der Massenspektroskopie im SIM-Modus

	Startzeit [min] Lebensmittel/ Urin	SIM-Ionen	Dwell time
CMO	23,00/ 25,25	378, 351, 333, 291, 224, 166	80
CML	25,00/ 28,00	392, 305, 206, 180,	80

3.7.6.3 Freies N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin im Urin

Die Bestimmung von freiem N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin im Urin erfolgt grundsätzlich analog der für die Lebensmittelmatrix beschriebenen Methode (vgl. Kapitel 3.7.6.2). Anstelle der sauren Hydrolysate werden 200 bis 500 µl der nach 3.7.3 gewonnenen Größenausschlussfiltrate der Urinproben zur Festphasenaufarbeitung eingesetzt. Da im Vergleich zu den Lebensmitteln geringere CML-Gehalte zu erwarten sind, wird für die Bestimmung im Urin mit einer geringeren Menge an internem Standard im Konzentrationsbereich von 10 bis 250 nmol wie unter 3.7.6.1 beschrieben neu kalibriert. Zur Derivatisierung wird der Trocknungsrückstand der Festphasenextraktion wie für Lebensmittel beschrieben in 2 ml 1 N Salzsäure aufgenommen. Zu 1,6 ml dieser Lösung werden 32 µl einer CMO-Stammlösung (0,12 µmol/ ml in 1 N methanolischer Salzsäure; 3,8 nmol im Derivatisierungsansatz) gegeben, wie für Lebensmittel beschrieben derivatisiert und vermessen.

### 3.7.7 Bestimmung von Pentosidin

Pentosidin wird mittels Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Fluoreszenz-Detektion bei  $\lambda_{e_x}/\lambda_{e_m} = 335/385$  nm nach *Henle et al. (1991b und 1997)* am Aminosäureanalysator bestimmt. Zuordnung und Quantifizierung des Analyten erfolgen durch Vergleich von Retentionszeit und Peakfläche mit im Arbeitskreis synthetisiertem Referenzmaterial. Es wird extern durch Injektion verschiedener Volumina einer Stammlösung (147,5 pmol/ml) kalibriert.

#### 3.7.7.1 Pentosidin in Lebensmitteln

Für die Bestimmung des Gesamtpentosidins werden die Proben entsprechend Kapitel 3.7.2.1 sauer hydrolysiert, ein Aliquot in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt, in Natriumcitratpuffer (0,2 M, pH 2,2) aufgenommen und membranfiltriert (vgl. Tabelle 3.7-8).

Tabelle 3.7-8: Probenaufarbeitung zur Gesamtpentosidinbestimmung

Probe	einrotiertes Volumen	Volumen Citratpuffer
Kaffee	1 ml Hydrolysat	500 $\mu$ l
Pudding	2 ml Hydrolysat	500 $\mu$ l
Salzstangen	2 ml Hydrolysat	500 $\mu$ l

Für die Erfassung des nicht proteingebundenen Derivates werden die Proben wie folgt aufgearbeitet:

**Kaffee:** Nach Größenausschlusschromatographie nach 3.7.3 wird 1 ml Kaffee zur Trockne eingengt, in 500  $\mu$ l Loading buffer (siehe Tabelle 3.7-9) aufgenommen und membranfiltriert.

**Salzstangen:** 1,0 g Salzstangen wird im Mörser zerkleinert, auf 1 mg genau eingewogen, mit 15 ml Reinstwasser versetzt und 2 h gerührt. Nach Filtration werden 4,5 ml des Filtrates zur Trockne eingengt, in 500  $\mu$ l Loading buffer (siehe Tabelle 3.7-9) aufgenommen und membranfiltriert.

Die Bestimmung des freien und proteingebundenen Derivates erfolgt mittels Ionenaustauschchromatographie entsprechend folgender Parameter sowie Tabelle 3.7-9 und Tabelle 3.7-10.

Aminosäureanalysator: 4151 Alpha Plus, LKB-Biochrom, Pharmacia-LKB,  
 Trennsäule: analytischer Kationentauscher, 190 mm x 4,6 mm, 6 µm,  
 Detektion: Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 335/385$  nm  
 Injektionsvolumen: 20 µl  
 Kalibration: 0,7 bis 11,8 pmol  
 Flussrate: 20,0 ml/h

Tabelle 3.7-9: Eluenten für die Pentosidinbestimmung

Puffer-Nr.	Puffer	Molarität	pH-Wert
Loading buffer	Natriumcitrat	0,2 M	2,2
1	Natriumcitrat	0,2 M	3,2
2	Natriumcitrat	0,2 M	4,25
3	Natriumcitrat	1,2 M	6,45
4	Natriumcitrat	1,2 M	8,0
5	Natronlauge	0,4 M	-

Tabelle 3.7-10: Trennprogramm zur Pentosidinbestimmung

Zeit [min:s]	Puffer	Temperatur
5:00	1	55 °C
0:05	2	55 °C
0:25	1	55 °C
0:05	2	55 °C
0:25	1	55 °C
0:05	2	55 °C
0:25	1	55 °C
0:05	2	55 °C
0:25	1	55 °C
0:10	2	55 °C
0:20	1	55 °C
0:10	2	55 °C
0:20	1	55 °C
19:00	2	55 °C
5:00	3	65 °C
21:00	3	90 °C
5:00	3	90 °C
15:00	4	90 °C
8:00	5	90 °C
8:00	1	90 °C
8:00	1 (20%)	90 °C
13:00	1	55 °C

### 3.7.7.2 Pentosidin im Urin

Zur Bestimmung des freien Derivates werden 3,5 ml Urin im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt, in 500 µl Loading buffer (siehe Tabelle 3.7-9) aufgenommen und membranfiltriert. Für die Erfassung des Gesamtpentosidingehaltes wird das nach 3.7.2.1

erhaltene saure Hydrolysat (entspricht 3,5 ml Urin) vollständig zur Trockne eingeengt, in 500 µl Loading buffer (siehe Tabelle 3.7-9) aufgenommen und membranfiltriert. Die Ionenaustauschchromatographie erfolgt analog Kapitel 3.7.7.1.

#### 3.7.8 Bestimmung von Maltosin in Lebensmitteln

##### 3.7.8.1 Referenzlösungen

Zur Kalibration werden Maltosinstammlösungen aus der unter Kapitel 3.6.5 beschriebenen Hippurylmaltosinhydrolysatlösung ( $c = 21,0 \mu\text{mol/ ml}$ ) durch Verdünnung hergestellt. Für die Ionenaustauschchromatographie wird mit 0,2 molarem Natriumcitratpuffer (pH 2,2) und für die PLRP-HPLC mit destilliertem Wasser verdünnt.

Stammlösung 1:	21,0 µmol/ ml	unverdünnt
Stammlösung 2:	42,0 nmol/ ml	20 µl Stammlösung 1 auf 10 ml auffüllen
Stammlösung 3:	12,6 nmol/ ml	300 µl Stammlösung 2 auf 1 ml auffüllen
Stammlösung 4:	1,26 nmol/ ml	30 µl Stammlösung 2 auf 1 ml auffüllen

##### 3.7.8.2 Probenaufarbeitung

Die Proben werden entsprechend Kapitel 3.7.2.2 enzymatisch hydrolysiert, gefriergetrocknet, in 1 ml Citratpuffer für die Aminosäureanalyse oder Eluent A der PLRP-HPLC aufgenommen, membranfiltriert und mit dem jeweiligen chromatographischen System untersucht.

##### 3.7.8.3 Ionenaustauschchromatographie

Zur Festsetzung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden eine Standardkalibrierung und eine Matrixkalibrierung vorgenommen. Die Kalibrierung ohne Matrix erfolgt im Bereich von 5 bis 100 pmol durch Einspritzen von 10 bis 80 µl Maltosin-Stammlösung 4 ( $c = 1,26 \text{ nmol/ ml}$ ). Für den niedrigsten Standard (5 pmol) wird die Stammlösung weiter verdünnt (40 µl + 60 µl Puffer) und 10 µl dieser Verdünnung eingespritzt.

Für die Matrixkalibrierung werden 6 mg nach 3.7.2.2 enzymatisch hydrolysiertes Na-Caseinat in 1 ml Citratpuffer (0,2 M, pH 2,2) aufgenommen (Proteingehalt 6 mg/ ml) und entsprechend

Tabelle 3.7-11 mit Maltosin-Stammlösung 3 ( $c = 12,6 \text{ nmol/ml}$ ) dotiert. Der Proteingehalt im Einspritzvolumen ( $40 \mu\text{l}$ ) liegt bei  $120 \mu\text{g}$ , der Maltosingehalt reicht von 50 bis  $200 \text{ pmol}$ .

Zur Bestimmung in Lebensmitteln werden die enzymatischen Hydrolysate in  $1 \text{ ml}$   $0,2 \text{ molarem}$  Natriumcitratpuffer ( $\text{pH } 2,2$ ) aufgenommen, membranfiltriert und zur Ionenaustauschchromatographie eingesetzt.

Tabelle 3.7-11: Matrixkalibration zur Maltosinbestimmung mittels Ionenaustauschchromatographie

Protein-Hydrolysat [ $\mu\text{l}$ ]	Loading buffer [ $\mu\text{l}$ ]	Maltosin-Stammlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Maltosinkonzentration [ $\text{pmol}/40\mu\text{l}$ ]
150	150	0	0
	120	30	50,4
	90	60	100,8
	60	90	150,2
	30	120	201,6

Analysenparameter:

Aminosäureanalysator: 4151 Alpha Plus, LKB-Biochrom, Pharmacia-LKB,  
Trennsäule: analytischer Kationentauscher,  $190 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $6 \mu\text{m}$ ,  
Detektion:  $\lambda = 280 \text{ nm}$   
Injektionsvolumen:  $40 \mu\text{l}$   
Flussrate:  $20,0 \text{ ml/h}$

Tabelle 3.7-12: Puffer für die Maltosinbestimmung mittels Ionenaustauschchromatographie

Puffer-Nr.	Puffer	Molarität	pH-Wert
Loading buffer	Natriumcitrat	0,2 M	2,2
1	Natriumcitrat + 7 % 2-Propanol	0,2 M	3,2
2	Natriumcitrat	0,2 M	3,35
3	Natriumcitrat	0,2 M	4,25
4	Natriumcitrat	0,5 M	5,6
5	Natriumcitrat	1,2 M	6,45
6	Natronlauge	0,4	-

Tabelle 3.7-13: Trennprogramm zur Maltosinbestimmung

Zeit [min:s]	Puffer	Temperatur
5:00	1	$52 \text{ }^\circ\text{C}$
13:30	2	$56 \text{ }^\circ\text{C}$
14:00	3	$58 \text{ }^\circ\text{C}$
3:00	4	$62 \text{ }^\circ\text{C}$
15:00	4	$65 \text{ }^\circ\text{C}$
10:00	4	$67 \text{ }^\circ\text{C}$
20:00	5	$70 \text{ }^\circ\text{C}$
10:00	6	$85 \text{ }^\circ\text{C}$
7:00	1	$85 \text{ }^\circ\text{C}$
12:00	1 (10 %)	$85 \text{ }^\circ\text{C}$
6:00	1 (10 %)	$45 \text{ }^\circ\text{C}$
6:00	1	$50 \text{ }^\circ\text{C}$

#### 3.7.8.4 Umkehrphasen-HPLC an Polymermaterial (PLRP-HPLC)

Neben der Ionenaustauschchromatographie kommt eine Trennung mit einem Heptansulfonat/Acetonitril - Gradienten an Polymermaterial zum Einsatz. Grundlage des Trennsystems ist eine von *Liu et al. (1999)* entwickelte Methode zur Trennung von 3-Hydroxypyridin-4-onen. In Abwandlung zur Literatur wird für die vorliegende Arbeit eine Säule mit 300 Å Porengröße genutzt. Geräte- und Methodenparameter sind im Folgenden und Tabelle 3.7-16 dargestellt. Die Probenvorbereitung erfolgt analog Kapitel 3.7.8.2.

Die Kalibration ohne Matrix erfolgt im Bereich von 40 bis 1000 pmol im Einspritzvolumen von 30 µl durch Verdünnen einer Maltosin-Stammlösung 2 ( $c = 42,0 \text{ nmol/ ml}$ ) mit Wasser. Zur Absicherung der Trennleistung des Systems werden neben Maltosin die weiteren Hydrolyseprodukte von Hippurylmaltosin, Hippur- und Benzoesäure, die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, sowie Pyridosin und Maltol als Strukturanaloga injiziert. Zusätzlich wird Pyrralin als weiteres Maillard-Produkt eingesetzt.

Für die Matrixkalibrierung werden 3 mg nach 3.7.2.2 enzymatisch hydrolysiertes Na-Caseinat in 500 µl destilliertem Wasser aufgenommen (Proteingehalt 6 mg/ ml) und entsprechend Tabelle 3.7-14 mit Maltosin-Stammlösung 2 ( $c = 42,0 \text{ nmol/ ml}$ ) dotiert. Der Proteingehalt im Einspritzvolumen (30 µl) liegt bei 60 µg, der Maltosingehalt reicht von 50 bis 500 pmol.

Tabelle 3.7-14: Matrixkalibration zur Maltosinbestimmung mittels PLRP-HPLC

Protein-Hydrolysat [µl]	Wasser [µl]	Maltosin-Stammlösung [µl]	Maltosinkonzentration [pmol/ 30µl]
60	140	0	0
	132	8	50,4
	128	12	75,6
	124	16	100,8
	108	32	201,6
	60	80	504,0

Zur Ermittlung der Wiederfindung wird eine Doppelbestimmung mit enzymatisch hydrolysiertem Molkenpulver das mit 150 pmol/ 30 µl dotiert wird durchgeführt.

Neben Maltosin können in diesem Trennsystem auch Maltol und Pyrralin quantitativ erfasst werden. Es werden orientierende 3-Punkt-Matrixkalibration im Bereich von 100 bis 500 pmol/ 30 µl für Maltol und im Bereich von 100 bis 1000 pmol/ 30 µl für Pyrralin bei einem Proteingehalt von jeweils 60 µg im Einspritzvolumen vorgenommen. Hierzu werden 6 mg Na-Caseinat nach 3.7.2.2 enzymatisch hydrolysiert, nach Gefriertrocknung in 1000 µl

destilliertem Wasser aufgenommen (Proteingehalt 6 mg/ ml) und mit einer wässrige Stammlösung von Maltol ( $c = 79,3 \text{ nmol/ ml}$ ) bzw. Pyrralin ( $c = 140,8 \text{ nmol/ ml}$ ) entsprechend Tabelle 3.7-15 dotiert. Zur Herstellung der Maltol-Stammlösung werden 5 mg Maltol in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und 1 zu 1000 mit destilliertem Wasser verdünnt (10  $\mu\text{l}$  auf 10 ml auffüllen). Für die Pyrralin-Stammlösung wird eine vorhandenen Lösung (ca. 35 mg/ ml) 1 zu 100 verdünnt (10  $\mu\text{l}$  auf 1 ml auffüllen) und die genaue Konzentration unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes (vgl. 3.7.4) über die Extinktion bei  $\lambda = 297 \text{ nm}$  unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = 14454,4 \text{ l/ cm/ mol}$  berechnet.

Tabelle 3.7-15: Matrixkalibrationen zur Maltol- und Pyrralinbestimmung mittels PLRP-HPLC

Protein-Hydrolysat [ $\mu\text{l}$ ]	Wasser [ $\mu\text{l}$ ]	Maltol-Stammlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Pyrralin-Stammlösung [ $\mu\text{l}$ ]	Maltol-konzentration [pmol/ 30 $\mu\text{l}$ ]	Pyrralin-konzentration [pmol/ 30 $\mu\text{l}$ ]
60,0	140,0	0	-	0	-
	131,6	8,4	-	100	-
	119,0	21,0	-	250	-
	98,0	42,0	-	500	-
60,0	140,0	-	0	-	0
	135,3	-	4,7	-	99
	126,3	-	23,7	-	501
	92,5	-	47,5	-	1003

Die Peakidentität von Maltosin, Pyrralin und Maltol in der Matrix wird durch Messung mit Diodenarraydetektor und Vergleich der erhaltenen Spektren mit der jeweiligen Referenzsubstanz bestätigt.

Anlage: Analytische HPLC Äkta 10XT  
 Säule: PLRP-S, 150 mm x 4,6 mm, 8  $\mu\text{m}$ , 300 Å, Polymer Laboratories  
 Temperatur: 30 °C  
 Detektion: UV bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$   
 Injektionsvolumen: 30  $\mu\text{l}$   
 Flussrate: 1,0 ml/ min  
 Elution: binärer Gradient  
 Eluent A: 5 mM Na-Heptansulfonsäure (pH 2,0)  
 Eluent B: Acetonitril

Tabelle 3.7-16: Trennprogramm zur Maltosinbestimmung (PLRP-HPLC)

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	98	2
20,0	65	35
25,0	65	35
30,0	98	2
35,0	98	2

#### 3.7.9 Bestimmung von GOLD und MOLD in Lebensmitteln

Die Bestimmung von GOLD und MOLD in Lebensmitteln erfolgt mittels Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung nach saurer Hydrolyse (vgl. Kapitel 3.7.2.1, *Siegl, 2003*). Als externer Standard kommt im Arbeitskreis synthetisiertes Referenzmaterial zum Einsatz.

Ninhydrinreagenz: 1 %ige Lösung von Ninhydrin in einem Gemisch von Ethylenglycol und 5 M Acetatpuffer (7 : 3)

Aminosäureanalysator: 4151 Alpha Plus, LKB-Biochrom, Pharmacia-LKB,

Trennsäule: analytischer Kationentauscher, 125 mm x 4,6 mm, 6 µm,

Detektion:  $\lambda = 570$  nm und  $\lambda = 440$  nm

Injektionsvolumen: 20 - 80 µl

Flussrate: 16,0 ml/ h

Tabelle 3.7-17: Puffer zur Bestimmung von GOLD und MOLD

Puffer-Nr.	Puffer	Molarität	pH-Wert
Loading buffer	Natriumcitrat	0,2 M	2,2
1	Reinstwasser, konserviert mit 0,1 % Tetrahydrofuran	-	-
2	Natriumcitrat	0,2 M	3,82
3	Natriumcitrat	0,2 M	4,25
4	Gemisch aus Puffer 2 und 4 (50 : 50)	0,7 M	6,25
5	Natriumcitrat	1,2 M	6,35
6	Natronlauge	0,4 M	-

Tabelle 3.7-18: Trennprogramm zur Bestimmung von GOLD und MOLD

Zeit [min:s]	Puffer	Temperatur
5:00	2	48 °C
10:00	3	68 °C
18:00	4	70 °C
7:00	4	80 °C
20:00	5	93 °C
15:00	6	93 °C
2:00	6	83 °C
2:00	2	83 °C
17:00	2 (20 % in 1)	83 °C
12:00	2	48 °C



### 3.7.10 Aminosäureanalyse – Bestimmung von Lysin und Glycin, Nachweis von CML

Die Untersuchung erfolgt mittels Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung nach *Henle et al. (1991b)*. Zur Aminosäureanalyse eingesetzt werden enzymatische und saure Hydrolysate nach Kapitel 3.7.2.1

Aminosäureanalysator: 4151 Alpha Plus, LKB-Biochrom, Pharmacia-LKB,

Trennsäule: analytischer Kationentauscher, 125 mm x 4,6 mm, 6 µm,

Detektion:  $\lambda = 570$  nm und 440 nm

Injektionsvolumen: 20 - 60 µl

Flussrate: 25,0 ml/ h

Tabelle 3.7-19: Puffer für die Aminosäureanalyse

Puffer-Nr.	Puffer	Molarität	pH-Wert
Loading buffer	Natriumcitrat	0,2 M	2,2
1	Reinstwasser mit 0,1 % Tetrahydrofuran	-	-
2	Natriumcitrat	0,2 M	3,18
3	Natriumcitrat	0,2 M	4,20
4	Natriumcitrat	1,2 M	6,45
5	Natronlauge	0,4 M	-

Tabelle 3.7-20: Trennprogramm zur Aminosäureanalyse (*Henle et al., 1991b*)

Zeit	Puffer	Temperatur
4:00	2	55 °C
0:05	3	55 °C
0:25	2	55 °C
0:05	3	55 °C
0:25	2	55 °C
0:05	3	55 °C
0:25	2	55 °C
0:05	3	55 °C
0:25	2	55 °C
0:10	3	55 °C
0:20	2	55 °C
0:10	3	55 °C
0:20	2	55 °C
19:00	3	55 °C
5:00	4	65 °C
28:00	4	90 °C
10:00	5	90 °C
8:00	2	90 °C
8:00	2 (20 %)	90 °C
11:00	2	55 °C

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Vorkommen von Lysin und Lysinderivaten in Milch und Milchprodukten

Wie in Kapitel 2.2 aufgezeigt existieren in der Literatur nur wenige und teilweise widersprüchliche Daten zu Vorkommen und Gehalt einzelner Lysinderivate der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln. Demgegenüber gibt es nach wie vor Verbindungen, deren Bildung aus reduzierenden Zuckern und Lysin zwar in Modellversuchen belegt wurde, deren Nachweis in Lebensmitteln aber bislang nicht erfolgt ist. Ziel der Arbeit war daher zunächst eine Gegenüberstellung von Lysinderivatisierung und den Gehalten an Amadori-Produkt, N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML), Pyrralin (Pyr), Glyoxal-Lysin-Dimer (GOLD), Methylglyoxal-Lysin-Dimer (MOLD) und Lysinoalanin (LAL) im Sinne einer Bilanzierung. Auf diesem Wege sollten Aussagen zur Relevanz der untersuchten Verbindungen für die Lysinderivatisierung getroffen und der Beitrag noch unbekannter bzw. in Lebensmitteln noch nicht nachgewiesener Modifizierungen abgeschätzt werden. Hierzu wurden die Gehalte an oben genannten Derivaten und Lysin in verschiedenen kommerziellen Milchprodukten, je drei Proben pasteurisierte (PM), ultrahoherhitze (UHT) und Kondensmilch (KD), sowie drei Proben Magermilchpulver (MMP), bestimmt. Darüber hinaus wurden zwei für 1 h bzw. 3 h bei 80 °C weiter erhitzte Milchpulver und zwei analog behandelte pasteurisierte Milchproben untersucht.

Als Bezugswert für die Bilanzierung diente die Summe aus Lysin und dessen Derivaten in pasteurisierter Milch. Aus der Gegenüberstellung dieses Ausgangswertes mit den ermittelten Lysin- und Derivatgehalten in den stärker behandelten Milchprodukten ergaben sich die jeweilige Lysinmodifizierung sowie die Anteile der einzelnen Verbindungen daran.

#### 4.1.1 Amadori-Produkt als Lactoselysin

Die Bestimmung des Amadori-Produktes erfolgte nach saurer Hydrolyse der Proben (6 N Salzsäure, 23 h, 110 °C) indirekt über die Ermittlung der Furosingehalte mittels RP-HPLC und UV-Detektion bei  $\lambda = 280$  nm nach *Resmini et al. (1990)* und *Knobloch (1999)*. Furosin wurde durch Retentionszeitvergleich mit einem kommerziell erhältlichen Standard als basisliniengetrennter Peak bei ca. 22 min identifiziert. Beispielchromatogramme für die

Trennung der Probe und die Zuordnung des Furosinstandards sind in Abbildung 4.1-1 dargestellt.

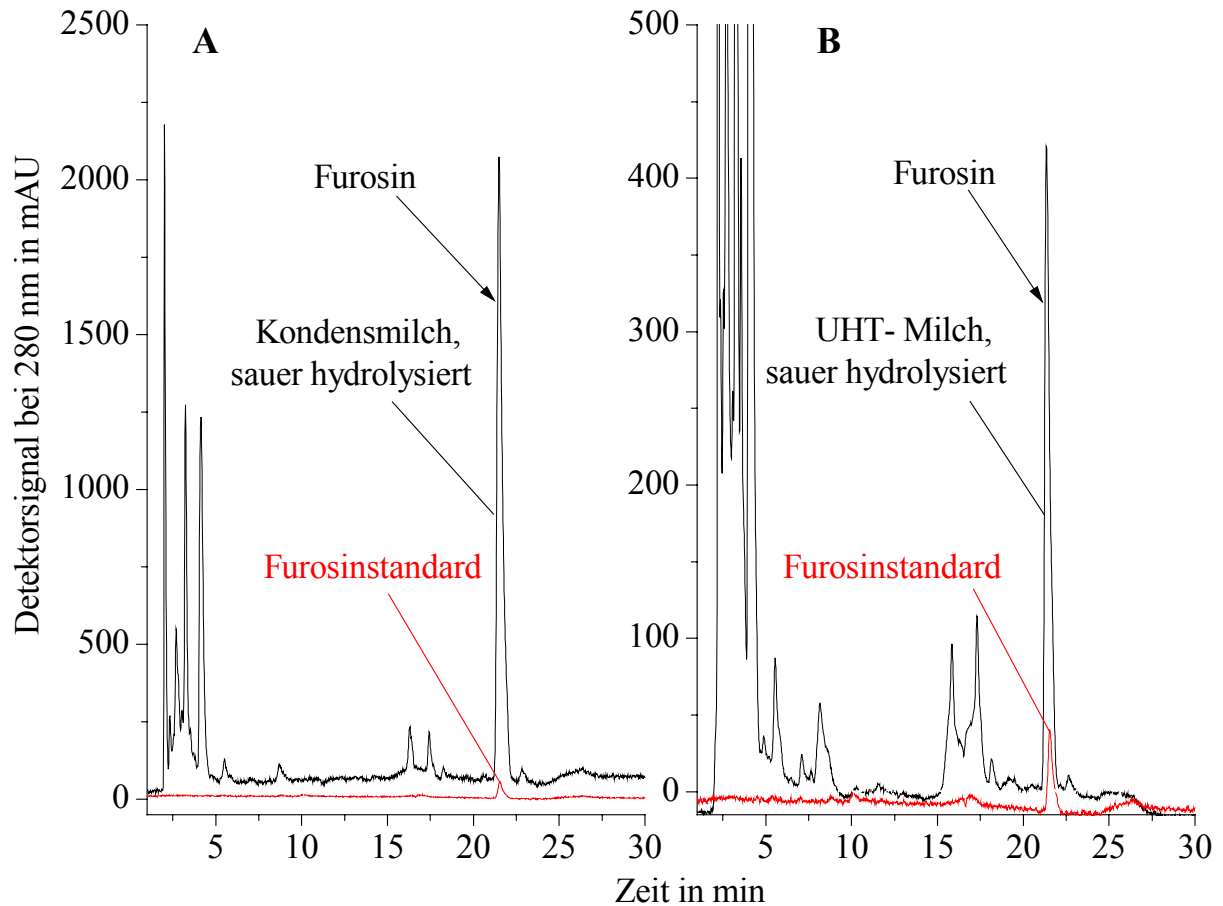


Abbildung 4.1-1: Bestimmung von Furosin in sauer hydrolysierte Kondens- (A) und UHT- Milch (B); RP-HPLC mit Detektion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$

Die Umrechnung auf das Amadori-Produkt als Lactoselysin (LacLys) erfolgte nach *Krause et al. (2003)* durch Multiplikation der für Furosin ermittelten Stoffmengen mit dem Überföhrungsfaktor 2,9. Die ermittelten Werte für Furosin und das Amadori-Produkt sind in Tabelle 4.1-1 dargestellt.

Die niedrigsten Amadori-Produkt-Gehalte wurden, wie aufgrund der schonenden thermischen Behandlung erwartet, in der pasteurisierten Milch gemessen ( $0,08 \pm 0,04 \text{ mmol LacLys/ 100 g Protein}$ ). Durch Inkubation bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  stieg der Wert innerhalb von 3 h annähernd um den Faktor 20 auf  $1,49 \pm 0,25 \text{ mmol LacLys/ 100 g Protein}$  an. Die für UHT-Milch bestimmten Gehalte liegen mit  $1,51 \pm 0,12 \text{ mmol LacLys/ 100 g Protein}$  in der gleichen Größenordnung. Die ermittelten Werte werden durch Vergleich mit den in Kapitel 2.2.1 genannten

Literaturdaten gestützt. So werden für pasteurisierte Milch Gehalte bis zu 7,5 mg Furosin je 100 g Protein, entsprechend 0,09 mmol LacLys/ 100 g Protein, und für UHT-Milch von bis zu 300 mg Furosin (3,43 mmol LacLys)/ 100 g Protein beschrieben (z.B. *Resmini et al., 1992*). Der für Kondensmilch bestimmte Gehalt von  $7,35 \pm 1,66$  mmol LacLys/ 100 g Protein lässt sich im wesentlichen auf den im Vergleich zu den anderen Milchprodukten erhöhten Lactosegehalt und damit einer höheren Eduktkonzentration zurückführen.

Tabelle 4.1-1: Furosin\*- und Lactoselysingehalte in Milch und Milchprodukten (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

	Proben- anzahl	Furosin*		Lactoselysin	
		[mmol/ 100 g Prot.]	[g/ kg Prot.]	[mmol/ 100 g Prot.]	[g/ kg Prot.]
Pasteurisierte Milch	5	$0,03 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,20$
1 h bei 80 °C inkubiert	3	$0,08 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,10$	$1,08 \pm 0,45$
3 h bei 80 °C inkubiert	3	$0,51 \pm 0,09$	$1,30 \pm 0,22$	$1,49 \pm 0,25$	$6,99 \pm 1,18$
UHT-Milch	3	$0,52 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,11$	$1,51 \pm 0,12$	$7,07 \pm 0,58$
Kondensmilch	3	$2,53 \pm 0,57$	$6,44 \pm 1,46$	$7,35 \pm 1,66$	$34,54 \pm 7,81$
Magermilchpulver	3	$0,76 \pm 0,17$	$1,94 \pm 0,43$	$2,21 \pm 0,50$	$10,40 \pm 2,33$
1 h bei 80 °C inkubiert	2	$3,78 \pm 0,88$	$9,59 \pm 2,24$	$10,95 \pm 2,56$	$51,45 \pm 12,03$
3 h bei 80 °C inkubiert	2	$8,84 \pm 0,29$	$22,46 \pm 0,73$	$25,64 \pm 0,83$	$120,52 \pm 3,91$

\*: nach saurer Hydrolyse

Die oben für pasteurisierte Milch beschriebene eritzungsabhängige Zunahme der Furosin- bzw. Lactoselysingehalte wird auch beim Magermilchpulver beobachtet (unbehandelt:  $2,21 \pm 0,50$  mmol LacLys/ 100 g Protein, nach 3 h bei 80 °C:  $25,64 \pm 0,83$  mmol LacLys/ 100 g Protein), wobei die für das trockene Produkt ermittelten Werte die der pasteurisierten Milch deutlich übersteigen. So erreichen die in der Milch messbaren Gehalte auch nach dreistündiger Inkubation nicht die Ausgangsgehalte im Milchpulver ( $1,49 \pm 0,25$  mmol LacLys/ 100 g Protein vs.  $2,21 \pm 0,50$  mmol LacLys/ 100 g Protein). Ursache hierfür ist zum einen eine stärkere thermische Prozessierung des Ausgangsproduktes im Zuge der Herstellung des Milchpulvers. Zum anderen verläuft die Bildung des Amadori-Produktes unter Wasserabspaltung und wird daher in wasserarmen Systemen gefördert. Insgesamt sind die im für 3 h weiter erhitzten Milchpulver gemessenen Gehalte überraschend hoch, da bei längerer Erhitzung mit einem Abbau des Amadori-Produktes zugunsten der fortgeschrittenen Derivate zu rechnen war. Offenbar tritt dieser Prozess erst zu einem späteren Zeitpunkt bzw. bei höheren Temperaturen ein. Die in der Literatur angegebenen Amadori-Produkt-Gehalte in Milchpulvern liegen mit 0,71 bis 4,72 mmol Furosin/ 100 g Protein (LacLys: 2,06 bis 13,69 mmol/ 100 g) in ähnlichen Größenordnungen wie hier bestimmt, wobei walzengetrocknetes Pulver die höchsten Werte aufwies (z.B. *Henle et al., 1995*).

### 4.1.2 Lysin und Lysinderivatisierung

Für die Bestimmung von Lysin wurde ein im Institut etabliertes Ionenaustauschchromatographie-System mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und photometrischer Detektion des Aminosäurederivates bei  $\lambda = 570$  nm (Henle *et al.*, 1991b) genutzt. Zur Freisetzung des im Proteinverband gebundenen Lysins geht der chromatographischen Trennung eine saure Hydrolyse mit 6 N Salzsäure voraus (vgl. Kapitel 3.7.2.1). Neben den proteinogenen Aminosäuren können in diesem System auch die Artefakte der Säurehydrolyse des Amadori-Produktes, Pyridosin und Furosin mit erfasst werden (vgl. Abbildung 4.1-2).

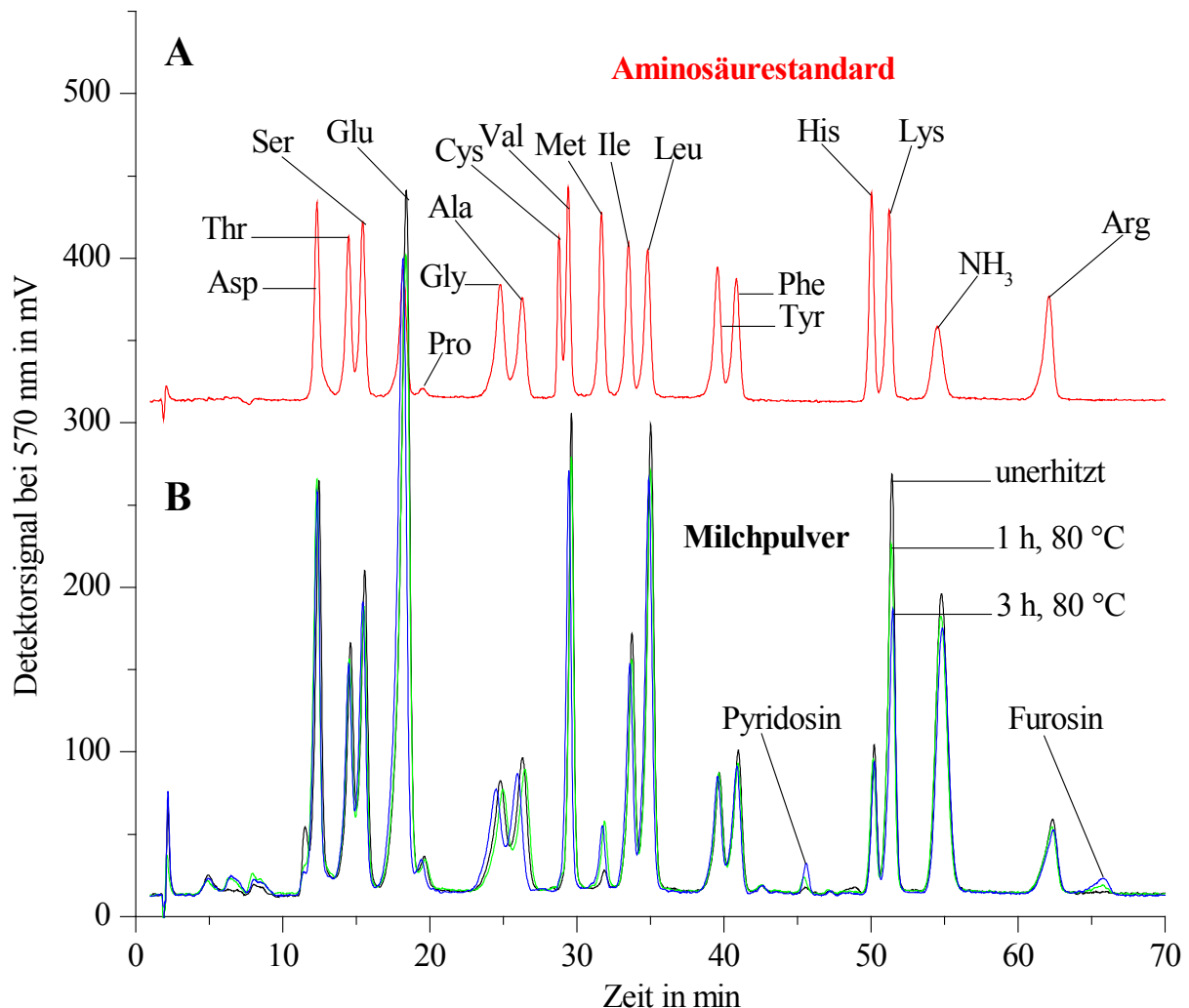


Abbildung 4.1-2: Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung zur Aminosäureanalyse, Detektion bei  $\lambda = 570$  nm; A: Mischung verschiedener Aminosäuren (jeweils 25 nmol), B: Milchpulver, 0 h bis 3 h bei 80 °C erhitzt und sauer hydrolysiert

Da es unter diesen Bedingungen zur Rückbildung der Aminosäure aus dem ebenfalls in Lebensmitteln enthaltenen Amadori-Produkt kommt, wurden die ermittelten Lysingehalte nach Bestimmung des Amadori-Produktes um den daraus freigesetzten Betrag, nach *Krause (2005)* 57,9 % des ermittelten Lactoselysins, korrigiert (vgl. Tabelle 4.1-2).

Tabelle 4.1-2: Lysingehalte in Milch und Milchprodukten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	Proben- anzahl	Lys gemessen [mmol/ 100 g Prot.]	Lys aus AP [mmol/ 100 g Prot.]	Lys korrigiert [mmol/ 100 g Prot.]
Pasteurisierte Milch	5	60,03 $\pm$ 2,91	0,05 $\pm$ 0,02	59,98 $\pm$ 2,93
1 h bei 80 °C inkubiert	3	58,40 $\pm$ 2,33	0,13 $\pm$ 0,06	58,27 $\pm$ 2,39
3 h bei 80 °C inkubiert	3	55,43 $\pm$ 1,88	0,86 $\pm$ 0,15	54,57 $\pm$ 2,03
UHT-Milch	3	56,90 $\pm$ 5,10	0,87 $\pm$ 0,07	56,03 $\pm$ 5,17
Kondensmilch	3	50,17 $\pm$ 1,46	4,26 $\pm$ 0,96	45,91 $\pm$ 2,42
Magermilchpulver	3	55,30 $\pm$ 1,84	1,28 $\pm$ 0,29	54,02 $\pm$ 2,13
1 h bei 80 °C inkubiert	2	53,95 $\pm$ 1,00	6,34 $\pm$ 1,48	47,61 $\pm$ 2,48
3 h bei 80 °C inkubiert	2	41,90 $\pm$ 2,26	14,85 $\pm$ 0,48	27,05 $\pm$ 2,74

Entsprechend der zu erwartenden fortschreitenden Lysinderivatisierung ist für die Gehalte der unmodifizierten Aminosäure eine Abnahme mit zunehmender thermischer Behandlung zu beobachten. Die in pasteurisierter Milch gemessenen und bezüglich der Lysinrückbildung aus dem Amadori-Produkt korrigierten Lysingehalte sinken im Verlauf der Inkubation bei 80 °C von 60,0  $\pm$  2,9 mmol/ 100 g Protein für die „unbehandelte“ Probe auf 58,3  $\pm$  2,4 mmol/ 100 g Protein nach einer und 54,6  $\pm$  2,0 mmol/ 100 g Protein nach 3 h. Dies entspricht einer Abnahme um 3 % bzw. 9 %. Ausgeprägter ist die für das inkubierte Milchpulver beobachtete Abnahme. Hier sinkt der Gehalt an unmodifiziertem Lysin von 54,0  $\pm$  2,1 mmol/ 100 g Protein innerhalb einer Stunde bei 80 °C auf 47,6  $\pm$  2,5 mmol/ 100 g Protein und nach 3 Stunden auf 27,1  $\pm$  2,7 mmol/ 100 g Protein ab. Dies entspricht einer Verminderung des Lysingehaltes um 12 % bzw. 50 %. Auch hier kommt, wie schon für das Amadori-Produkt diskutiert, neben der höheren thermischen Belastung des Ausgangsmaterials, belegt durch den im Vergleich zur pasteurisierten Milch niedrigeren Lysingehalt des „unbehandelten“ Milchpulvers, die Förderung unter Wassereliminierung ablaufender Prozesse zum Tragen. UHT- und Kondensmilch zeigen im Vergleich zur pasteurisierten Milch ebenfalls deutlich verminderte Lysingehalte. Zurückzuführen ist dies auch hier auf die thermische Behandlung bzw., im Falle der Kondensmilch, auf den höheren Zuckergehalt der Probe.

### 4.1.3 Pyrralin

Für die quantitative Erfassung von Pyrralin wurde zunächst eine für die Analyse in Modellsystemen entwickelte isokratische Ionenpaarchromatographie mit Natriumpentansulfonat in 10 % Ethanol bei pH 3,0 (*Bachmann, 1994*) für das Trennproblem in Milch und Milchprodukten angepasst. Die Detektion bei  $\lambda = 297$  nm, im Absorptionsmaximum von Pyrralin, ermöglichte die Quantifizierung des Derivates trotz Koelution mit Phenylalanin, welches bei dieser Wellenlänge keine Absorption zeigt. Die Vollständigkeit der zur Freisetzung des säurelabilen Pyrrols aus dem Proteinverband angewandte enzymatische Hydrolyse wurde durch Vergleich der Aminosäurezusammensetzungen eines Milchpulvers nach enzymatischer bzw. saurer Totalhydrolyse (vgl. Kapitel 3.7.2) sichergestellt (Tabelle 4.1-3). Für Lysin wurde ein Hydrolysegrad von > 91 % erreicht.

Tabelle 4.1-3: Hydrolysegrad in Milchpulver nach enzymatischer im Vergleich zur sauren Hydrolyse

	Lysin [nmol/ mg]	Valin [nmol/ mg]	Glycin [nmol/ mg]	Tyrosin [nmol/ mg]
Saure Hydrolyse	194,7	197,6	96,8	82,9
Enzymatische Hydrolyse	177,7	196,0	74,8	97,8
Proteolysegrad	91,1 %	99,2 %	77,3 %	118,0 %

Die Identifizierung von Pyrralin im chromatographischen System erfolgte durch Retentionszeitvergleich mit einem in der Arbeitsgruppe synthetisierten Standard. Der Analyt eluiert als basisliniengetrennter Peak bei ca. 4,8 min (vgl. Abbildung 4.1-3). Bestätigt wurde dies durch synchrone Aufnahme der UV-Spektren mittels Diodenarraydetektor und Spektrenvergleich mit der Referenzsubstanz. Das Signal bei ca. 7,8 min konnte Tryptophan zugeordnet werden und diente bei Retentionszeitverschiebungen als interner Standard. Während in Untersuchungen von *Henle et al. (1994)* Pyrralin erst in sterilisierter Milch nachzuweisen war, konnte in der vorliegenden Arbeit bereits in Rohmilch ein Pyrralingehalt von 16,5 mg/ kg Protein bestimmt werden (Abbildung 4.1-3).

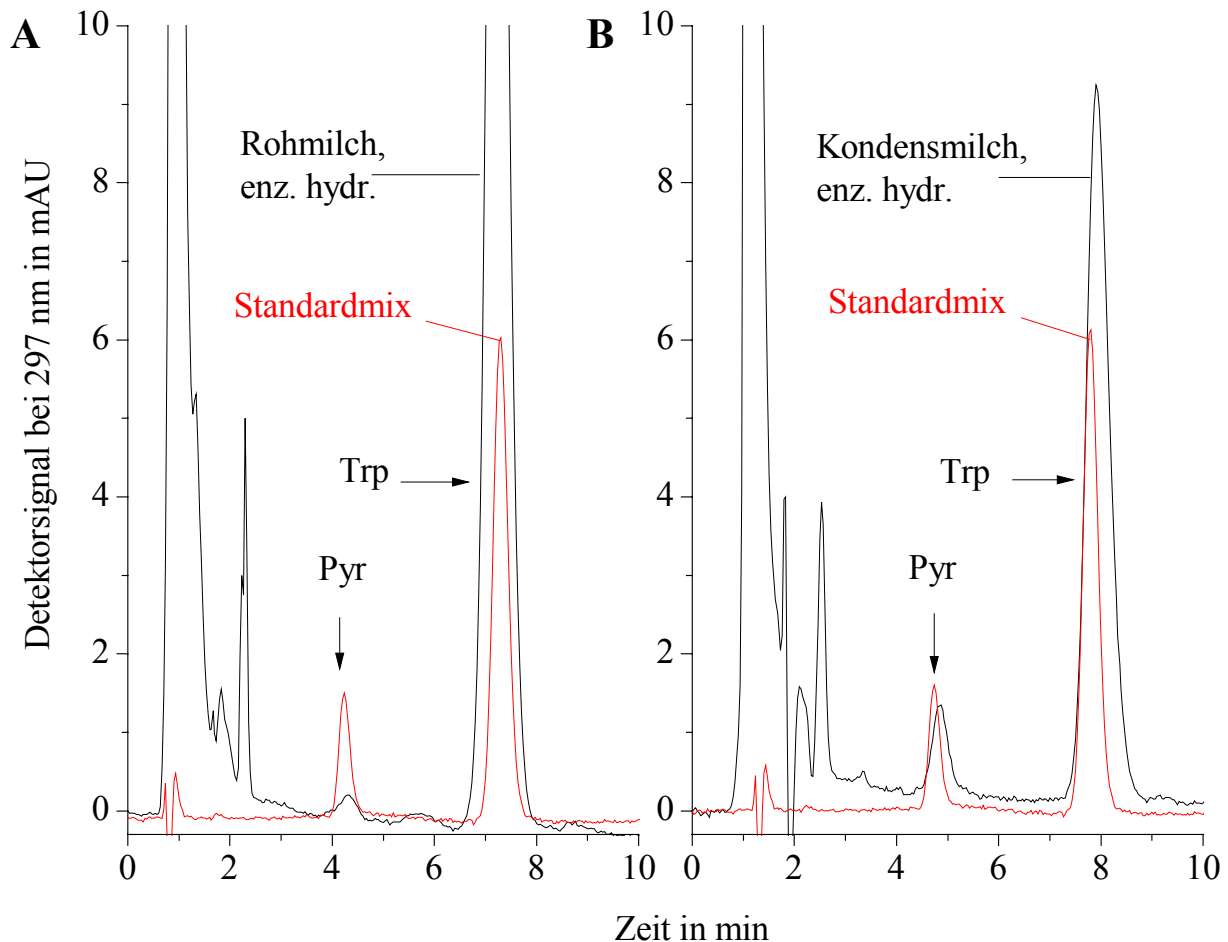


Abbildung 4.1-3: Bestimmung von Pyrralin (Pyr, 40 pmol im Standard) und Tryptophan (Trp, 5 nmol im Standard) in enzymatisch hydrolysiertes (enz. hydr.) Roh- (A) und Kondensmilch (B); isokratische Ionenaenchromatographie mit Detektion bei  $\lambda = 297 \text{ nm}$

Da Rohmilch weitgehend thermisch unbehandelt ist und nur am Tag der Gewinnung abgegeben werden darf, ist nicht mit einer Bildung von Pyrralin infolge von Verarbeitung oder Lagerung der Probe zu rechnen. Das Vorhandensein von Lactose und Lysin in der Milch in Verbindung mit den zum Teil alkalischen Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse (pH 8,2 bei Inkubation mit Pronase E) legte die Vermutung nahe, dass es im Verlauf der enzymatischen Hydrolyse zur Bildung des Derivates kommt. Dies konnte durch Untersuchung von enzymatischen Hydrolysaten von unbehandeltem Natriumcaseinat und Mischungen mit Lactose nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass mit steigendem Zuckeranteil verstärkt Pyrralin gebildet wird (vgl. Abbildung 4.1-4).



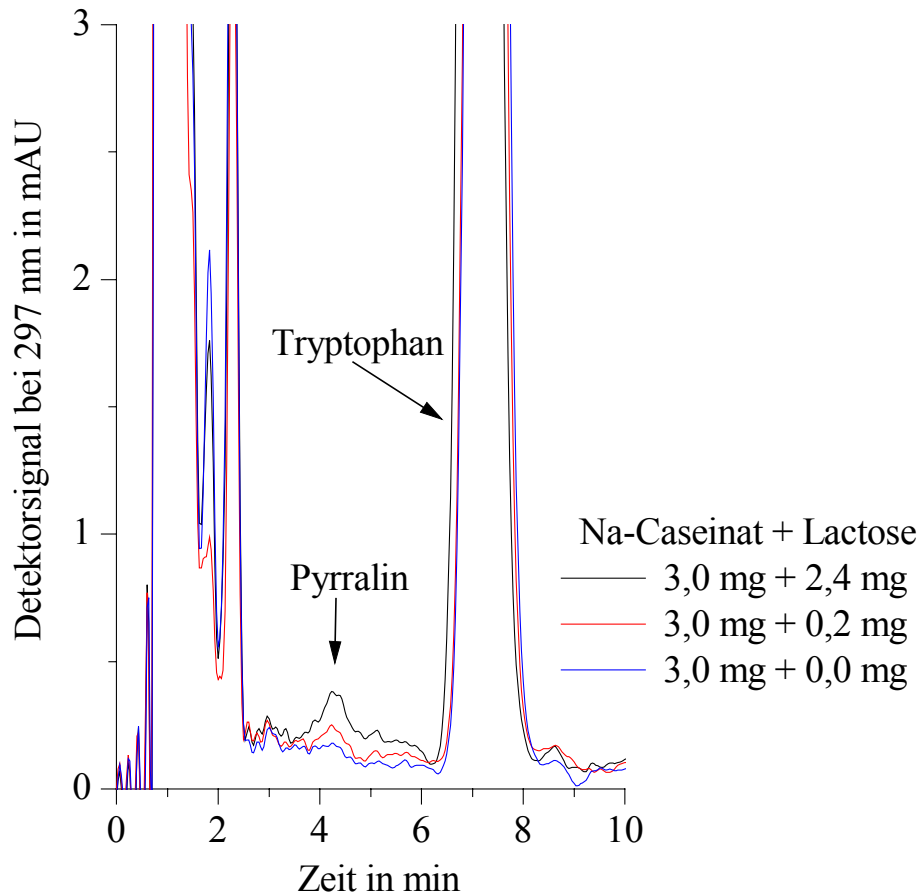


Abbildung 4.1-4: Nachweis der Pyrralinbildung während der enzymatischen Hydrolyse von Mischungen von Natriumcaseinat und Lactose; isokratische Ionenpaarchromatographie mit Detektion bei  $\lambda = 297 \text{ nm}$

Da wegen der geringen Stabilität des Pyrrols im sauren Milieu nicht auf die enzymatische Hydrolyse verzichtet werden kann, ergab sich die Notwendigkeit diese methodenbedingte Pyrralinbildung durch eine Matrixkalibration auszugleichen. Als Grundmatrix für Milch und Milchprodukte wurde eine enzymatisch hydrolysierte Rohmilchprobe genutzt. Für Kalibrationen ohne Matrix ermittelte *Bachmann (1994)* Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von 1-2 bzw. 5 pmol Pyrralin pro Injektion. Diese Werte konnten mit Matrix nicht erreicht werden. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden bei Linearität der Kalibrationsgerade bis 250 pmol pro Injektion (50  $\mu\text{l}$ ) mit 5 bzw. 10 pmol entsprechend 7,0 bzw. 12,7 mg/ kg Protein abgeschätzt. Die Wiederfindungen in UHT- und Kondensmilch betragen 104 - 107 %. Insgesamt ergaben sich für die untersuchten Milchprodukte die in Tabelle 4.1-4 angegebenen Pyrralingehalte im ppm-Bereich. In den flüssigen Handelsproben konnten unabhängig vom Erhitzungsgrad ca. 10 mg Pyrralin/ kg Protein bestimmt werden. Lediglich in der Kondensmilch wurden höhere Werte von ca.  $100 \pm 33 \text{ mg/ kg Protein}$  erreicht.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen *Henle et al. (1994)*, die für pasteurisierte und UHT-Milch Pyrralingehalte von  $< 2$  mg/ kg Protein ermittelten, in Kondensmilch dagegen 120 mg/ kg Protein nachwies. Auch die in den Magermilchpulvern ermittelten Werte stimmen mit den Literaturdaten überein. Während *Henle et al. (1994)* die Gehalte mit  $< 2$  bis 150 mg/ kg Protein angeben wurden in der vorliegenden Arbeit Werte von 25 bzw. bis zu 178 mg/ kg Protein in weiter erhitzten Proben ermittelt.

Tabelle 4.1-4: Pyrralin- und Furosingehalte\* in Milchprodukten in mg/ kg Protein

	Proben- anzahl	Pyrralingehalt		Furosingehalt
		[ $\mu$ mol/ 100 g Protein]	[mg/ kg Protein]	[mg/ kg Protein]
Pasteurisierte Milch	5	$4 \pm 2$	$10,2 \pm 5,1$	$70 \pm 40$
1 h 80 °C	3	$4 \pm 1$	$10,2 \pm 2,5$	$200 \pm 80$
3 h 80 °C	3	$5 \pm 1$	$12,7 \pm 2,5$	$1300 \pm 220$
UHT-Milch	3	$4 \pm 1$	$10,2 \pm 2,5$	$1320 \pm 110$
Kondensmilch	3	$39 \pm 13$	$99,1 \pm 33,0$	$6440 \pm 1460$
Magermilchpulver	3	$10 \pm 3$	$25,4 \pm 7,6$	$1940 \pm 430$
1 h bei 80 °C inkubiert	2	$15 \pm 4$	$38,1 \pm 10,2$	$9590 \pm 2240$
3 h bei 80 °C inkubiert	2	$70 \pm 26$	$177,8 \pm 66,0$	$22460 \pm 730$

\*: nach saurer Hydrolyse

In den trocken erhitzten Proben zeigte sich somit eine deutliche Zunahme der Pyrralingehalte mit der Inkubationsdauer. In den flüssigen Proben konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. So ist eine Unterscheidung von pasteurisierter und ultrahocherhitzter Milch anhand der Pyrralingehalte im Gegensatz zum als Erhitzungsindikator genutzten Furosin nicht möglich. Auch in den Milchpulvern ist der Anstieg der Pyrralingehalte im Vergleich zum Furosin deutlich weniger ausgeprägt. Durch einstündige Erhitzung bei 80 °C nehmen die Pyrralingehalte annähernd um den Faktor 2 zu, während sich die Furosinwerte bereits verfünffachen. Pyrralin ist somit zwar ein möglicher Indikator für den Fortschritt der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln mit geringem Wassergehalt, die Empfindlichkeit ist jedoch deutlich niedriger als die von Furosin, bzw. des Amadori-Produktes. Zu ähnlichen Ergebnissen kam *Bachmann (1994)* in Modellstudien. Während die Pyrralinbildung in weiter erhitzten Milchpulvern und Magermilchen in den ersten Stunden annähernd linear zunahm zeigte die Bildung des Amadori-Produktes im gleichen Zeitraum einen logarithmischen Anstieg.

Neben Milchprodukten wurde die Methode zur Bestimmung von Pyrralin auch auf andere Lebensmittelgruppen angewandt. Wegen der geringen Probenzahl und da die Übertragung der Matrixkalibration für Milchprodukte auf andere Lebensmittel nur bedingt möglich ist, haben die in Tabelle 4.1-5 angegebenen Werte nur orientierenden Charakter.

Tabelle 4.1-5: Abgeschätzte Pyrralingehalte in anderen Lebensmitteln

	Probenanzahl	Pyrralingehalt [mg/ kg Protein]
Backwaren	3	100 - 1700
Schokoladenprodukte	2	260
Kaffeepulver	1	400
Braumalz	2	700
Bier	2	150

Es zeigte sich, dass die Gehalte in Gebäck, Kaffeepulver und Braumalz die in Milchprodukten gemessenen Werte deutlich übersteigen. In Backwaren, besonders in Krustenbestandteilen und gelaugten Produkten, werden Pyrralingehalte erreicht, die bis in Größenordnungen von 2 g Pyrralin/ kg Protein reichen. Dies deckt sich mit Angaben von *Henle et al. (1994)*, die in Salzgebäck und Brotkruste Gehalte von 240 mg bzw. bis zu 3,5 g/ kg Protein bestimmten.

Allgemein liegen die bei Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln gebildeten Pyrralingehalte um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als die Furosingehalte. Auch die Gehalte an N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin übersteigen die Werte von Pyrralin um den Faktor 5 bis 10 (vgl. Tabelle 4.1-9 in Kapitel 4.1.7). Pyrralin ist demnach vor allem in stark erhitzten Produkten wie Backwaren für die Lysinderivatisierung von Bedeutung. Die für Milchprodukte vergleichsweise hohen Gehalte in Kondensmilch deuten auf den Zuckergehalt als zweiten entscheidenden Faktor für die Pyrralinbildung neben dem Erhitzungsgrad hin.

#### 4.1.4 N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin

Die Bestimmung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) erfolgte nach einer von *Richter (2001)* in Anlehnung an *Knecht et al. (1991)* entwickelten GC-MS-Methode nach Derivatisierung der Carboxymethylaminosäure zum Trifluoressigsäuremethylester (TFAME). N<sup>ε</sup>-Carboxymethylornithin (CMO) diente als interner Standard für die Quantifizierung. Beide Verbindungen wurden wie in Kapitel 3.6 beschrieben zunächst synthetisiert und anschließend zur Auswahl von Qualifier- und Targetionen im SCAN-Modus vermessen. Die Trifluoressigsäuremethylester der Carboxymethylaminosäuren eluieren bei 23,6 (CMO) bzw. 25,9 min (CML) und zeigen die in Abbildung 4.1-5 angegebenen Fragmentierungsmuster. Die daraus ausgewählten Qualifier- und Targetionen sind in Tabelle 4.1-6 dargestellt. Die Detektion in Lebensmitteln erfolgte im SIM-Modus (selected ion monitoring). Zur Quantifizierung wurde die Peakfläche des CML-TFAME-Targetions ( $m/z = 392$ ) ins Verhältnis zur Peakfläche des entsprechenden CMO-Derivates (Targetion  $m/z = 351$ ) gesetzt.

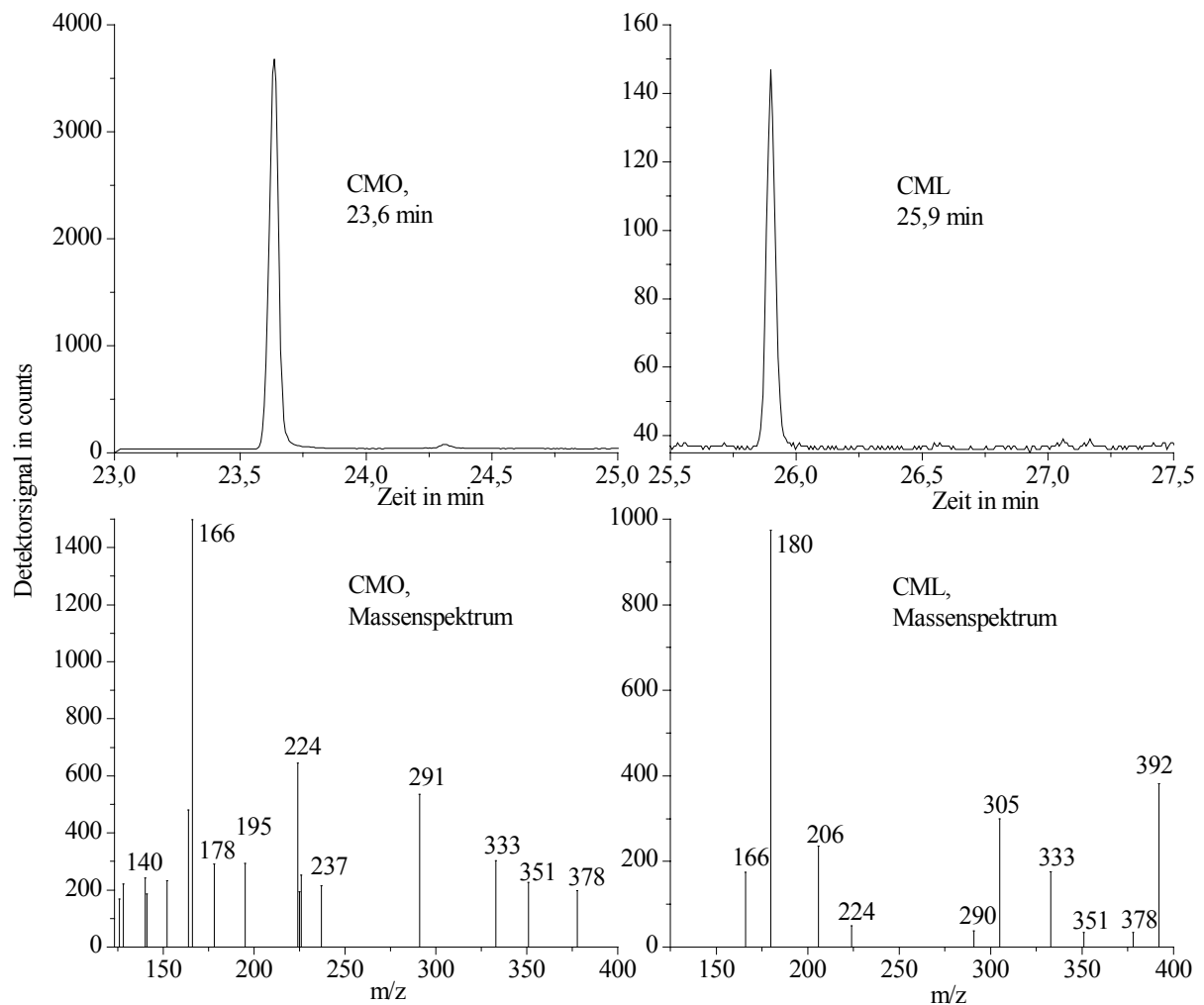


Abbildung 4.1-5: Totalionenstromchromatogramme (oben) und Massenspektren (unten) der TFAME-Derivate von N<sup>ε</sup>-Carboxymethylornithin (CMO) und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML); GC-MS-Messung im SCAN-Modus

Tabelle 4.1-6: Qualifier- und Targetionen der Massenspektroskopie zur CML-Bestimmung

	CML	CMO
Targetionen	392, 305, 206, 180	378, 351, 333, 291, 224, 166
Qualifierion	392	351

Die Bestimmung von CML in Milchprodukten ist in Abbildung 4.1-6 am Beispiel einer Milchpulverprobe dargestellt. Das Totalionenstromchromatogramm weist eine Vielzahl von Peaks auf, während die Massenspuren der Targetionen der TFAME-Derivate der Carboxymethylaminosäuren basisliniengetreunte Peaks zu den bereits für die Referenzsubstanzen beobachteten Retentionszeiten aufweisen. Zur Absicherung der Peakidentitäten wurden die Verhältnisse der Signalintensitäten der weiteren Qualifierionen mit denen der Referenzsubstanzen verglichen. Die so in Milch und Milchprodukten ermittelten CML-Gehalte sind in Tabelle 4.1-7 zusammengefasst.

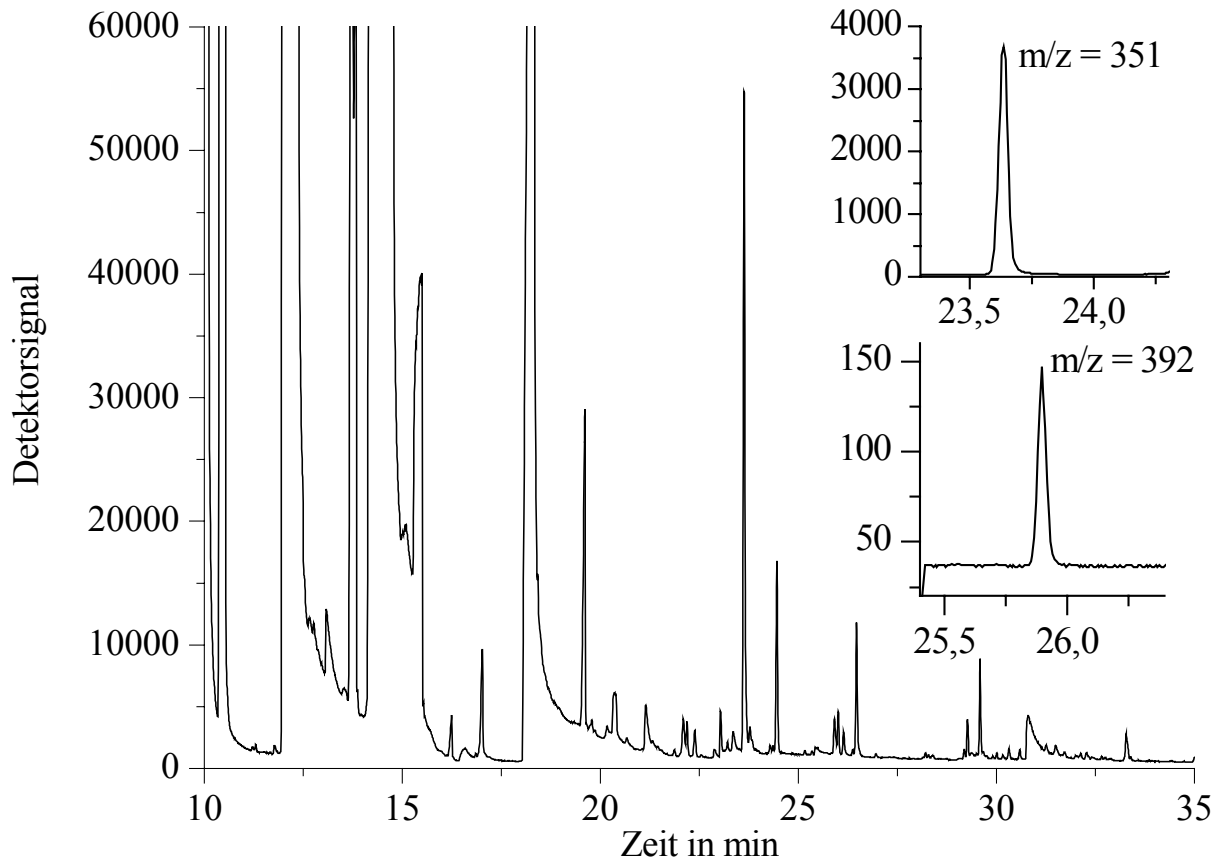


Abbildung 4.1-6: Totalionenstromchromatogramm und Massen-Spuren der Targetionen der Trifluoressigsäuremethylester von CMO ( $m/z = 351$ ) und CML ( $m/z = 392$ ) einer Milchpulverprobe

Tabelle 4.1-7: CML-Gehalte in Milch und Milchprodukten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	Probenanzahl	CML [ $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$ ]	CML [ $\text{mg}/\text{kg Protein}$ ]
Pasteurisierte Milch	5	$33,1 \pm 5,5$	$67,7 \pm 11,1$
1 h bei 80 °C inkubiert	3	$38,0 \pm 0,4$	$77,6 \pm 0,7$
3 h bei 80 °C inkubiert	3	$55,9 \pm 6,6$	$114,1 \pm 13,5$
UHT-Milch	3	$37,2 \pm 4,7$	$76,0 \pm 9,5$
Kondensmilch	3	$218,4 \pm 47,8$	$446,1 \pm 97,7$
Magermilchpulver	3	$84,0 \pm 28,6$	$171,5 \pm 58,3$
1 h bei 80 °C inkubiert	2	$123,1 \pm 47,1$	$251,4 \pm 96,3$
3 h bei 80 °C inkubiert	2	$230,0 \pm 94,3$	$469,6 \pm 192,6$

CML wird in der Literatur im Allgemeinen als Hauptprodukt der Endphase der Maillard-Reaktion diskutiert. Die hier ermittelten Werte spiegeln diesen Befund wider. Allerdings sind die Gehalte zum Teil deutlich niedriger als die Literaturdaten. So wurde in der vorliegenden Arbeit für Milchpulver ein CML-Gehalt von 173 mg/ kg Protein im Vergleich zu 1100 bis 2126 mg/ kg nach *Büser et al. (1986 a und b)* bestimmt. Für UHT-Milch weicht der ermittelte Wert mit 75 mg/ kg Protein im Vergleich zu 100 bis 750 mg/ kg (*Büser et al., 1986 a und b*)

weniger stark ab. Grundsätzlich sind Studien zu CML-Gehalten in Lebensmitteln und anderen Medien nur begrenzt vergleichbar, da Probenvorbereitung und Messmethode von entscheidendem Einfluss auf das Ergebnis sind. In den meisten Fällen ist mit einer Überschätzung der Werte zu rechnen, da es im Verlauf der sauren Hydrolyse und unter oxidativen Bedingungen zur Nachbildung von CML aus den Amadori-Produkten kommt. Demgegenüber birgt die hier angewandte GC-MS-Methode vor allem durch die aufwendige Probenaufarbeitung mit Festphasenextraktionen und mehrstufiger Derivatisierung zum Trifluoressigsäuremethylester vielfach die Gefahr von Analytverlusten. Zu berücksichtigen ist auch, dass CML erst seit dem letzten Jahr als kommerziell erhältliche Standardsubstanz von der Firma NeoMPS, Inc., Strasbourg, Frankreich angeboten wird, bislang also jede Arbeitsgruppe mit „ihrer individuellen“ Referenzsubstanz kalibriert.

### 4.1.5 GOLD und MOLD

Zur Bestimmung der aus jeweils zwei Molekülen Lysin aufgebauten Quervernetzungsprodukte GOLD und MOLD wurde eine von *Siegl (2003)* beschriebene Methode basierend auf einer Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und Detektion der Derivate bei  $\lambda = 570$  nm angewandt. Die Dimere eluieren ähnlich wie Histidin und Lysin im basischen Bereich des Aminosäurechromatogrammes, die Nachweisgrenze liegt bei jeweils 100  $\mu\text{mol}/100$  g Protein. Wie bereits von *Siegl (2003)* beobachtet, waren weder GOLD noch MOLD in den untersuchten Milchprodukten nachweisbar.

### 4.1.6 Lysinoalanin

Für die Bestimmung des Quervernetzungsproduktes Lysinoalanin (LAL) nach saurer Hydrolyse kam eine im Institut etablierte Methode basierend auf einer ionenaustauschchromatographischen Trennung mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und Detektion bei 570 nm zum Einsatz. LAL eluiert im basischen Bereich des Chromatogramms bei 45 min vor Histidin als basisliniengetrennter Peak. Als weiteres Signal ist im Lysinoalaninstandard der Ammoniakpeak bei 54 min erkennbar (vgl. Abbildung 4.1-7). Bei der Untersuchung der Milchproben zeigte sich, dass LAL in dieser Matrix als Schulter eines größeren Peaks eluiert und somit nur schlecht zu integrieren ist (vgl. Abbildung 4.1-8).

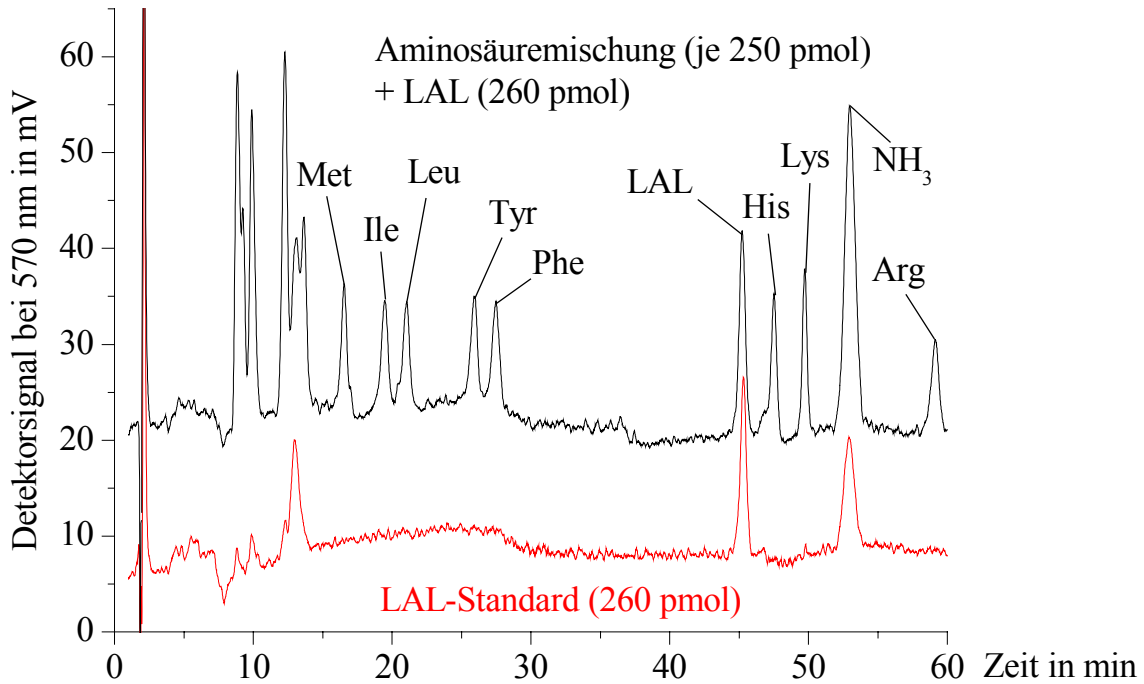


Abbildung 4.1-7: LAL-Bestimmung, Aminosäuremischung (je 250 pmol) und LAL-Standard (260 pmol); Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und Detektion bei  $\lambda = 570$  nm

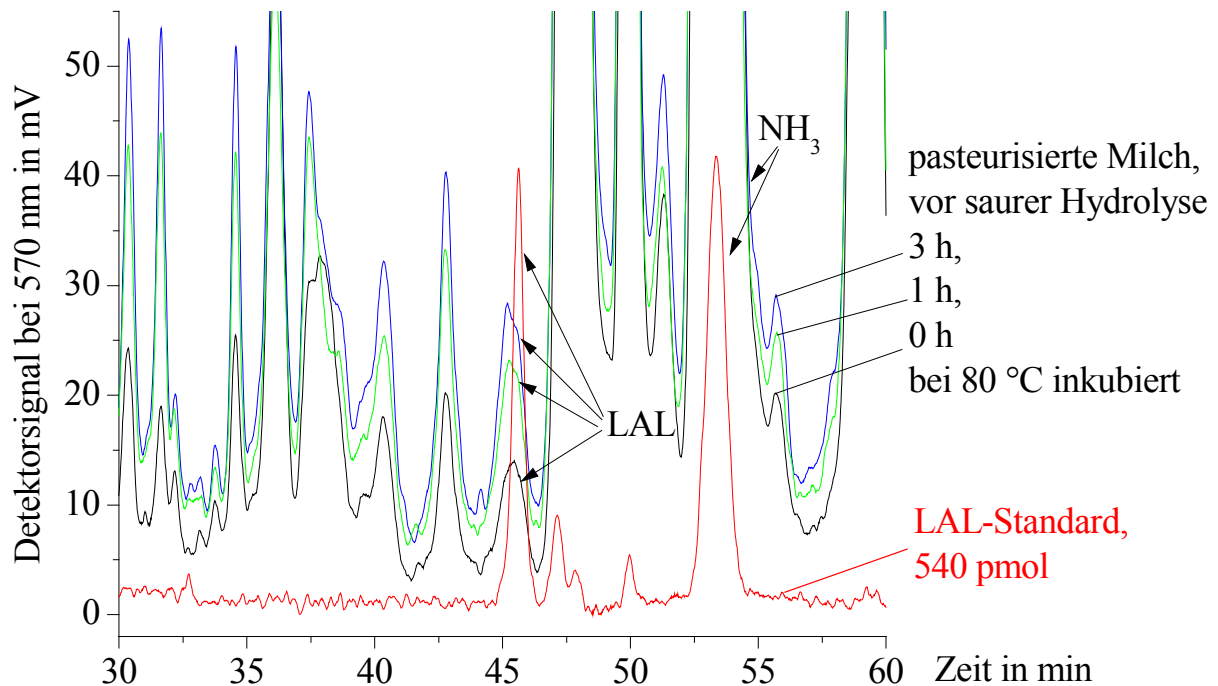


Abbildung 4.1-8: LAL-Bestimmung in inkubierter (0, 1, 3 h bei 80 °C) und sauer hydrolysiertes pasteurisierter Milch; Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung und Detektion bei  $\lambda = 570$  nm

Die ermittelten und in Tabelle 4.1-8 dargestellten Werte sind somit stark fehlerbehaftet.

Tabelle 4.1-8: Lysinoalaningehalte in Milch und Milchprodukten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	Probenanzahl	LAL [ $\mu\text{mol}/ 100 \text{ g Protein}$ ]	LAL [ $\text{mg}/ \text{kg Protein}$ ]
Pasteurisierte Milch	5	46 $\pm$ 20	107 $\pm$ 47
1 h bei 80 °C inkubiert	3	59 $\pm$ 25	138 $\pm$ 58
3 h bei 80 °C inkubiert	3	361 $\pm$ 81	841 $\pm$ 189
UHT-Milch	3	46 $\pm$ 21	107 $\pm$ 47
Kondensmilch	3	35 $\pm$ 15	82 $\pm$ 35
Magermilchpulver	3	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>2</sup>
1 h bei 80 °C inkubiert	2	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>2</sup>
3 h bei 80 °C inkubiert	2	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>2</sup>

n.n.: nicht nachweisbar (<sup>1</sup> $\leq 20 \mu\text{mol}/ 100 \text{ g Protein}$ ; <sup>2</sup> $\leq 47 \text{ mg}/ \text{kg Protein}$ )

Die in den Handelsproben bestimmten Lysinoalaningehalte liegen grundsätzlich im Bereich der Nachweis- und Bestimmungsgrenze von  $20 \mu\text{mol}/ 100 \text{ g Protein}$ . In der Literatur werden sehr unterschiedliche Angaben für die Gehalte in Milchprodukten gemacht. Für pasteurisierte Milch variieren die Werte von nicht nachweisbar (*Fritsch et al., 1981, Siegl, 2003*) bis zu Spuren im Bereich von  $< 9 \mu\text{mol}/ 100 \text{ g Protein}$  (*Erbersdobler et al., 1980*). Für Kondensmilch geben dieselben Autoren Werte von 65 bis  $210 \mu\text{mol}/ 100 \text{ g Protein}$  an. Auch in trockenen Produkten variieren die Gehalte in weiten Grenzen von nicht nachweisbar bis  $65 \mu\text{mol}/ 100 \text{ g Protein}$  (*Henle et al., 1993b*). Die im vorliegenden Fall für pasteurisierte Milch ermittelten Lysinoalaningehalte liegen damit vergleichsweise hoch. Wahrscheinlich kommt es wegen der schlechten Trennung des LAL-Peaks von der Matrix zu einer Überschätzung der Werte. Grundsätzlich beschreiben die oben genannten Autoren eine von der thermischen Belastung des Lebensmittels abhängige Bildung des Quervernetzungsproduktes. Dieser Sachverhalt ist auch hier am Beispiel der erhitzten pasteurisierten Milch zu beobachten.

#### 4.1.7 Bilanzierung

Um die Relevanz einzelner Maillard-Produkte für die Lysinderivatisierung bewerten zu können wurden die Gehalte an Lysin, Amadori-Produkt (als Lactoselysin, LacLys), Pyrralin, N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML), GOLD, MOLD und Lysinoalanin (LAL) wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben bestimmt. Untersuchungsmaterialien waren pasteurisierte (PM), ultrahoherhitzte (UHT) und Kondensmilch (KD), sowie Magermilchpulver (MMP). Je zwei pasteurisierte Milchproben und Magermilchpulver



wurden nach ein- bzw. dreistündiger Erhitzung bei 80 °C untersucht. Die so ermittelten durchschnittlichen Lysinderivatgehalte sind in Tabelle 4.1-9 dargestellt. Der Lysingehalt ist dabei bezüglich der durch saure Hydrolyse aus dem Amadori-Produkt zurückgebildeten Aminosäure, nach *Krause (2005)* 57,9 % des Lactoselysins, korrigiert (vgl. Kapitel 4.1.2).

Tabelle 4.1-9: Lysin und Lysinderivate in mmol/ 100 g Protein

	PM	1 h 80 °C	3 h 80 °C	UHT	KD	MMP	1 h 80 °C	3 h 80 °C
Lysin	60,0	57,9	54,1	56,1	45,7	54,9	44,7	26,1
LacLys	0,08	0,23	1,49	1,51	7,35	2,21	10,95	25,64
Pyrralin	0,004	0,004	0,005	0,004	0,039	0,010	0,015	0,070
CML	0,033	0,038	0,056	0,037	0,219	0,085	0,126	0,236
GOLD	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>
MOLD	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>
LAL	0,046	0,059	0,361	0,046	0,035	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>1</sup>

n.n.: nicht nachweisbar (<sup>1</sup> ≤ 20 µmol/ 100 g Protein bzw. <sup>2</sup> ≤ 100 µmol/ 100 g Protein)

Es wird zum einen deutlich, dass mit zunehmender thermischer Belastung der Proben der Lysingehalt ab und die Gehalte an Lactoselysin, CML und Pyrralin zunehmen. Lactoselysin stellt dabei das Hauptderivat dar und übersteigt die Gehalte an fortgeschrittenen Produkten um den Faktor 10 bis 100. Dies ist insofern überraschend, als dass bei längerer Erhitzung mit einem Abbau des Amadori-Produktes zugunsten der fortgeschrittenen Derivate zu rechnen war. Offenbar tritt dieser Prozess erst zu einem späteren Zeitpunkt, bzw. bei höheren Temperaturen ein.

Bezüglich Pyrralin fällt auf, dass hier nur für das Milchpulver eine deutliche Erhitzungsabhängigkeit zu verzeichnen ist. Dies ist vermutlich im Wesentlichen auf den in Lösung auftretenden Verdünnungseffekt zurück zu führen, aufgrund dessen die Reaktionspartner lokal in geringeren Konzentrationen vorliegen. Zudem erfolgt die Generierung des für die Pyrralinbildung erforderlichen Prekursors 3-Desoxyglucosulose verstärkt bei niedrigen Wassergehalten. Der relativ hohe Wert in Kondensmilch ist vermutlich durch den vergleichsweise hohen Zuckergehalt des Produktes bedingt.

Bezieht man die in den einzelnen Proben ermittelten Lysingehalte auf die Summe von Lysin und Lysinderivaten in pasteurisierter Milch, ergibt sich der in Tabelle 4.1-10 dargestellte Lysinverlust. Vergleicht man diesen mit der jeweiligen Summe der untersuchten Derivate wird deutlich, dass vor allem in den flüssigen Proben ein Großteil (bis 85 % in erhitzter pasteurisierter Milch, 61 % in Milchpulver) der beobachteten Lysinderivatisierung nicht mit den untersuchten Produkten erklärt werden kann.

Tabelle 4.1-10: Gegenüberstellung Lysinverlust und erfasste Derivate [mmol/ 100 g Protein]

	PM 1 h 80 °C	3 h 80 °C	UHT	KD	MMP	1 h 80 °C	3 h 80 °C
Lysinverlust	2,26	6,06	4,06	14,46	5,26	15,46	34,06
Σ Derivate	0,33	1,95	1,59	7,64	2,05	11,09	27,60
Unbekannte Verbindungen	1,93 (85 %)	4,11 (68 %)	2,47 (61 %)	6,82 (47 %)	3,21 (61 %)	4,37 (28 %)	6,46 (19 %)

Dieser Effekt nimmt mit steigender thermischer Belastung der Proben ab. In pasteurisierter Milch, die für eine Stunde bei 80 °C erhitzt wurde, machen die untersuchten Derivate nur 15 % des Lysinverlustes aus, während nach dreistündiger Behandlung bereits 32 % mit bekannten Verbindungen erklärbar sind. Noch ausgeprägter ist dieser Trend bei Milchpulver. Hier stehen die untersuchten Derivate im unbehandelten Produkt bereits für 39 % der Modifizierung. Nach dreistündiger Erhitzung sind über 80 % durch die untersuchten Derivate erklärbar. In Abhängigkeit vom Wassergehalt bzw.  $a_w$ -Wert ist demnach sowohl mit unterschiedlichen Reaktionsmechanismen als auch damit einhergehend mit einer anderen Produktpalette zu rechnen. Kondensations- und Wassereliminierungsreaktionen spielen besonders in der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion eine wichtige Rolle. Diese werden bei geringen Wassergehalten gefördert, da eine Gleichgewichtsverschiebung in Richtung der Produkte erfolgt.

Dem entgegen steht, dass der Anteil des Amadori-Produktes als Derivat der frühen Maillard-Reaktion an der Gesamtderivatisierung mit zunehmender thermischer Belastung ansteigt, bei pasteurisierter Milch von 10 % nach einstündiger Erhitzung bei 80 °C auf ca. 25 % nach dreistündiger Behandlung. In den Milchpulvern liegt der Anteil des Lactoselysins schon in der Ausgangsprobe bei 37 % und steigt mit der Erhitzungsdauer auf 70 % nach 1 h und auf 80 % nach 3 h bei 80 °C. Es ist anzunehmen, dass der Anteil an der Derivatisierung bei weiterer Erhitzung durch Abbau des Amadori-Produktes abnehmen würde. Wie erwartet wird der Gehalt an unbekanntem Verbindungen mit verstärkter Bildung stabiler Endprodukte infolge zunehmender Erhitzung kleiner. Aus der Beobachtung, dass der Anteil unbekannter Lysin-derivate offenbar im Bereich der frühen Maillard-Reaktion, also in vergleichsweise schwach erhitzten Produkten, am größten ist, lässt sich schließen, dass es in der frühen bzw. wenig fortgeschrittenen Phase der Reaktion zur Bildung von hitzelabilen Zwischenprodukten kommt, die bei fortschreitender Reaktion zu bekannten Derivaten abreagieren oder deren Bildung reversibel ist, so dass die Edukte nach Umkehrung der Reaktion zur Amadori-Produktbildung zur Verfügung stehen. Die Bildung des Heyns-Produktes ist trotz neuester Studien, die dessen Bildung in Lebensmitteln nachweisen (*Schwarzer, 2005*) in den hier

untersuchten Milchprodukten zu vernachlässigen, da die als Ausgangsverbindung fungierende Fructose in Milch praktisch nicht vorkommt.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die beobachtete Lysinderivatisierung sich nicht vollständig mit den erfassten Lysinderivaten erklären lässt, somit in zum Teil erheblichem Maße weitere in Lebensmitteln bisher nicht identifizierte Verbindungen gebildet werden müssen. Denkbar sind hier Verbindungen wie zum Beispiel Maltosin, das bereits in Modellansätzen nachgewiesen wurde, Dimere bekannter Derivate, wie für Pyrralin beschrieben (*Nagaraj et al., 1996*), sowie das Vorhandensein noch unbekannter Strukturen.

#### 4.1.8 Untersuchungen zum Vorkommen von Maltosin

Maltosin stellt wie am Ende des vorangehenden Kapitels erwähnt eines der in Lebensmitteln bislang nicht erfassten, aber in Modellansätzen nachgewiesenen Lysinderivate der Maillard-Reaktion dar und ist somit in Hinblick auf die Aufklärung der noch nicht erklärbaren Lysinmodifizierung in Lebensmitteln von Interesse. Darüber hinaus ergeben sich aus der Fähigkeit zur Eisen-Komplexierung mögliche ernährungsphysiologische Konsequenzen bezüglich der Versorgung des Körpers mit Mineralstoffen sowie einer potentiellen Verminderung der Aktivität von Metallo-Enzymsystemen wie zum Beispiel der Tyrosinase. Die Quantifizierung von Maltosin in Lebensmitteln sowie die Einschätzung dessen Relevanz für die Lysinmodifizierung waren daher Ziele der vorliegenden Arbeit. Es stellten sich zunächst zwei Probleme. Zum einen musste das Pyridonderivat als Referenzsubstanz synthetisiert und zum anderen ein geeignetes Analyseverfahren entwickelt werden.

##### 4.1.8.1 Synthese von N<sup>α</sup>-Hippurylmaltosin und Maltosin

Aufgrund der einfachen Detektierbarkeit wurde zunächst das N<sup>α</sup>-Hippurylderivat des Maltosins ausgehend von N<sup>α</sup>-Hippuryllysin (HipLys) und Isomaltol dargestellt. Hierzu erfolgte eine zweistufige Synthese des Zuckerderivates über Galaktosylisomaltol aus Lactose. Die Identität der Zwischenprodukte wurde durch Aufnahme von UV- und Massenspektren (Messung im Negativmodus) bestätigt. Für Isomaltol wurden zudem entsprechende <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren aufgenommen (vgl. Kapitel 3.6.3). Die auf die eingesetzte Menge Lactose bezogene Ausbeute an Isomaltol betrug 41 %. *Ledl et al. (1989)* kamen zu einer Umsetzung von 68 %. Der im Vergleich zu den Literaturangaben aufgetretene Verlust ist vermutlich auf

die Methode der Abspaltung des Galaktosylrestes zurückzuführen. Galaktosylmaltosin wurde hierzu trocken erhitzt und das Produkt über eine Destillationsbrücke in einen eisgekühlten Kolben geleitet, wo es auskristallisierte. Hierbei kam es trotz Erwärmung der gesamten Apparatur durch Fönen zum Teil bereits in der Brücke oder am Übergang zum Auffangkolben zum Auskristallisieren des Produktes, das danach nur noch schwer zugänglich war.

Im Folgenden wurde das synthetisierte Isomaltol in wässriger Lösung 20 Stunden unter Rückfluss mit Hippuryllysin umgesetzt und Hippurylmaltosin mittels semipräparativer RP-HPLC mit einer Ausbeute von 18 % aus dem Reaktionsgemisch isoliert. Die von *Ledl et al. (1989)* beschriebene Ausbeute von 40 %, konnte hier nicht erreicht werden.

Zur Gewinnung von Maltosin wurde der Hippurylrest durch saure Hydrolyse abgespalten. Neben Maltosin wurden so Benzoesäure und Glycin im äquimolaren Verhältnis zum Pyridon gebildet. Der Glycingehalt wurde unter der Maßgabe einer vollständigen Hydrolyse des Hippurylderivates bei quantitativen Analysen zur Bestimmung des Maltosingehaltes der jeweils eingesetzten Stammlösungen herangezogen.

### 4.1.8.2 Bestimmung von Maltosin – Ionenaustauschchromatographie

Aus der in Kapitel 4.1.7 dargestellten „Bilanzierungslücke“ der Lysinderivatisierung ergab sich die Frage nach der Bedeutung der Maltosinbildung für die Modifizierung von Lysin in Lebensmitteln. Erste Hinweise auf das Vorkommen des Pyridons erbrachten *Henle et al. (1995b)*, die bei der Simultanbestimmung von verschiedenen Aminosäuren und Aminosäurederivaten in stark erhitzten Milch- und Molkenpulvern durch Kopplung eines Photodiodearraydetektors mit der klassischen Aminosäureanalyse nach enzymatischer Hydrolyse einen bis dato unbekanntem Peak beobachteten. Durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz ordneten sie das Signal Maltosin zu. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei chromatographische Trennsysteme zum Einsatz. Neben der Adaption einer in der Arbeitsgruppe für die Bestimmung basischer Aminosäuren entwickelten Ionenaustauschchromatographie am Aminosäureanalysator wurde eine von *Liu et al. (1999)* für die Trennung von 3-Hydroxypyridin-4-onen entwickelte Umkehrphasen-HPLC-Methode an einer Polymersäule angewandt. In beiden Systemen erfolgte die Detektion bei  $\lambda = 280$  nm.

Die Ionenaustauschchromatographie ermöglichte daneben durch Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin die Erfassung der entsprechenden Derivate von Maltosin und anderen Aminosäuren bei 570 nm. Als Maltosinstandard diente für beide Methoden säurehydrolysiertes Hippurylmaltosin, in dem neben Maltosin die Hydrolyseprodukte des

Hippurylrestes, Glycin und Benzoesäure vorhanden waren. Der Glycingehalt wurde durch Peakflächenvergleich zur Bestimmung des Maltosingehaltes des Standards herangezogen. Die Konzentration wurde so, ausgehend von einer vollständigen Hydrolyse, zu 1,26 nmol/ ml bestimmt.

Maltosin wurde mit beiden chromatographischen Methoden als basisliniengetrennter Peak detektiert. Wie in Abbildung 4.1-9 dargestellt erfolgt die Elution in der modifizierten Aminosäureanalyse im basischen Bereich des Systems bei 58 min zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Histidin.

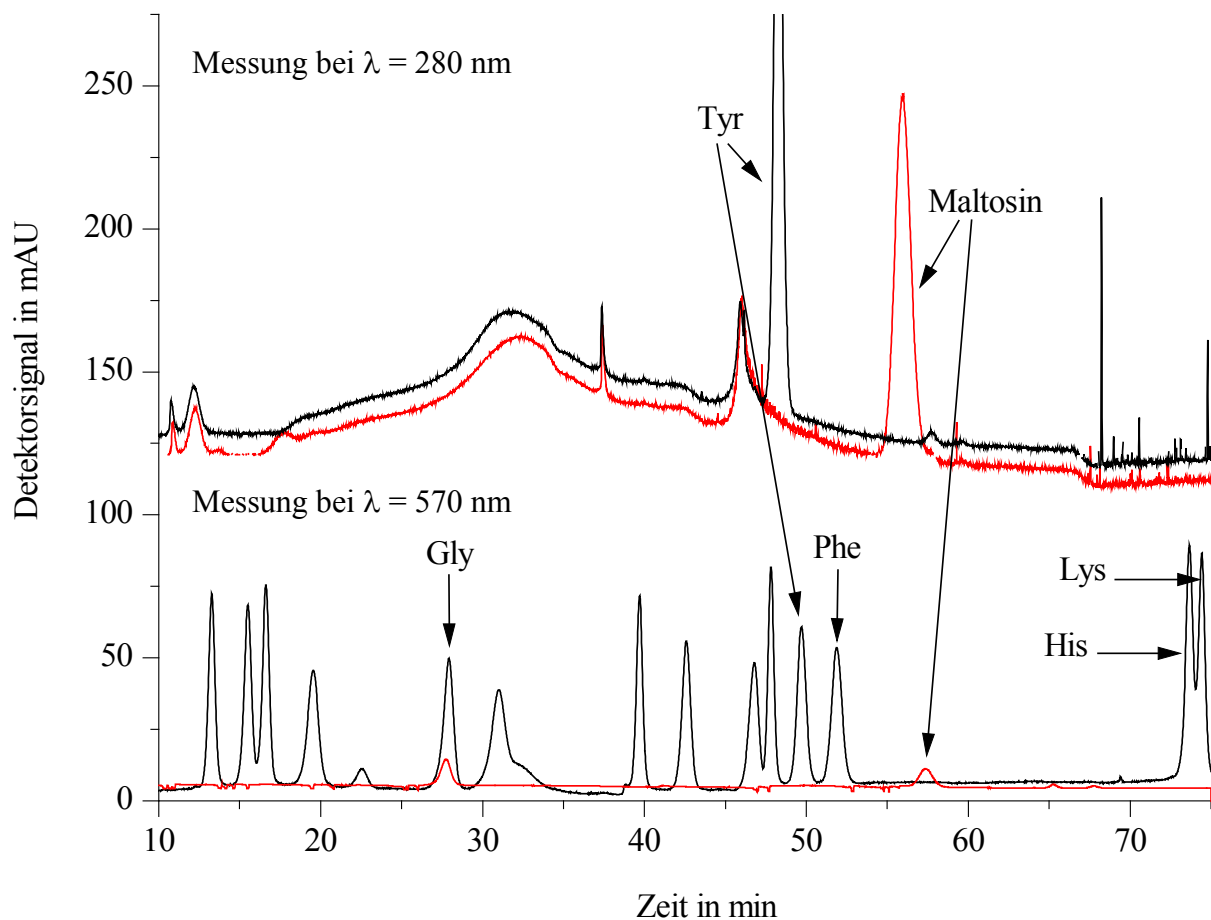


Abbildung 4.1-9: Chromatogramme der Ionenaustauschchromatographie zur Bestimmung von Maltosin; rot: 840 pmol Maltosin, schwarz: Aminosäuregemisch (500 pmol je Aminosäure) bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 570$  nm (Ninhydrin-Derivate) und  $\lambda = 280$  nm; Signale bei  $\lambda = 570$  nm um den Faktor 100 vergrößert

Im Chromatogramm mit Detektion bei  $\lambda = 280$  nm erscheint neben dem Analyten nur Tyrosin als aromatische Aminosäure mit einer Retentionszeit von ca. 48 min. Tryptophan war in der eingesetzten Aminosäuremischung nicht enthalten, Phenylalanin zeigt bei dieser Wellenlänge

nur geringe Absorption. Unter dem Gesichtspunkt, dass das Maltosinchromatogramm nach Ninhydrinderivatisierung (Detektion bei 570 nm) um den Faktor 100 vergrößert wurde wird deutlich, dass die Detektion bei 280 nm wesentlich empfindlicher ist. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden vor diesem Hintergrund ausschließlich bei 280 nm durchgeführt. Die Nachweisgrenze für die Standardsubstanz wurde zu 5 pmol Maltosin in 20 µl Einspritzlösung abgeschätzt.

Für die Bestimmung von Maltosin in Lebensmitteln muss das Derivat zunächst aus dem Proteinverband freigesetzt werden. Da es bei saurer Hydrolyse zur Bildung von koeluierendem Pyridosin aus Amadori-Produkten kommt, wurde auf die bereits für die Bestimmung von Pyrralin verwendete enzymatische Hydrolyse zurückgegriffen.

Da ein Fortschreiten des Reaktionsgeschehens im Lebensmittel wie am Beispiel der Pyrralinbildung während der Hydrolyse nicht ausgeschlossen werden kann, wurde hier ebenfalls eine Matrixkalibration durchgeführt. Hierzu wurde Na-Caseinat enzymatisch hydrolysiert und mit der Standardlösung im Konzentrationsbereich von 50 - 200 pmol im Einspritzvolumen (40 µl, 120 µg Protein) dotiert. Die Bestimmungsgrenze stieg durch die nun deutlich komplexere Matrix im Vergleich zu den reinen Standards um den Faktor 10 an und wurde zu 50 pmol (0,42 nmol/ g Protein) abgeschätzt. Der Nachweis von Maltosin war auch bei 25 pmol (0,21 nmol/ g Protein) noch möglich.

Die Untersuchung von Milchprodukten zeigte sowohl in UHT und Kondensmilch, Molken- und Magermilchpulver als auch in Roh- und pasteurisierter Milch Peaks, die zur Retentionszeit von Maltosin eluierten und bei weiterer Erhitzung der Handelsproben zunahmen. Insgesamt waren diese Befunde wie auch die Kalibration jedoch nicht reproduzierbar. Selbst im undotierten Matrixblindwert traten bei wiederholter Messung Signale im Retentionsbereich von Maltosin auf. Als problematisch erwies sich auch, dass es zu Peakverschiebungen von mehreren Minuten kam, die allerdings unter Heranziehen der Retentionszeit von Tyrosin als internen Standard ausgeglichen werden konnten. Darüber hinaus eluierte der Analyt als flacher Peak über einen Bereich von bis zu 4 min und war somit zum Teil nur schwer zu integrieren.

Insgesamt erwies sich die Ionenaustauschchromatographie somit unter diesen Bedingungen für die Bestimmung von Maltosin als ungeeignet.

## 4.1.8.3 Bestimmung von Maltosin – Umkehrphasen - HPLC

Neben der oben beschriebenen Ionenaustauschchromatographie wurde eine von *Liu et al. (1999)* für die Trennung von 3-Hydroxypyridin-4-onen entwickelte Ionenpaarchromatographie an einer Polymer-Umkehrphase (PLRP-HPLC) für die Maltosinbestimmung adaptiert. Im Gegensatz zu Kieselgelsäulen beruht die Hydrophobizität des Materials nicht auf der Derivatisierung der Matrix mit Alkylketten sondern direkt auf den Eigenschaften des Polymers, (Styren/ Divinylbenzen-Copolimer). Das Eluentensystem bestand aus einem binären Gradienten bei dem Na-Heptansulfonsäure (5 mM, pH 2,0) als Ionenpaarreagenz im Eluenten A und Acetonitril als Eluent B eingesetzt wurden. Die Detektion erfolgte wie bei der Ionenaustauschchromatographie bei  $\lambda = 280$  nm.

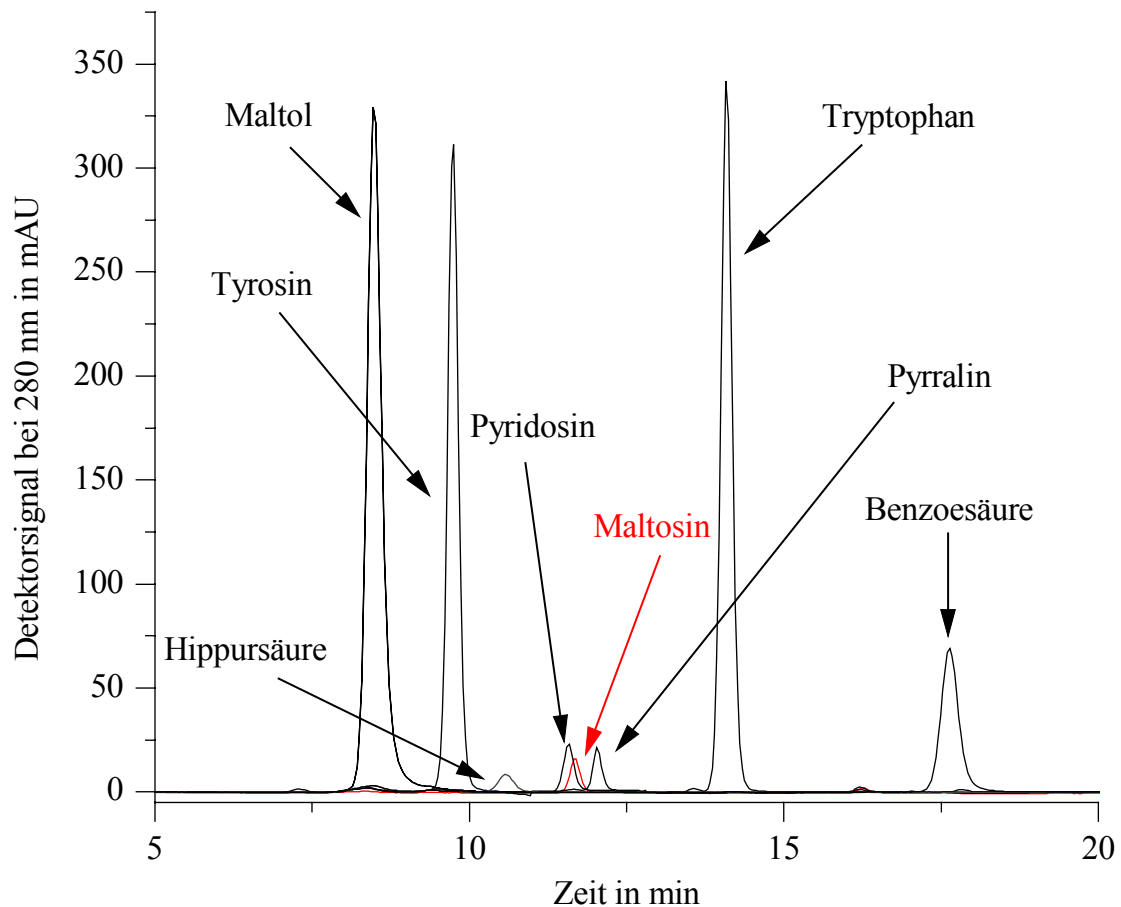


Abbildung 4.1-10: PLRP-HPLC-Chromatogramm der Trennung von Hippursäure (3,3 nmol), Pyridosin (1,0 nmol), Tyrosin, Maltol (2,0 nmol), Maltosin (0,6 nmol), Tryptophan, Pyrralin (0,5 nmol) und Benzoesäure (34,4 nmol); Detektion bei  $\lambda = 280$  nm

Neben Maltosin wurden in diesem System auch Pyrralin, die Strukturanalogen Maltol und Pyridosin, Benzoe- und Hippursäure als Hydrolyseprodukte des Hippurylmaltosins und die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin als Standards eingesetzt. Phenylalanin erbrachte entsprechend seines Absorptionsspektrums bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 280$  nm kein Signal. Alle anderen Verbindungen eluierten als basisliniengetrennte Peaks. Maltosin zeigte wie schon für die Ionenaustauschchromatographie beschrieben Koelution mit Pyridosin, hier bei einer Retentionszeit von 11,6 min (vgl. Abbildung 4.1-10). Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Maltosinbestimmung wurden mit 40 bzw. 50 pmol abgeschätzt.

Wie schon für die Ionenaustauschchromatographie beschrieben erfolgte auch für die Trennung an der Polymerphase eine Matrixkalibration unter Nutzung von enzymatisch hydrolysiertem Natrium-Caseinat als Matrix. Der Kalibrationsbereich betrug hier 50 bis 504 pmol im Einspritzvolumen (30  $\mu$ l, 60  $\mu$ g Protein) (vgl. Abbildung 4.1-11).

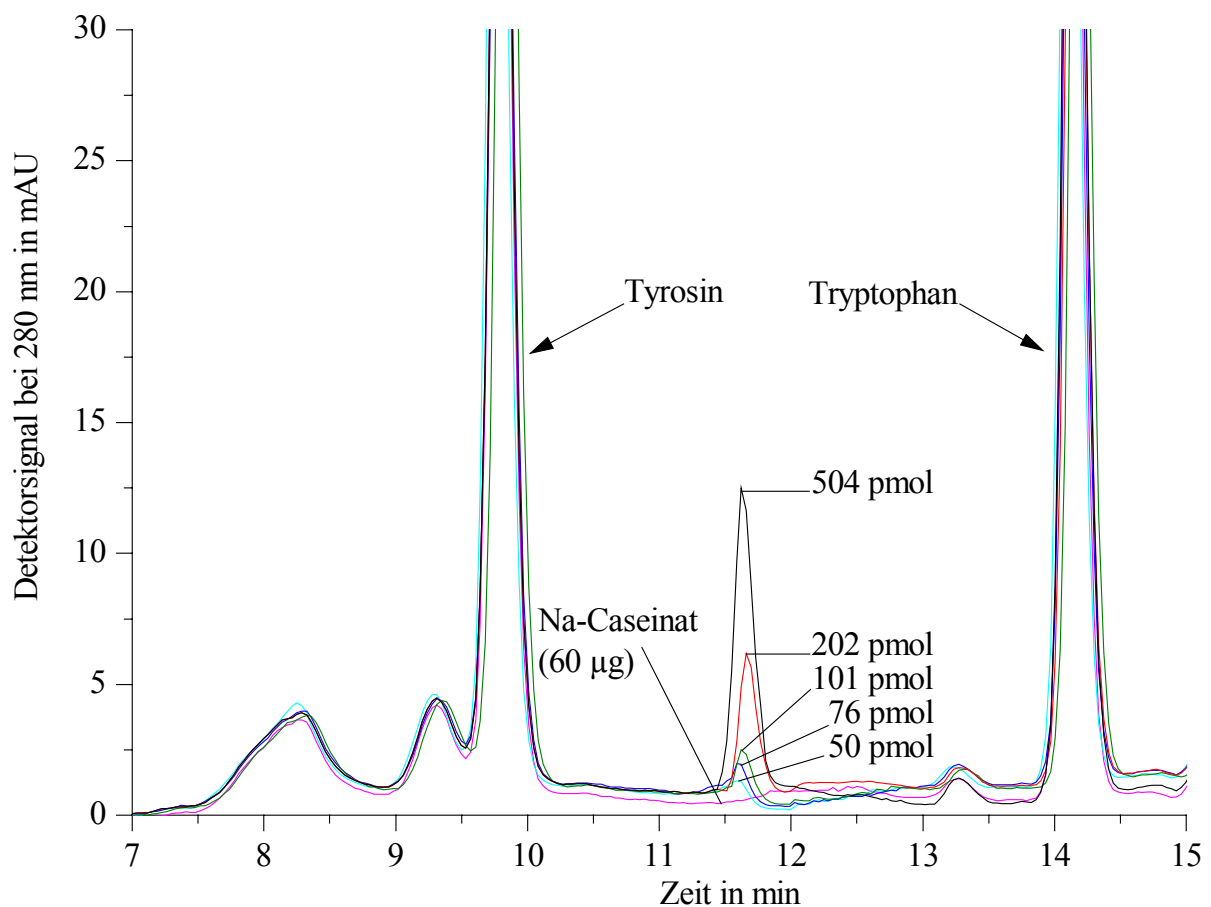


Abbildung 4.1-11: Chromatogramme der Maltosin-Matrixkalibration im Bereich von 50 bis 504 pmol/ 60  $\mu$ g Protein; PLRP-HPLC mit Detektion bei 280 nm



Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden zu 50 bzw. 75 pmol/ 60 µg Protein (210 bzw. 320 mg/ kg Protein) abgeschätzt. Die Wiederfindung in Molkenpulver lag bei 99 %. Mit einer Verdopplung des Einspritzvolumens und damit der injizierten Proteinmenge auf 120 µg ließen sich Nachweis- und Bestimmungsgrenze auf schätzungsweise 100 bzw. 150 mg/ kg Protein absenken.

Zur Bestimmung von Maltosin in Milchprodukten wurden unbehandelte und weiter erhitzte Handelsproben eingesetzt. Die eingespritzten Proteinmengen lagen hier bei ca. 100 µg Protein im Einspritzvolumen von 30 µl. Die Peakidentität wurde durch Dotierungen und UV-Spektrenvergleich nach Detektion mittels Diodenarraydetektor bestätigt (vgl. Abbildung 4.1-12). Es zeigte sich, dass in keiner der unbehandelten Proben ein Signal zur Retentionszeit des Analyten auftrat. Durch zusätzliche thermische Behandlung der Proben bei 100 °C konnte nach zweistündiger Erhitzung eine Konzentration von 64 mg Maltosin/ 100 g Protein in Magermilchpulver bestimmt werden. Mit der Erhitzungsdauer stieg der Wert nach 4 Stunden auf 76 mg/ 100 g Protein an. In Kondensmilch und Molkenpulver war das Pyridonderivat erst nach vier- bzw. sechsstündiger Erhitzung nachweisbar. Ein Vergleich des Gehaltes von 6 Stunden erhitztem Molkenpulver mit den Werten des kürzer erhitzten Magermilchpulvers deutet darauf hin, dass die Maltosinbildung auch im Molkenpulver bereits zu einem früheren Zeitpunkt einsetzt. Genauere Aussagen hierzu sind aufgrund fehlender Messpunkte in diesem Zeitintervall nicht möglich. In UHT-Milch war Maltosin auch nach bis zu vierstündiger Erhitzung der Probe unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar. Die jeweils in den Milchproben bestimmten Werte sind in Tabelle 4.1-11 dargestellt.

Tabelle 4.1-11: Maltosingehalte in den enzymatischen Hydrolysaten unerhitzter und bei 100 °C erhitzter Milchproben in mg/ 100 g Protein

	UHT-Milch	Kondensmilch	Magermilchpulver	Molkenpulver
unerhitzt	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2 h bei 100 °C	n.n.	n.n.	64,4	-
4 h bei 100 °C	n.n.	16,9	76,2	-
6 h bei 100 °C	-	-	-	94,0

n.n.: nicht nachweisbar ( $\leq 10$  mg / 100 g Protein); -: nicht bestimmt

Abbildung 4.1-12 zeigt die Überlagerung der Chromatogramme der 0 bis 4 Stunden bei 100 °C inkubierten, enzymatisch hydrolysierten Magermilchpulverproben.

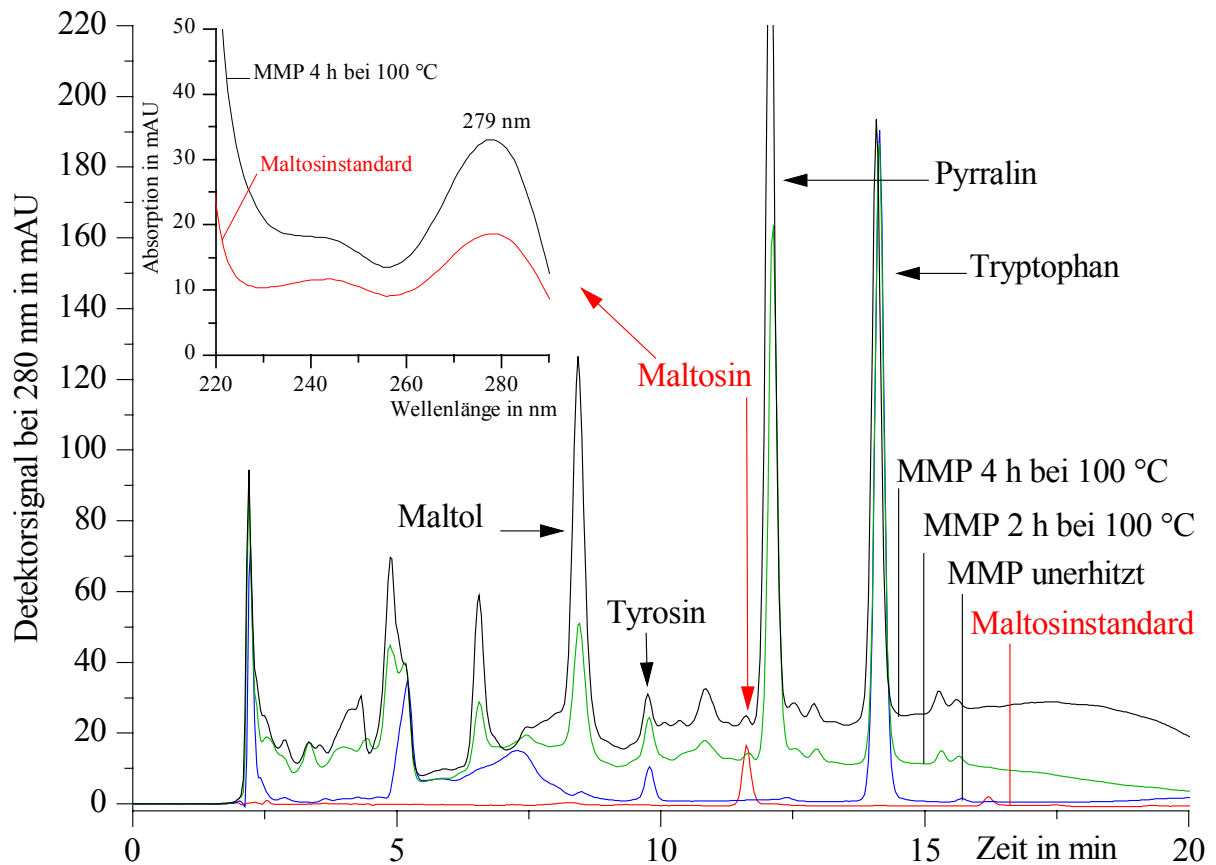


Abbildung 4.1-12: Bestimmung von Maltosin in 0 bis 4 h bei 100 °C erhitztem Magermilchpulver; PLRP-HPLC mit Detektion bei  $\lambda = 280$  nm; Bestätigung der Peakidentität durch Aufnahme und Vergleich der UV-Spektren mittels DAD-Detektor; MMP: Magermilchpulver

Gut zu erkennen ist neben der Maltosinbildung die Zunahme der Peakflächen der Signale von Pyrralin (12,3 min) und Maltol (8,4 min). Für diese Verbindungen wurden orientierenden 3-Punkt-Matrixkalibrationen durchgeführt. Die Chromatogramme im Kalibrationsbereich von 100 pmol bis 500 pmol/ 60  $\mu$ g Protein für Maltol und 100 pmol bis 1000 pmol/ 60  $\mu$ g Protein für Pyrralin im Einspritzvolumen von 30  $\mu$ l sind in Abbildung 4.1-13 dargestellt. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden zunächst für Maltol zu 15 bzw. 25 pmol/ 60  $\mu$ g Protein (30 bzw. 50 mg/ kg Protein) und für Pyrralin zu 25 bzw. 50 pmol/ 60  $\mu$ g Protein (110 bzw. 210 mg/ kg Protein) abgeschätzt. Durch Erhöhung der injizierten Proteinmenge und paralleler Detektion im Absorptionsmaximum von Pyrralin bei 297 nm können diese Kenngrößen sowohl für Maltol als auch für Pyrralin noch weiter abgesenkt werden. So sind in den Lebensmittelproben bei Injektion von 100  $\mu$ g Protein auch noch Pyrralingehalte von 20 mg/ kg Protein eindeutig nachweisbar.

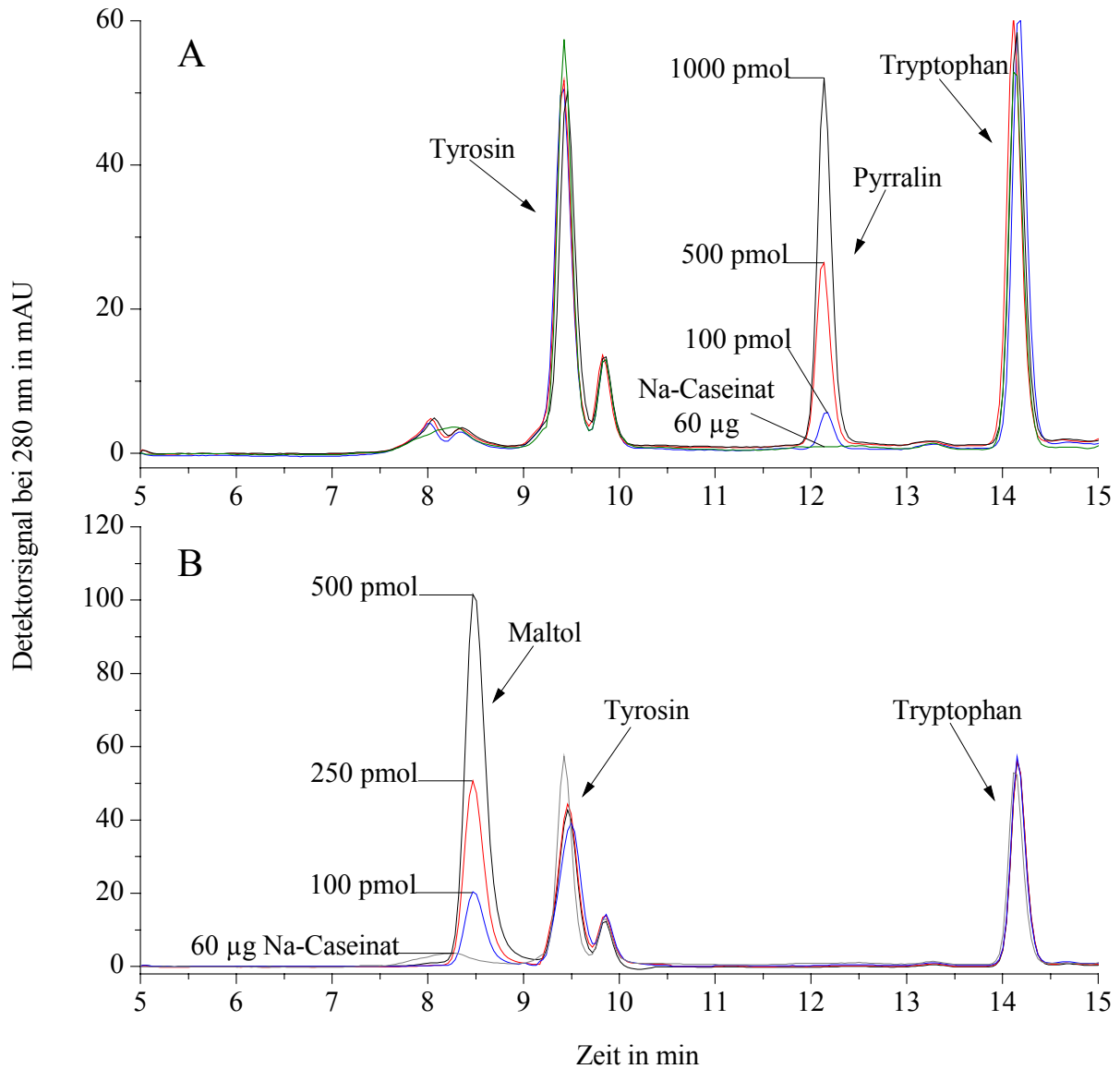


Abbildung 4.1-13: Chromatogramme der Matrixkalibrationen von Pyrralin (A) im Bereich von 100 bis 1000 pmol/ 60 µg Protein und Maltol (B) im Bereich von 100 bis 500 pmol/ 60 µg Protein; PLRP-HPLC mit Detektion bei 280 nm

Anhand dieser Kalibrationen wurden die für die Maltosinbestimmung aufgenommenen Chromatogramme auch bezüglich der in den Milchprodukten enthaltenen Gehalte an Pyrralin und Maltol ausgewertet. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4.1-12 zusammengefasst und den entsprechenden Maltosingehalten gegenüber gestellt. In den Handelsproben konnte Maltol wie Maltosin nicht nachgewiesen werden. Eine Maltolbildung durch Erhitzung der Proben konnte nur in den Pulvern, nicht aber in den flüssigen Milchprodukten beobachtet werden. Im Magermilchpulver steigt der Gehalt von 27,8 mg/ 100 g Protein nach zweistündiger thermischer Behandlung bei 100 °C auf 85,0 mg/ 100 g Protein nach 4 Stunden an. Im Molkenpulver lag der Wert nach sechsständiger Erhitzung bei 132,0 mg/ 100 g Protein und damit über dem des 4 Stunden erhitzten Magermilchpulvers. Auch hier ist wie zuvor für

Maltosin diskutiert davon auszugehen, dass die Maltolbildung deutlich früher einsetzt und aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit möglicherweise nicht erkannt wird.

Tabelle 4.1-12: Pyrralin-, Maltol- und Maltosingehalte in den enzymatischen Hydrolysaten unerhitzter und bei 100 °C erhitzter Milchproben in mg/ 100 g Protein; Werte in Klammern geben die Pyrralinwerte aus Kapitel 4.1.3 wieder

	UHT			KM			MMP			MP	
	unerh.	2 h	4 h	unerh.	2 h	4 h	unerh.	2 h	4 h	unerh.	6 h
Maltosin	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>1</sup>	n.n. <sup>1</sup>	16,9	n.n. <sup>1</sup>	64,4	76,2	n.n. <sup>1</sup>	94,0
Maltol	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	n.n. <sup>2</sup>	27,8	85,0	n.n. <sup>2</sup>	132,0
Pyrralin	n.n. <sup>3</sup> (1,0)	20,9	50,8	4,5 (9,9)	31,1	73,5	2,0 (2,6)	872,6	1440,0	2,2	474,6

n.n.: nicht nachweisbar (<sup>1</sup> ≤ 10 mg / 100 g Protein, <sup>2</sup> ≤ 5 mg/ 100 g Protein, <sup>3</sup> ≤ 2 mg / 100 g Protein); UHT: ultrahoch erhitzte Milch; KD: Kondensmilch; MMP: Magermilchpulver; MP: Molkenpulver; unerh.: unerhitzt

Pyrralin war in Magermilch- und Molkenpulver in Mengen von ca. 2 mg/ 100 g Protein nachweisbar. Der Gehalt in Kondensmilch wurde zu 5 mg/ 100 g Protein bestimmt. Lediglich in der UHT-Milch wurde kein entsprechendes Signal detektiert. Weiteres Erhitzen führte in allen untersuchten Proben zu einer Pyrralinbildung. So stieg der Gehalt in UHT-Milch über 21 mg/ 100 g nach 2 Stunden auf 51 mg/ 100 g Protein nach vierstündiger Inkubation bei 100 °C an. Ein ähnlicher Verlauf ist in der Kondensmilch zu beobachten. Der Pyrralingehalt stieg innerhalb von 2 Stunden zunächst von 5 auf 31 mg/ 100 g Protein und in den darauffolgenden 2 Stunden weiter auf 74 mg/ 100 g Protein. Ein Vergleich der mittels PLRP-HPLC ermittelten Pyrralingehalte mit den unter Kapitel 4.1.3 bestimmten zeigt, dass die für die Handelsproben ermittelten Gehalte annähernd übereinstimmen. Überraschend ist die starke erheizungsbedingte Pyrralinzunahme im Milchpulver. Während die Gehalte in Kapitel 4.1.3 bei 80 °C innerhalb von 3 Stunden von 3 auf 18 mg/ 100 g Protein stiegen, war bei 100 °C innerhalb von 2 bzw. 4 Stunden ein Anstieg von 2 auf 873 bzw. 1440 mg/ 100 g Protein zu beobachten. Bei 100 °C erfolgt die Pyrralinbildung demnach wesentlich schneller als bei 80 °C.

Im Molkenpulver wird trotz des höheren Lysingehaltes der Molkenproteine innerhalb von 6 Stunden nur ca. ein Drittel der im Milchpulver nach 4 h bestimmten Menge gebildet. (1440 vs. 475 mg/ 100 g Protein). Ähnliche Beobachtungen machte *Bachmann (1994)* bei der Erhitzung von Magermilch bei 120 °C. Während die Gehalte in den ersten 3 Stunden zunahm, sanken sie innerhalb der vierten Stunde um ca. 50 %. Möglicherweise findet unter diesen thermischen Bedingungen nach 4 Stunden ein starker Abbau des Pyrrols statt, der zu einer Wiederabnahme der Gehalte führt. Daneben kommen im flüssigen Medium Proteinfällungsreaktionen in Betracht. Nähere Aussagen zum Verlauf von Pyrralinbildung

und -abbau sind anhand der vorliegenden Messpunkte für Magermilch- und Molkenpulver nicht möglich.

Vergleicht man die ermittelten Maltosingehalte mit denen von Pyrralin und den anderen in Kapitel 4.1 untersuchten Derivaten fällt zunächst auf, dass das Pyridonderivat im Gegensatz zum Amadori-Produkt, Pyrralin und CML nicht in den unbehandelten Proben nachweisbar war. Dies ist insofern nicht überraschend, als dass es erst der Umwandlung von Lactose in Isomaltol zur Bildung von Maltosin bedarf. Auch Maltol als möglicher Prekursor wird nach den oben dargestellten Ergebnissen erst bei stärkerer Erhitzung generiert. Die Pyrralingehalte der Handelsproben liegen im Bereich von 1 bis 10 mg/ 100 g Protein. Da diese Werte unter bzw. im Bereich der für Maltosin abgeschätzten Nachweisgrenze von 10 mg/ 100 g Protein liegen, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass Maltosin in diesen Proben in ähnlichen Größenordnungen gebildet wird. Die großen Unterschiede zwischen Maltosin- und Pyrralingehalten in den weiter erhitzten Proben sprechen jedoch eher gegen ähnliche Gehalte in den Handelsproben. So ist Maltosin auch in vierstündig erhitzter UHT-Milch nicht nachweisbar, während der entsprechende Pyrralingehalt zu 50 mg/ 100 g Protein bestimmt wurde. In vierstündig erhitzter Kondensmilch ist Maltosin zwar nachweisbar, der Gehalt liegt mit 17 mg/ 100 g Protein aber bei weniger als 25 % des Pyrralingehaltes von 74 mg/ 100 g Protein. In den trockenen Milchprodukten ist dieser Effekt aufgrund der sehr hohen Pyrralingehalte noch ausgeprägter. Die Maltosingehalte liegen hier bei nur 5 bis 20 % der Pyrralingehalte. Die Maltosinbildung ist demnach sowohl in handelsüblichen als auch in darüber hinaus bei 100 °C erhitzten Milchprodukten von deutlich geringerer Relevanz für die Lysinderivatisierung als die Pyrralinbildung, der weniger als 1% des Lysinverlustes zugeschrieben werden. Vor diesem Hintergrund ist der Beitrag der Maltosinbildung zur Lysinmodifizierung in den hier untersuchten Lebensmitteln zu vernachlässigen.

#### **4.1.9 Einschätzung der Relevanz der untersuchten Derivate für die Lysinmodifizierung in Milch und Milchprodukten**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, kommt es in kommerziell erhältlichen und darüber hinaus erhitzten Milchprodukten in zum Teil erheblichem Maße zu Lysinverlusten von rund 3 bis über 50 %. Als Hauptprodukt der damit einhergehenden Derivatisierungsreaktionen konnte das Amadori-Produkt mit einem Beitrag von bis zu 50 % der Modifizierung in unbehandelten und bis zu 80 % in weiter erhitzten Proben identifiziert werden. Sowohl die Menge als auch der Anteil des frühen Maillard-Produktes nehmen dabei

mit der thermischen Behandlung zu. Der Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) und Pyrralin konnten 1 bis 2 % bzw. weniger als 1 % der Lysinverluste zugeschrieben werden. Das Quervernetzungsprodukt Lysinoalanin (LAL) konnte nur in den flüssigen Milchproben nachgewiesen werden, wo es in ähnlichen Größenordnungen wie die Carboxymethylaminosäure enthalten ist und entsprechend zur Lysinderivatisierung beiträgt. Die Gegenüberstellung der genannten Derivate mit dem ermittelten Lysinverlust ergab, dass durch das Amadori-Produkt, Pyrralin, CML und LAL nur ein Teil der beobachteten Modifizierung zu erklären ist. Vor allem in gering erhitzten Handelsproben bleiben rund 50 bis 60 % des Lysinverlustes ungeklärt. Mit fortschreitender Erhitzung der Proben nimmt der Anteil der untersuchten Derivate, vor allem des Amadori-Produktes, an der Gesamtderivatisierung zu. In drei Stunden bei 80 °C erhitztem Milchpulver verringert sich die „Lücke“ so auf ca. 20 %. Deutlich höhere Werte ergeben sich für die erhitzte pasteurisierte Milch, hier liegt der Anteil unbekannter Verbindungen nach einer Stunde bei 80 °C bei 85 % und sinkt bei weiterer Erhitzung auf 68 % nach drei Stunden ab. Neben den untersuchten Derivaten müssen somit besonders in den flüssigen Proben weitere bisher nicht in Lebensmitteln quantifizierte Lysinderivate gebildet werden, die diese „Lücke“ füllen. Als ein weiteres Derivat, das hier möglicherweise zu berücksichtigen ist wurde das in Modellansätzen aus Lactose und Lysin isolierte Maltosin in Lebensmitteln bestimmt. Ein Nachweis in Handelsproben war nicht möglich. Der Vergleich der Maltosin- und Pyrralingehalte in erhitzten Proben zeigt darüber hinaus, dass die Relevanz des Pyridons auch unter diesen Bedingungen noch weit geringer ist als die des Pyrrols von weniger als 1 %.

Vor allem die Beobachtung, dass der Anteil der berücksichtigten Derivate am beobachteten Lysinverlust mit zunehmender thermischer Behandlung zunimmt, die nicht identifizierten Derivate damit abnehmen, deutet auf thermisch oder thermodynamisch instabile Verbindungen hin. Eine Rolle könnten hier vor allem Produkte der frühen Maillard-Reaktion wie die Schiffsbasen und deren Folgeprodukte spielen. So beschreiben *Namiki et al. (1977 und 1981)* bereits in den 70er und 80er Jahren die Bildung von Pyrazinonstrukturen über radikalische Zwischenstufen aus den Schiffsbasen. Weiterhin zu berücksichtigen sind aber auch andere bislang in Lebensmitteln nicht quantifizierte Lysinderivate wie zum Beispiel Pronyllysin.

## 4.2 Untersuchungen zur Exkretion von Lysinderivaten im Urin in Abhängigkeit von der Ernährung

Neben dem in den vorherigen Kapiteln dargestellten Vorkommen von Maillard-Reaktions-Produkten in Lebensmitteln ist seit langem bekannt, dass diese Derivate auch *in vivo* nachweisbar sind. Eine Erhöhung der Gehalte in physiologischen Medien wie Plasma, Geweben und Urin ist dabei mit Fortschreiten von Alterungsprozessen und typischen Alterserkrankungen wie Grauem Star und Morbus Alzheimer messbar. Darüber hinaus wurden auch bei Personen mit Stoffwechselanomalien wie Nierenfunktionsstörungen oder Diabetes mellitus erhöhte Werte beobachtet (vgl. Kapitel 2.3.2). Der Einfluss der ernährungsbedingten Zufuhr der betrachteten Verbindungen, die in Lebensmitteln in erheblich höherem Maße vorkommen als in physiologischen Medien, auf solche Alterungs- oder Erkrankungsprozesse wird kontrovers diskutiert. Einzelne Autoren gehen soweit, den Verzehr von fett- und proteinreichen Lebensmitteln mit hohem Gehalt an AGEs als möglichen Einflussfaktor für das Auftreten von Entzündungsgeschehen in Betracht zu ziehen (*Vlassara et al., 2005*). Entscheidend für den Einfluss alimentärer AGEs auf das *in vivo* Geschehen und die Diskussion einer möglichen Wirkung als physiologisch bedenkliche „Glycotoxine“ sind das Ausmaß von Resorption, Metabolisierung und Exkretion der im Lebensmittel vorrangig proteingebundenen Verbindungen. Die Datenlage hierzu ist lückenhaft und beschränkt sich im Wesentlichen auf die Betrachtung des Amadori-Produktes und AGEs in der Summe, gemessen an der Fluoreszenz oder Immunogenität von physiologischen Medien. Bezüglich der frühen Maillard-Produkte konnte in einigen Studien zur Bioverfügbarkeit von Amadori-Produkten gezeigt werden, dass diese schlechter resorbiert werden als das native Lysin (vgl. Kapitel 2.4.2). Es ist also davon auszugehen, dass nur ein Teil der verzehrten MRPs die Zirkulation erreicht. Demgegenüber stehen Berichte, die eine ernährungsbedingte Anreicherung der Derivate in Plasma und Geweben beschreiben (z.B. *Uribarri et al., 2003*). Da diese Studien zum einen vorrangig mit vorerkrankten Personen wie Diabetikern und Patienten mit Nierenfunktionsstörungen oder an Versuchstieren wie Mäusen und Ratten sowie mit Modellproteinen unternommen wurden, ist die Übertragbarkeit auf den gesunden Menschen und dessen Ernährungsgewohnheiten nur eingeschränkt möglich. Ausgehend von der Annahme, dass ein Teil der in Lebensmitteln vorhandener MRPs im Darm resorbiert wird und so den Blut- und den Systemkreislauf erreicht, stellt sich die Frage nach der Eliminierung von MRPs. Die relativ geringe Molekülgröße der betrachteten Verbindungen sowie veränderte renale Ausscheidungsraten und Anreicherungen im Nierengewebe

niereninsuffizienter Personen im Vergleich zu Gesunden weisen auf einen entscheidenden Einfluss der Niere bei der Exkretion von Maillard-Verbindungen hin. Der Urin scheint daher ein geeignetes und relativ leicht verfügbares Medium für die Beurteilung der auf Aufnahme und Metabolisierung folgenden Exkretion von Maillard-Produkten zu sein.

Vor diesem Hintergrund wurde eine Studie zur Ermittlung der Gehalte von Amadori-Produkten (im Folgenden als Fructoselysin dargestellt und diskutiert), Pyrralin, Pentosidin und CML im Urin in Abhängigkeit von der Ernährung durchgeführt. 18 freiwillige Probanden im Alter von 22 bis 42 Jahren sammelten über einen Zeitraum von 9 Tagen 24-h-Urinproben und ernährten sich bis auf den ersten und letzten Tag weitgehend Maillard-Produkt-frei. Durch Bestimmung der MRP-Gehalte im Urin sollte beurteilt werden ob und über welchen Zeitraum Maillard-Reaktions-Produkte aus der Nahrung aufgenommen und über die Nieren eliminiert werden. Außerdem war es möglich eine ernährungsunabhängige, vorrangig endogen bedingte, individuelle Grundausscheidung für die untersuchten MRPs zu bestimmen und entsprechend bei der Beurteilung des Nahrungseinflusses zu berücksichtigen. Nach drei Tagen Diät wurden die Probanden am Tag 5 in 4 Gruppen eingeteilt, von denen eine als Kontrollgruppe fungierte und mit der eingeschränkten Diät fortfuhr, während die anderen Gruppen Mahlzeiten mit bekannten MRP-Gehalten verzehrten. Ziel war es durch Gegenüberstellung einer definierten Zufuhr der betrachteten Verbindungen mit deren Exkretion Aussagen zu Resorption und Elimination zu erhalten. Durch den Einsatz verschiedener Testmahlzeiten sollte zwischen dem Einfluss unterschiedlicher Nahrungsmittelgruppen bzw. verschiedener „Darreichungsformen“ der Glykierungsprodukte differenziert werden. Von Tag 6 bis 8 folgten alle Teilnehmer wieder der MRP-freien Diät. Am neunten Tag wurde die Studie beendet und die Gruppen ernährten sich wieder wie gewohnt. Als einzige Ausnahme von den Restriktionen der Diät durfte jeder Proband 1 Liter pasteurisierte Milch pro Tag trinken. Wie unter Kapitel 4.1.7 dargestellt, enthält pasteurisierte Milch bezogen auf 100 g Protein im Durchschnitt 0,08 mmol des Amadori-Produktes Lactoselysin. Daraus lässt sich auf Furosin (0,03 mmol/ 100 g Protein)\* und Fructoselysin (0,09 mmol/100 g Protein)\* umrechnen. Bei einem Proteingehalt von 3,3 % entspricht dies einem Amadori-Produkte-Gehalt von ca. 8,9 mg Fructoselysin/ Liter Milch. Ausgehend von einer Wiederfindung von 2 % des verzehrten Lactoselysins im Urin (*Henle et al., 2000*) ergibt sich so ein möglicher Beitrag zur Gesamtausscheidung von maximal 0,2 mg Fructoselysin/ d.

---

\* Mit einem Überföhrungsfaktor von 2,9 für Lactuloselysin und Furosin bzw. 3,1 für Fructoselysin und Furosin; nach *Krause et al. (2003)*



Der Pyrralingehalt von pasteurisierter Milch liegt bei  $< 2$  bis  $10$  mg/ kg Protein (*Henle et al., 1994 und Kapitel 4.1.3*). Daraus ergibt sich ein möglicher Beitrag zur renalen Ausscheidung von maximal  $0,1$  bis  $0,3$  mg Pyrralin. Gemäß Kapitel 4.1.4 enthält pasteurisierte Milch  $68$  mg Carboxymethyllysin/ kg Protein, entsprechend  $2$  mg CML pro Liter Milch. Unter Berücksichtigung einer von *Ahmed et al. (2005)* im Tierversuch beobachteten renalen Ausscheidung von  $2$  % des verzehrten Aminosäurederivates ergibt sich ein Beitrag zur Gesamtausscheidung von maximal  $0,04$  mg CML pro Tag. Der Pentosidingehalt von pasteurisierter Milch liegt nach *Henle et al. (1997)* unter  $2$   $\mu\text{g}/ 100$  g Protein. Das entspricht  $0,7$   $\mu\text{g}$  pro Liter Milch. Der durch den Verzehr der Milch maximal geleistete Beitrag zur Ausscheidung von Amadori-Produkten, Pyrralin, CML und Pentosidin über den Urin wird auf der Basis dieser Daten als vernachlässigbar angesehen.

#### 4.2.1 Testmahlzeiten

Bei den am Tag 5 zum Verzehr gereichten Mahlzeiten handelte es sich um Backwaren, hier Salzstangen, Milchprodukte, hier Schokoladenpudding, und Kaffee als Getränk aus geröstetem Rohmaterial. Die eingesetzten Lebensmittel unterscheiden sich nicht nur in den Maillard-Produkt-Gehalten. Da Pentosidin im Kaffee vorwiegend als freies Derivat vorliegt, während es in den Salzstangen fast vollständig kovalent im Protein gebunden ist, lassen sich aus diesem Beispiel Rückschlüsse für die Bedeutung des Bindungszustandes der Maillard-Produkte im Lebensmittel auf deren metabolischen Transit ziehen. Zur Erhöhung der Maillard-Produktgehalte im Pudding wurde für dessen Zubereitung anstelle von Konsummilch eine aus erhitztem Milchpulver hergestellte rekonstituierte Milch eingesetzt. Die Salzstangen und der Kaffee stammten aus dem lokalen Lebensmittelhandel und wurden „unbehandelt“ eingesetzt. In allen Testmahlzeiten wurden Fructoselysin, Pyrralin, Pentosidin und CML bestimmt. Die Portionsgrößen orientierten sich an den nach der Literatur zu erwartenden Resorptions- und Exkretionsraten, vor allem aber an den, in Hinsicht auf die Verträglichkeit, noch zumutbaren Mengen. Die so dargereichten Mengen sind in Tabelle 4.2-1 dargestellt.

Tabelle 4.2-1: Maillard-Produktgehalte der Testmahlzeiten

	Fructoselysin [mg]	Pyrralin [mg]	CML [mg]	Pentosidin [ $\mu$ g]	
				gesamt	frei
Salzstangen (250 g)	132	8,4	23,0	257	2
Schokoladenpudding (350 g)	342	0,4	2,3	5	n.n.
Kaffee (600 ml)	n.n.	n.n.	0,03	12	9

Die „Salzstangengruppe“ verzehrte demnach die größte Menge an Pyrralin, CML und Pentosidin, wobei der Anteil der nicht proteingebundenen Crosslink-Aminosäure weniger als 1 % beträgt. Im Gegensatz hierzu ist die Pentosidinzufuhr über den Kaffee zwar um den Faktor 20 niedriger, der Anteil des freien Derivates liegt jedoch bei 75 %. Pyrralin und Fructoselysin wurden im Kaffee nicht detektiert. Die größte Menge des Amadori-Produktes nimmt die „Puddinggruppe“ mit 342 mg auf, dies entspricht in etwa dem 2,5 fachen Verzehr der „Salzstangengruppe“.

#### 4.2.2 Bestimmung von freiem Amadori-Produkt als Fructoselysin im Urin

Die Bestimmung des freien Amadori-Produktes im Urin erfolgte nach Größenausschlussfiltration analog der Bestimmung in Lebensmitteln durch Quantifizierung von Furosins nach saurer Hydrolyse und Berechnung als Fructoselysin (*Resmini et al., 1997, Krause et al., 2003*). Abbildung 4.2-1 zeigt die Überlagerung der Chromatogramme der 24-h-Urinproben eines Probanden der Tage 1, 3 und 4 der Ernährungsstudie mit einem Furosinstandard. Aufgrund variierender Gesamtexkretionen kommt es von einem Tag zum anderen zu „individuellen“ Verdünnungseffekten in den Proben. Für den direkten Vergleich wurden die Signale daher mit dem jeweiligen Tagesurinvolumen in Litern multipliziert. Der größte Teil der detektierbaren Urininhaltsstoffe eluiert im polaren Bereich des Chromatogrammes. Furosins eluiert als basisliniengetreunter Peak nach einer Retentionszeit von 23 min. Die Nachweisgrenze im Urin wurde mit 10 pmol pro Injektion abgeschätzt. Sehr kleine Peaks im Bereich der Bestimmungsgrenze von 20 pmol wurden nach Standardaddition quantifiziert.

Gut zu erkennen ist die Verminderung der Peakflächen mit Fortschreiten der Diät. Dieser Effekt zeigt sich auch für das Signal bei 17,5 min. Darüber hinaus unterscheiden sich die Chromatogramme bei weiteren Retentionszeiten, wie zum Beispiel bei 20,5 min, in den jeweiligen Peakintensitäten. Ein zeitlicher Trend ist hier dagegen nicht erkennbar.

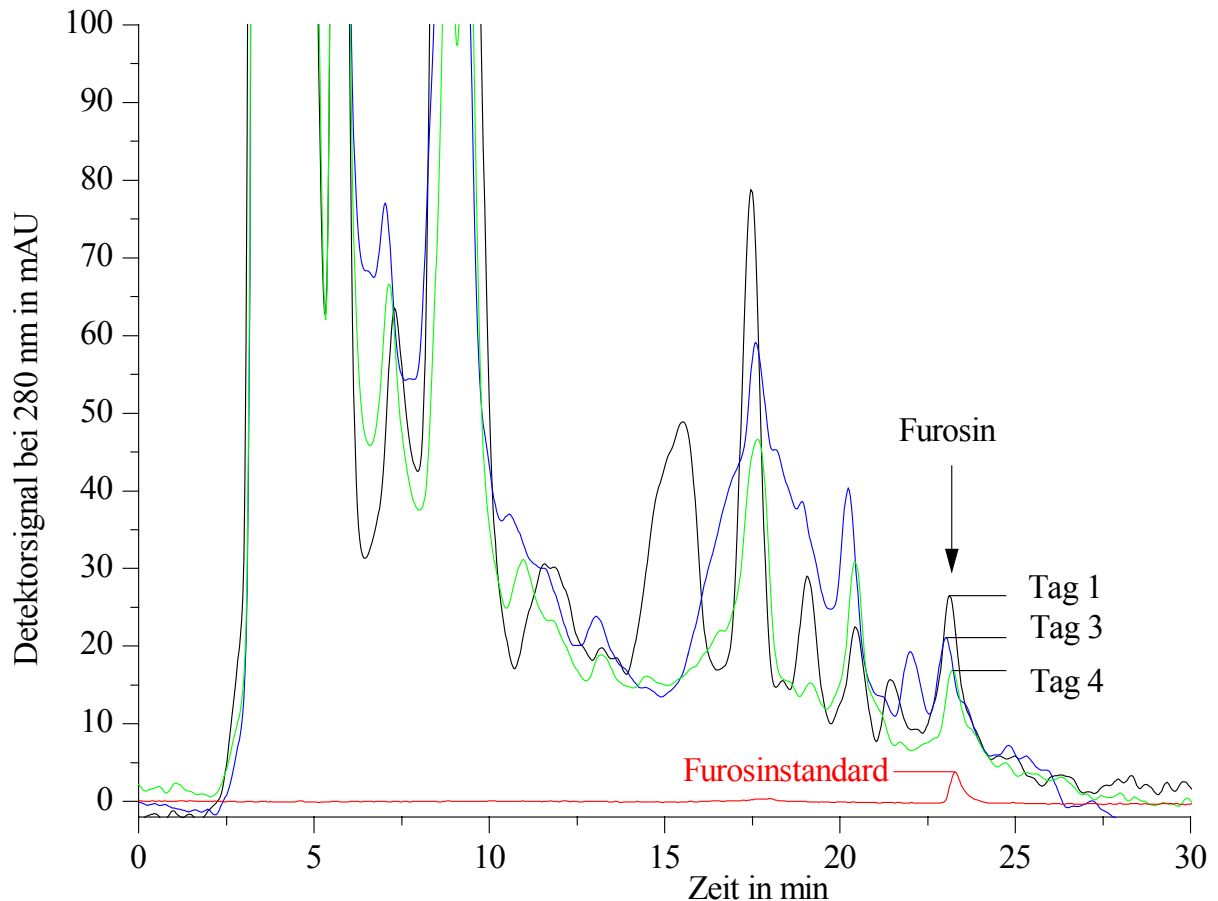


Abbildung 4.2-1: Furosinebestimmung im Urin; Überlagerung der Chromatogramme der 24-h-Urinproben eines Probanden der Tage 1, 3 und 4 der Ernährungsstudie mit einem Furosinestandard; RP-HPLC mit Detektion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$

Die ermittelten Werte liegen im Bereich von 0,1 bis 5,7 mg Furosine pro Tag (Fructoselysin: 0,3 bis 22,2 mg/ d<sup>\*</sup>). Zum Vergleich mit den Literaturdaten wurden die Tage 1 und 9 der Studie betrachtet, an denen sich die Teilnehmer wie gewohnt ernährten. Die mittlere Exkretion des Amadori-Produktes an diesen Tagen wurde zu  $5,4 \pm 4,1 \text{ mg Fructoselysin/ d}$  bestimmt. *Erbersdobler et al. (1986)* veröffentlichten Werte von  $12,3 \pm 7,2 \text{ mg/ d}$  und  $77,9 \pm 18,8 \text{ mg/ d}$  nach Fructoselysin-armer bzw. -reicher Ernährung. Für die Fructoselysin-reiche Ernährung wurde die Nahrung mit 2,5 g des Amadori-Produktes dotiert. *Knecht et al. (1991)* ermittelten bei gewöhnlicher Ernährung Fructoselysingehalte von  $4,0 \pm 2,8 \mu\text{g/ mg Kreatinin}$  im Urin, entsprechend 1,1 bis 12,9 mg/ d<sup>\*\*</sup>. *Henle et al. (2000)* geben die Ausscheidung mit 2 bis 12 mg Furosine/ d, entsprechend 7,5 bis 44,9 mg Fructoselysin/ d<sup>\*</sup> an. Die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Gehalte liegen damit im unteren Bereich dieser Literaturdaten. Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang, dass in allen zum Vergleich

\* Umrechnung über die Stoffmengen mit einem Überföhrungsfaktor von 3,1 nach *Krause et al. (2003)*

\*\* Umrechnung auf Basis einer Kreatininausscheidung von 8 bis 17 mmol/ d nach *Löffler und Petrides, (2003)*;  $M(\text{Kreatinin}) = 113,12 \text{ g/ mol}$

herangezogenen Untersuchungen die Gesamtexkretion bestimmt wurde, während im vorliegenden Fall die Proteinfraction vor der Analyse abgetrennt und so das freie Amadori-Produkt erfasst wurde. Ein Vergleich der Gehalte an freiem und Gesamtfructoselysin erbrachte in der hier vorgestellten Untersuchung jedoch keine signifikanten Unterschiede. Eine Verfälschung der Werte durch Veränderungen während der Probenlagerung schlossen *Knecht et al. (1991)* durch Untersuchung von Urinproben, die über mehrere Monate bei  $-70\text{ °C}$  gelagert wurden, aus.

### 4.2.3 Bestimmung von freiem Pyrralin im Urin

Für die Bestimmung von Pyrralin im Urin wurde eine von *Portero-Otin et al. (1997)* publizierte RP-HPLC-Methode mit UV-Detektion bei  $\lambda = 297\text{ nm}$  modifiziert. Abweichend zu den oben genannten Autoren wurden die Pufferkonzentration und die Säulentemperatur erhöht, sowie der Gradient abgeflacht und verlängert. In Abbildung 4.2-2 ist die Überlagerung von Chromatogrammen der 24-h-Urinprobe der Tage 1 bis 4 der Ernährungsstudie eines Probanden mit einem Pyrralinstandard dargestellt.

Wie schon für Furosin beschrieben wurden die Graphen durch Multiplikation mit dem jeweiligen Tagesurinvolumen in Litern korrigiert. Die Chromatogramme zeigen ein großes, über den gesamten Elutionsbereich verteiltes Signalspektrum. Pyrralin eluierte bei einer Retentionszeit von 17,5 min als Basislinien-getrennter Peak. Die Nachweisgrenze wurde zu 25 pmol abgeschätzt. Die Zuordnung des Analyten in der Probe erfolgte nach Retentionszeit- und UV-Spektrenvergleich mit einer Referenzsubstanz. Gehalte im Bereich der Bestimmungsgrenze von 50 pmol wurden durch Standardaddition und Erhöhung des Einspritzvolumens abgesichert. Beim Vergleich der Chromatogramme der Tage 1 bis 4 in Abbildung 4.2-2 ist deutlich zu erkennen, dass die Ernährungsumstellung im Zuge der Studie mit einer Abnahme des Pyrralinsignals einhergeht, wobei sich die Peakflächen der Tage 3 und 4 im Gegensatz zum Trend der vorangehenden Tage kaum noch unterscheiden. Neben dem Pyrralinpeak ist auch für das Signal bei einer Retentionszeit von 12 min eine mit der Studiendauer einhergehende Reduzierung der entsprechenden Fläche zu verzeichnen. Eine Identifizierung dieses Peaks erfolgte nicht. Denkbar sind eine Vielzahl von Nahrungsmittelinhaltstoffen und Stoffwechselprodukten.

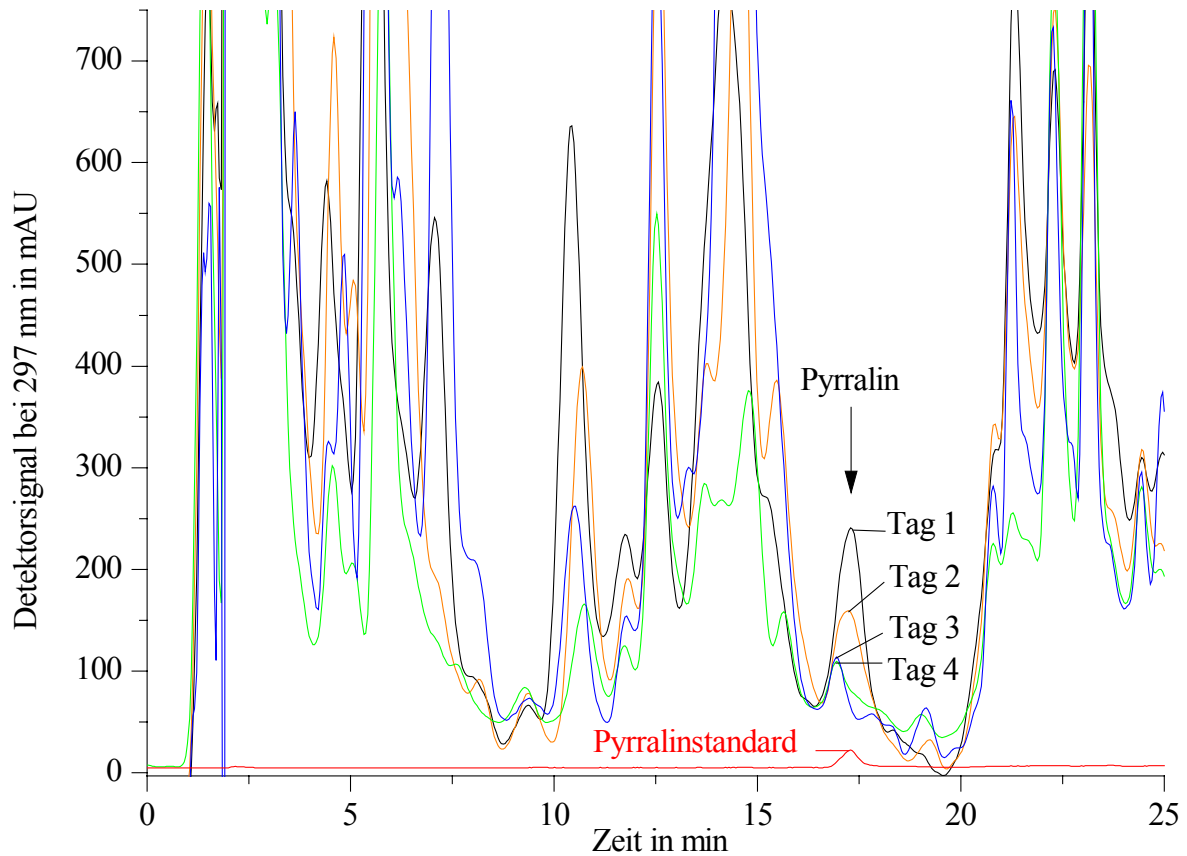


Abbildung 4.2-2: Pyrralinbestimmung im Urin; Überlagerung der Chromatogramme der 24-h-Urinproben eines Probanden der Tage 1 bis 4 der Ernährungsstudie mit einem Pyrralinstandard; RP-HPLC mit Detektion bei  $\lambda = 297 \text{ nm}$

Die für die Urinproben ermittelten Werte der täglichen Ausscheidung von freiem Pyrralin reichen von 0,1 bis 12,9 mg/ d. An den Tagen 1 und 9, bei normaler Ernährung, lag die Pyrralinexkretion aller Probanden im Mittel bei  $4,0 \pm 2,4 \text{ mg/ d}$  und damit im Bereich der in der Literatur für gesunde Erwachsene angegebenen Werte von  $1,21 \pm 0,4 \text{ } \mu\text{g/ mg Kreatinin}$  (Portero-Otin et al., 1997b) bis  $32,9 \pm 27,1 \text{ nmol/ mg Kreatinin}$  (Tsukahara et al., 2003), entsprechend 0,7 bis 3,1 mg/ d\* bzw. 1,3 bis 29,0 mg/ d\*.

#### 4.2.3.1 Stabilität von Pyrralin im Urin

Um sicherzustellen, dass es bei der Lagerung der Urinproben bis zur Messung zu keinen Veränderungen der messbaren Pyrralingehalte durch Nachbildungs- oder Abbaureaktionen kommt, wurden frische Urinproben zweier Probanden jeweils undotiert und mit 0,3  $\mu\text{g}$  Pyrralin/ ml Urin dotiert bei 37 °C gelagert. Aus den in Abbildung 4.2-3 dargestellten Verläufen geht hervor, dass es bei der Lagerung des Urins zu beiden Prozessen kommt.

\*Umrechnung auf Basis einer Kreatininausscheidung von 8 bis 17 mmol/ d nach Löffler und Petrides, (2003); M (Kreatinin) = 113,12 g/ mol

Während die messbaren Pyrralingehalte zunächst innerhalb der ersten 30 Stunden abnehmen, ist im Anschluss daran wieder eine Zunahme zu beobachten. Ursache für die Verluste des Analyten könnten z.B. Polymerisationsreaktionen, wie von *Nagaraj et al. (1996) in vitro* beobachtet, sein.

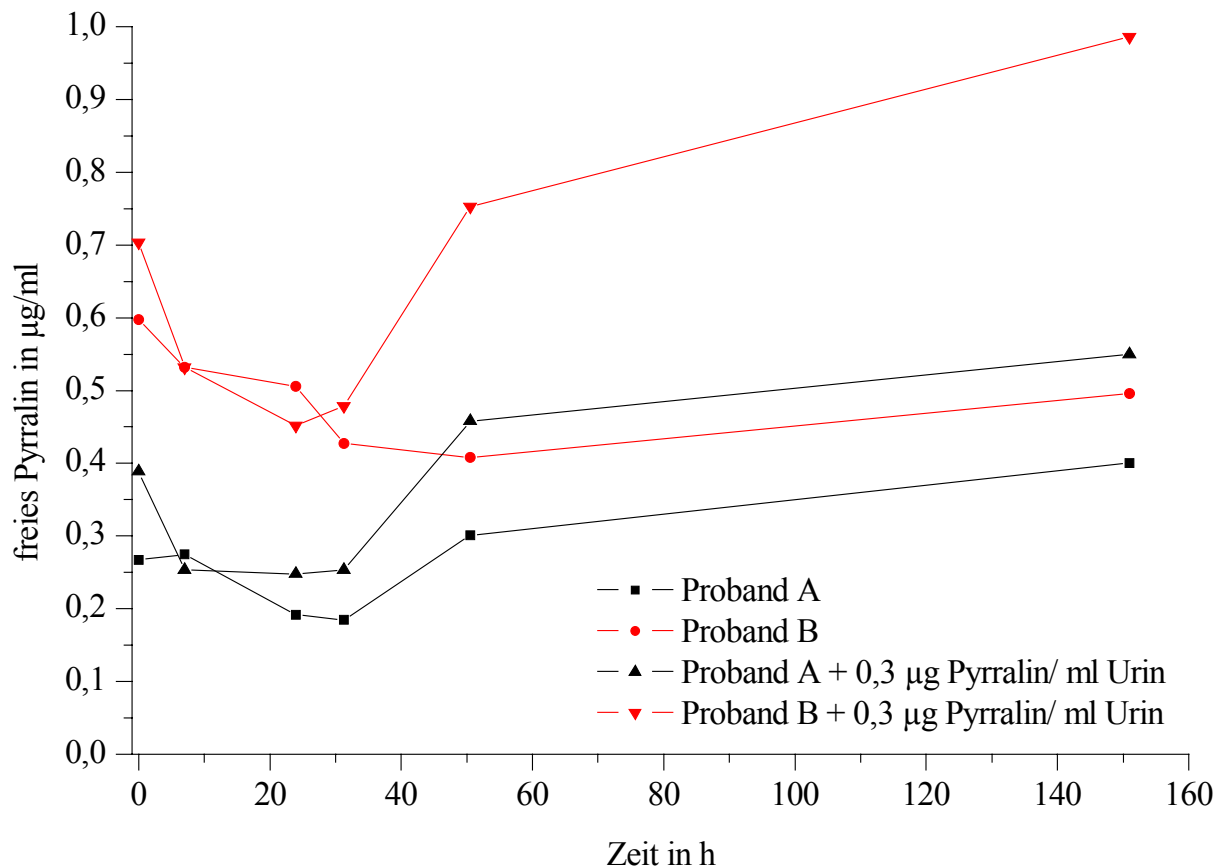


Abbildung 4.2-3: Stabilität von Pyrrolin im Urin bei Lagerung bei 37 °C; Probanden A und B, jeweils eine undotierte und mit 0,3 µg/ ml dotierte Urinprobe

Der eigentliche Abbau von Pyrrolin ist dagegen eher unwahrscheinlich, da der pH-Wertes des Harns im neutralen bis schwach sauren Bereich liegt. Auch die Bildung von Pyrrolin im Urin ist zunächst als eher unwahrscheinlich anzusehen, da es nach *Knecht et al. (1992)* zu keiner renalen Ausscheidung des Prekursors 3-Desoxyglucosulose kommt.

Vorstellbar ist dagegen die 3-DG-Bildung im Urin, was das verzögerte Einsetzen des Wiederanstiegs erklären würde. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die Urinproben bis zur Messung am Sammeltag bei 5 °C bis 7 °C und im Anschluss bei -18 °C gelagert. Die im Vergleich zum hier durchgeführten Lagerexperiment bei 37 °C deutlich niedrigere Temperatur sollte ausreichen, um die Stabilität des Analyten bis zur spätestens 10 Tage nach Abfüllen der Probe erfolgten Messung zu gewährleisten.

#### 4.2.4 Bestimmung von freiem Pentosidin im Urin

Die Bestimmung von Pentosidin erfolgte im Gegensatz zu den oben vorgestellten Methoden nicht durch Ionenaustauschchromatographie an Umkehrphasen sondern mittels Ionenaustauschchromatographie mit Fluoreszenzdetektion ( $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$ ). Eine Überlagerung der aus den Urinproben der Tage 1 bis 4 der Ernährungsstudie eines Probanden resultierenden Chromatogramme ist in Abbildung 4.2-4 dargestellt, die einzelnen Graphen sind auch hier bezüglich der Gesamturinausscheidung korrigiert. Allgemein ist zu beobachten, dass der Großteil der Signale im sauren Bereich des Chromatogramms eluiert (A), während Pentosidin als basisliniengetrennter Peak bei 81 min im basischen Bereich zu finden ist (B). Die Kalibration erfolgte im Bereich von 1,5 bis 10,3 pmol, Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden zu 0,7 und 1,5 pmol abgeschätzt.

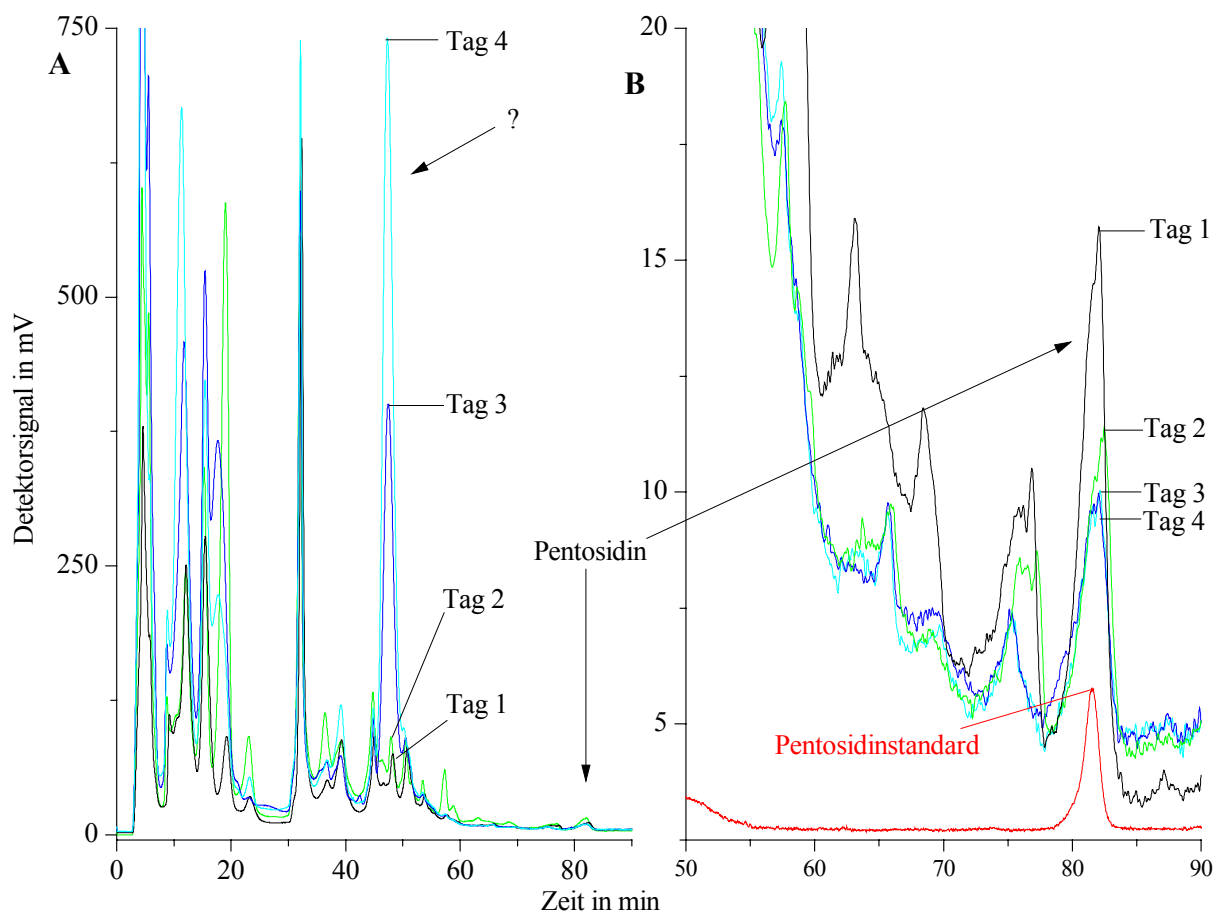


Abbildung 4.2-4: Pentosidinbestimmung im Urin; A: Chromatogramme der 24-h-Urinproben eines Probanden der Tage 1 bis 4 der Ernährungsstudie; B: Ausschnitt aus A, überlagert mit einem Pentosidinstandard; Ionenaustauschchromatographie mit Fluoreszenzdetektion bei  $\lambda_{\text{ex/em}} = 335/385 \text{ nm}$ ;

Wie in Teil B der Abbildung dargestellt nimmt die Peakfläche des Pentosidinsignals mit Beginn der Maillard-Produkt-freien Ernährung von Tag 1 zu Tag 2 ab. Im Gegensatz zu Pyrrolin und Furosin setzt sich diese Tendenz allerdings nicht fort, und die Signale an den folgenden Tagen unterscheiden sich kaum.

Für einen Teil der Probanden zeigt sich neben der Abnahme des Pentosidinsignals eine Flächenzunahme einzelner, nicht näher charakterisierter Peaks. Im Fall des in Abbildung 4.2-4 dargestellten Probanden ist dies für die Signale bei ca. 12 und 48 min der Fall. Vor allem letztgenannter Peak nimmt deutlich an Fläche zu, was zu einer Zunahme der Gesamtfläche führt. Unklar ist, ob diese Signalsteigerung Folge verstärkter kataboler Prozesse *in vivo* ist, oder ob im Zuge der hauptsächlich auf Obst und Gemüse basierenden Maillard-Produkt-freien Diät vermehrt fluoreszierende Stoffe wie zum Beispiel Vitamine zugeführt und ausgeschieden wurden. Beide Effekte müssten jedoch zumindest in der Tendenz auf alle Probanden gleichermaßen zutreffen. Das Phänomen der Flächenzunahme einzelner Peaks bzw. der Gesamtfluoreszenz ist jedoch nur für einzelne Studienteilnehmer zu beobachten. Für abschließende Aussagen müsste daher entweder die Identität der ansteigenden Signale geklärt werden oder weitere Parameter des katabolen Proteinabbaus wie die Ausscheidung von Desmosin und Isodesmosin über den Urin bestimmt werden. Grundsätzlich verdeutlicht das Phänomen der unterschiedlichen Entwicklung der Gesamtfluoreszenz, dass der Parameter Fluoreszenz trotz nahezu einheitlicher Maillard-Produkt-Zufuhr, sowohl in Lebensmitteln als auch in physiologischen Medien nicht zwangsläufig mit dem Gehalt an Maillard-Reaktions-Produkten korreliert.

Allgemein ist die gemessene Exkretion des freien Pentosidins mit 0,4 bis 14,2  $\mu\text{g}$  pro Tag um eine Größenordnung kleiner als die von Pyrrolin (0,1 bis 12,9  $\text{mg}/\text{d}$ ) und Fructoselysin (0,4 bis 22,2  $\text{mg}/\text{d}$ ). An den Tagen 1 und 9, an denen sich die Teilnehmer wie gewohnt ernährten, lag die tägliche Pentosidinausscheidung aller Probanden im Mittel bei  $5,4 \pm 2,4 \mu\text{g}/\text{d}$  und damit im unteren Bereich der in der Literatur angegebenen Werte von  $2,04 \pm 0,31 \text{ pmol}/\text{mg}$  Kreatinin (Tsukahara *et al.*, 2003) bis  $27,6 \pm 10 \text{ nmol}/\text{mmol}$  Kreatinin (Yoshihara *et al.*, 1998), entsprechend 5,3 bis 22,0  $\mu\text{g}/\text{d}^*$  bzw. 53,3 bis 242,3  $\mu\text{g}/\text{d}^*$ . Dies entspricht der von Yoshihara *et al.* (1998) beobachteten positiven Korrelation der Pentosidinausscheidung über

---

\* Umrechnung auf Basis einer Kreatininausscheidung von 8 bis 17  $\text{mmol}/\text{d}$  nach Löffler und Petrides, (2003);  
M (Kreatinin) = 113,12  $\text{g}/\text{mol}$



den Harn mit dem Alter. Die bessere Übereinstimmung mit den von *Tsukahara et al. (2003)* publizierten Werten lässt sich mit der Altersstruktur der jeweils untersuchten Panels begründen. Während die Probanden bei *Yoshihara et al. (1998)* zwischen 50 und 77 Jahren alt waren lag das Durchschnittsalter in der vorliegenden Studie und bei *Tsukahara et al. (2003)* mit 27 bzw. 11 Jahren deutlich darunter. Die beschriebene Korrelation konnte, wie in Abbildung 4.2-5 dargestellt, auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl bei „gewöhnlicher“ (Tag 1) als auch bei MRP-freier Ernährung (Tag 3) beobachtet werden.

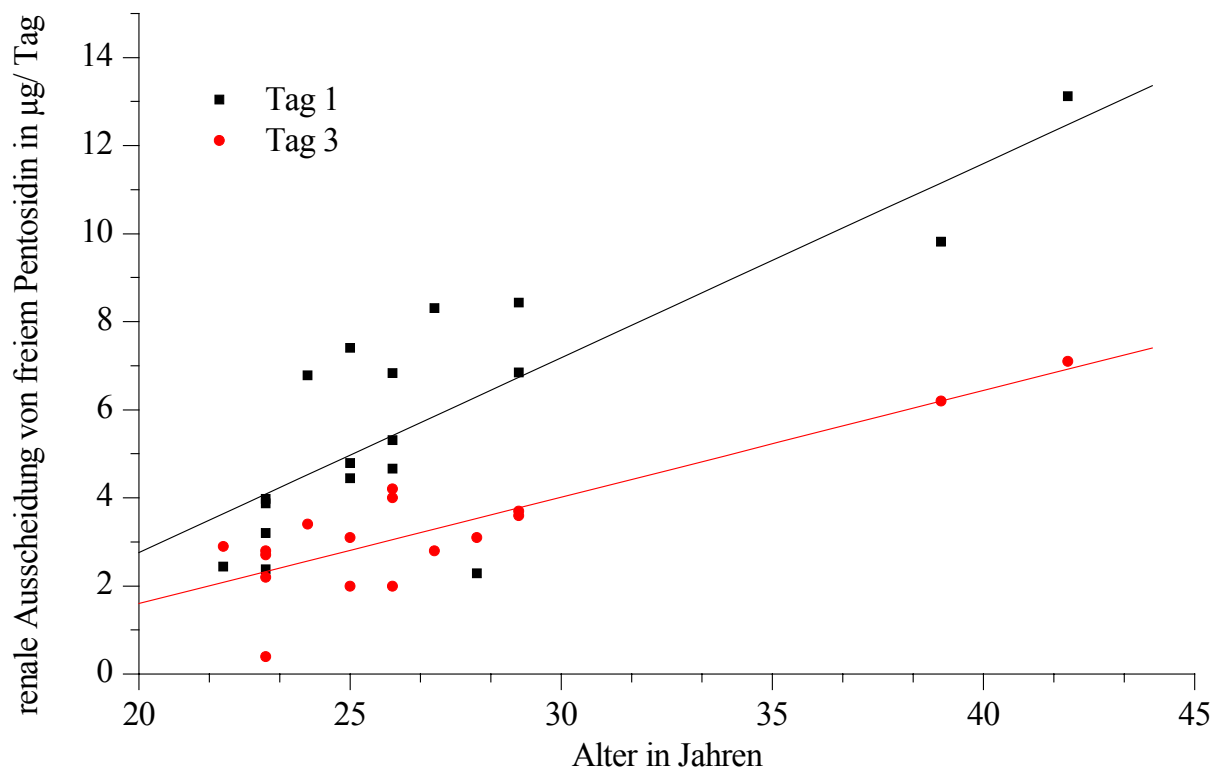


Abbildung 4.2-5: Korrelation der renalen Ausscheidung von freiem Pentosidin in  $\mu\text{g}/\text{Tag}$  mit dem Alter der Probanden; Tage 1 und 3 der Ernährungsstudie, Gesamtes Panel ( $n = 18$ ); Lineare Regression für Tag 1:  $y = 0,44x - 6,08$ ;  $R^2 = 0,67$ ; Tag 3:  $y = 0,24x - 3,24$ ;  $R^2 = 0,74$

Die Kurve am Tag 3 verläuft flacher und zeigt eine bessere Übereinstimmung der Regression mit den Datenpunkten als die Kurve am Tag 1. Offenbar ist die renale Exkretion zwar vom Lebensalter abhängig, wird aber durchaus von den am Tag 1 zum Tragen kommenden individuellen Ernährungsgewohnheiten beeinflusst.

Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Untersuchungen bestimmten die oben zitierten Autoren nicht das freie Derivat, sondern analysierten die Urinproben nach Säurehydrolyse. Ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführter Vergleich der Gehalte an freiem und Gesamtpentosidin im 24-h-Urin der Kontrollgruppe zeigte allerdings wie in Abbildung 4.2-6 dargestellt über den gesamten Studienzeitraum keinen signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Werte. Das im Urin messbare Pentosidin liegt somit annähernd vollständig als freies Derivat vor. Ein Vergleich der Werten mit den Literaturdaten ist somit möglich.

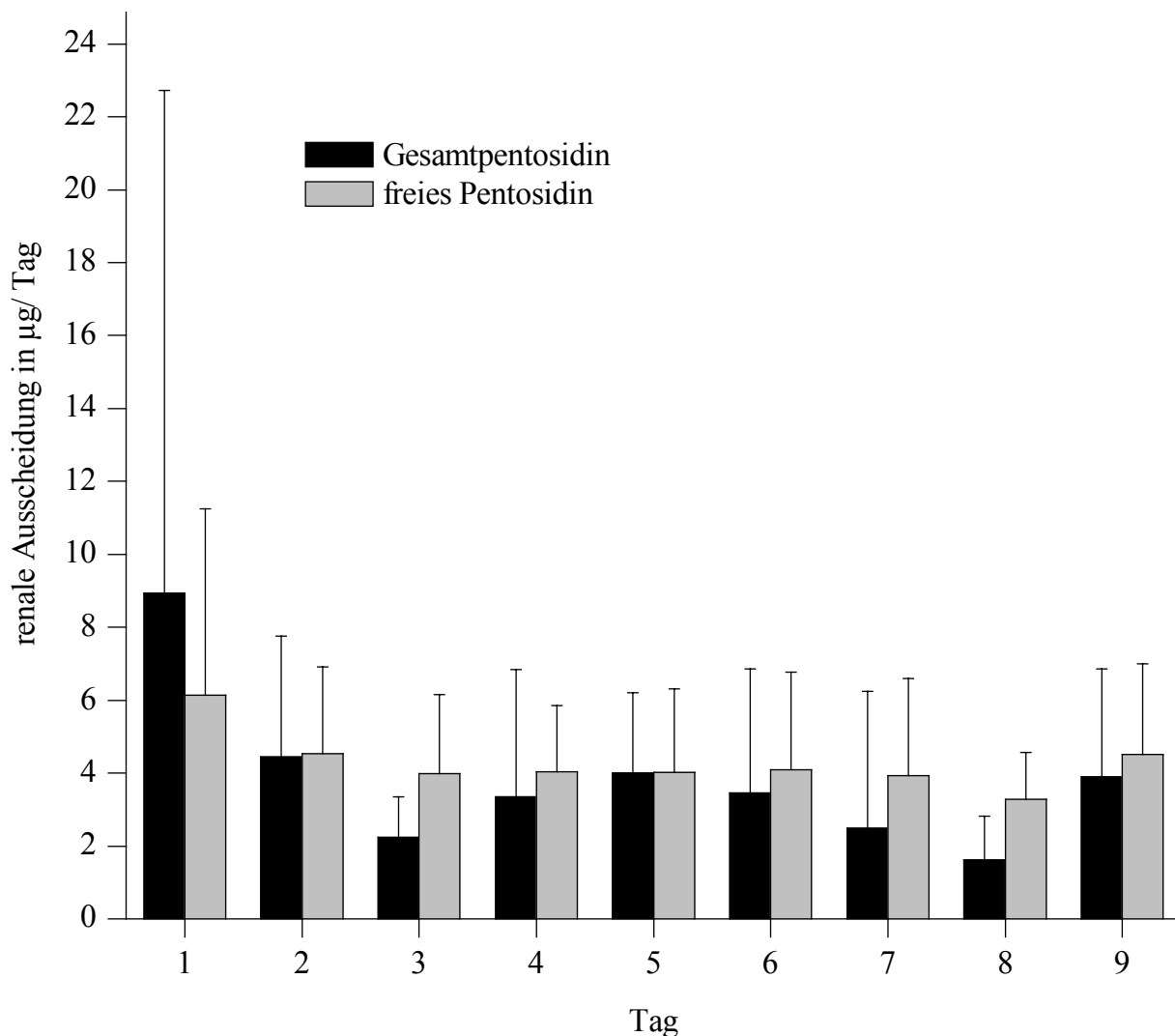


Abbildung 4.2-6: Vergleich der renale Exkretion von Gesamt- (schwarze Balken) und freiem Pentosidin (graue Balken) in µg/ Tag; Ernährungsstudie Tage 1 bis 9, Kontrollgruppe (n = 4)

Als Ursache für die altersabhängige Zunahme der Pentosidinausscheidung wird der zunehmende Abbau langlebiger, AGE-reicher Proteine wie Kollagen diskutiert. Die altersbedingte Anreicherung von Pentosidin und anderen AGEs wurde in der Literatur bereits für diverse Gewebe wie z.B. Haut, Knochen und Knorpel beschrieben (vgl. Kapitel 2.3). Das Ausmaß korreliert dabei mit der Turnover-Rate der Gewebe (*Verzijl et al., 2000*). Mit steigendem Lebensalter nimmt die Fähigkeit des Körpers zu regenerativen Prozessen wie der Erneuerung von Zellen und dem Bindegewebe der Haut ab. Dies führt zu einem vermehrten Abbau gealterter Proteine, die vergleichsweise reich an Pentosidin sind. Zum Nachweis, dass die im Urin beobachtete altersabhängige Zunahme der Pentosidingehalte auf einen verstärkten katabolen Protein-Turnover gealterter Strukturen zurückzuführen ist, müssten der Bindegewebsabbau nachgewiesen werden. Als Indikatoren hierfür werden für Kollagen oder Elastin spezifische Aminosäuren wie Hydroxyprolin und die Galaktosyl- bzw. Glykosylgalaktosyl-Glykoside des Hydroxylysins sowie Desmosin und Isodesmosin in Serum und Urin herangezogen (*Casetta et al., 2000, Spacek et al., 1999*). Weitere Marker sind die Isomerisierungs- und Razemisierungsprodukte von L-Asparaginsäure bzw. von L-Asparagylglycyl-Sequenzen, Pyridinoline und Deoxypyridinoline (*Robins, 2003*). Die Pyridinderivate und D-Asparaginsäure kommen ausschließlich in „gereiften“ Geweben vor und werden auch zur Beurteilung des „Alters“ von Kollagenen herangezogen (*Robins, 2003, Verzijl et al., 2000*). Da auch Pentosidin kontinuierlich im Bindegewebe angereichert wird ist auch hier eine Eignung als Marker für den Protein-Turnover und die Gewebsalterung denkbar. Dabei zu berücksichtigen ist allerdings, dass die Crosslink-Aminosäure nicht spezifisch für das Gewebe ist, sondern die Gehalte in Urin und Serum auch durch die Ernährung beeinflusst werden können.

#### 4.2.5 Bestimmung von freiem N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin im Urin

Die Bestimmung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin erfolgte mittels einer am Institut zunächst für die Bestimmung in Lebensmitteln entwickelten GC-MS-Methode mit N<sup>ε</sup>-Carboxymethylornithin (CMO) als internem Standard und Derivatisierung der Aminosäuren zu den Trifluoressigsäuremethylestern (TFAME). Beide Verbindungen wurden wie in Kapitel 3.6 beschrieben zunächst synthetisiert und anschließend zur Auswahl von Qualifier- und Targetionen nach Derivatisierung im SCAN-Modus vermessen (vgl. Kapitel 3.7.6 und 4.1.4). Durch einen Austausch der Trennsäule verschoben sich die Retentionszeiten der Analyten wie

in Abbildung 4.2-7 dargestellt im Vergleich zur Bestimmung in Lebensmitteln um ca. 2,5 min auf 26,5 min (CMO) und 28,8 min (CML).

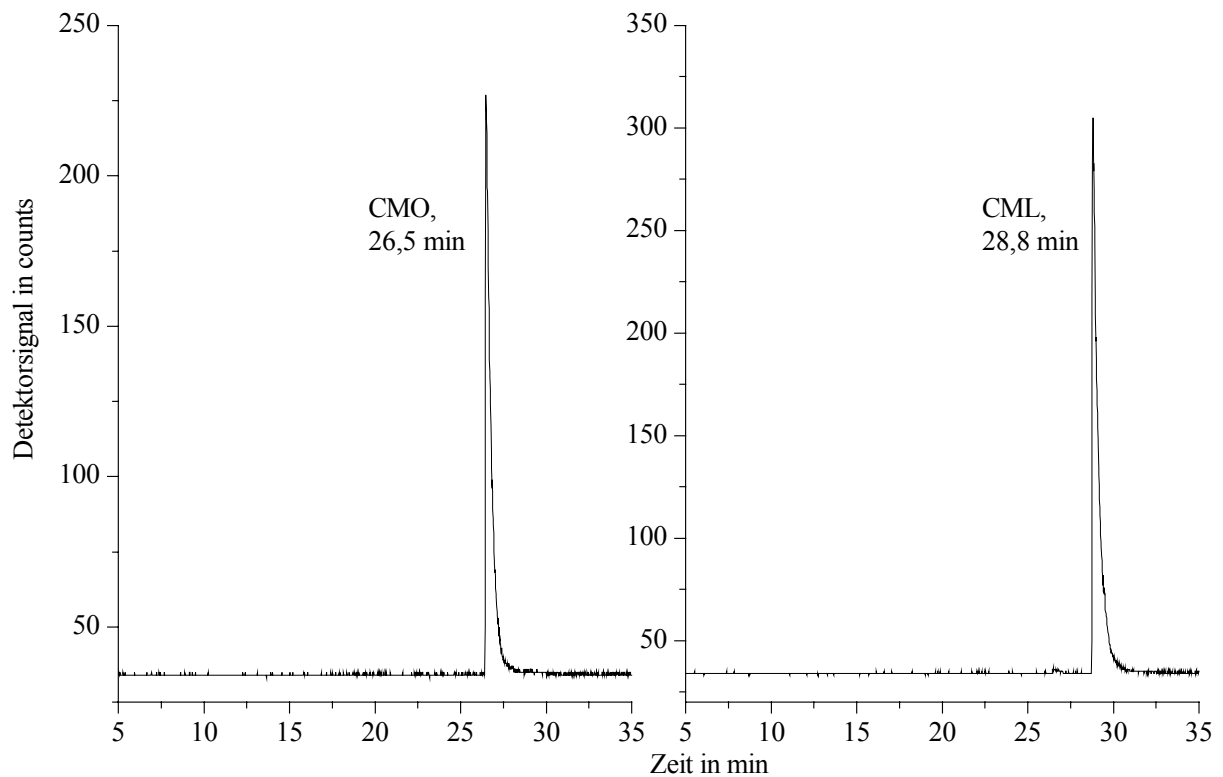


Abbildung 4.2-7: Totalionenstromchromatogramme der TFAME-Ester von CMO- und CML-Standards nach Austausch der Trennsäule der Gaschromatographie

*Mavric (2005)* beschreibt die Bildung von Ornithin als Abbauprodukt von Arginin und Argininderivaten in Modellansätzen. *Sell und Monnier (2004 und 2005)* wiesen diesen Abbau auch in physiologischen Medien wie gealtertem humanem Kollagen und Linsenkristallin nach und betrachten Ornithin als Marker für die Argininschädigung *in vivo*. Um sicherzustellen, dass nicht auch Carboxymethylornithin *in vivo* gebildet und über den Urin ausgeschieden wird, der interne Standard also nicht „natürlicherweise“ im Urin vorkommt, wurde eine Urinprobe ohne Zusatz von CMO derivatisiert und analysiert. Totalionenstromchromatogramm und extrahierte Massenspuren der Targetionen von CMO und CML sind in Abbildung 4.2-8 dargestellt. Carboxymethylornithin war ohne vorherige Zugabe nicht im Urin nachweisbar und ist daher auch in dieser Matrix als interner Standard einsetzbar.

Die Kalibration der Methode erfolgte wie bereits für Lebensmittel beschrieben. Aufgrund der zu erwartenden niedrigeren Werte wurde hier mit einer geringeren Menge an internem Standard und im Bereich von 3 bis 300 nmol CML neu kalibriert.

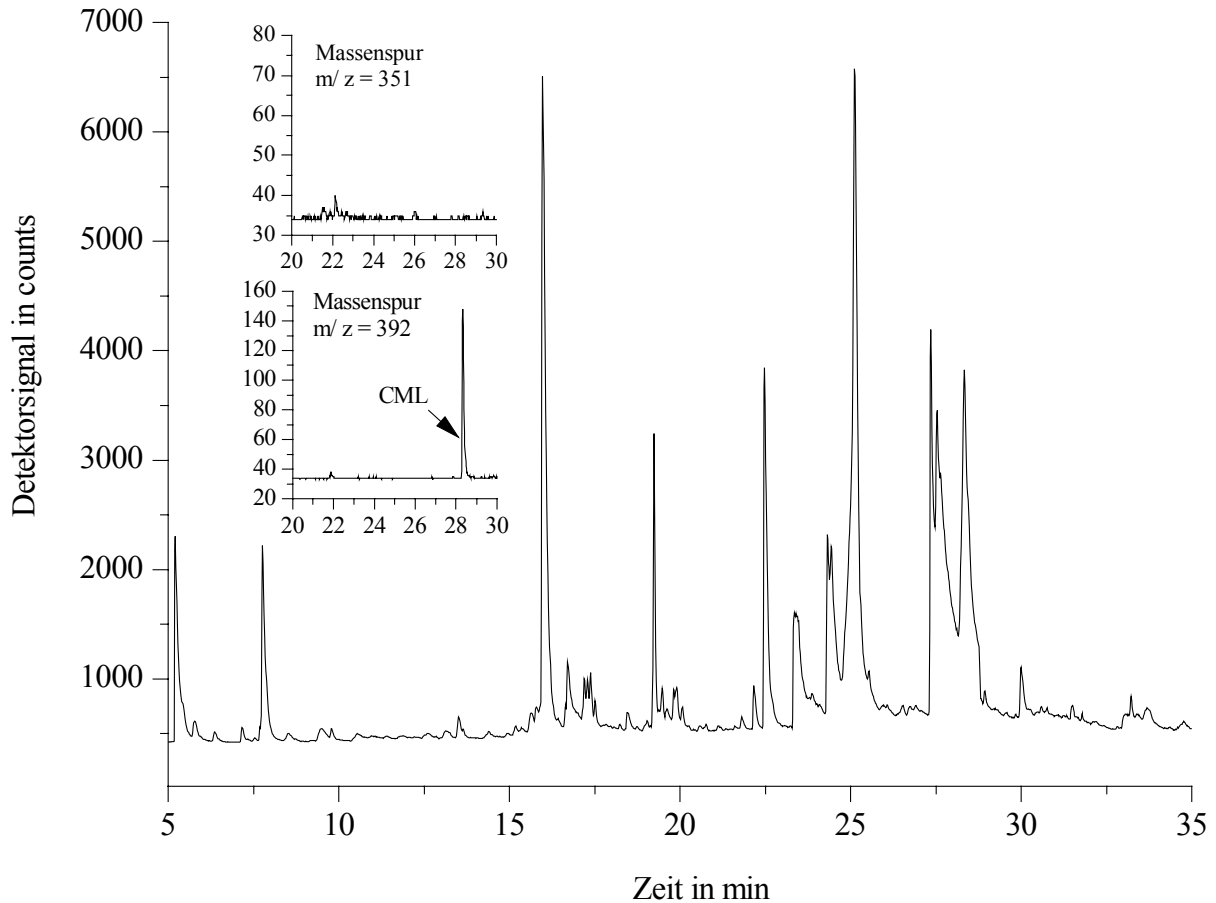


Abbildung 4.2-8: Untersuchung zum Vorkommen von Carboxymethylornithin im Urin; Totalionenstromchromatogramm und extrahierte Massenspektren von CMO- ( $m/z = 351$ ) und CML-TFAME-Derivaten ( $m/z = 392$ )

Als problematisch erwies sich die Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion, bei der zunächst unpolare Bestandteile an einer Umkehrphase abgetrennt werden, und der Analyt anschließend an einem starken Kationenaustauscher isoliert und aufkonzentriert wird. Aufgrund der komplexen ionischen Matrix und der großen Unterschiede im Tagesurinvolumen sowie der damit einhergehenden Verdünnung des CML kam es hier auf der einen Seite zum Teil zu einer Überladung der Kartuschen und auf der anderen Seite zu einer Unterschreitung des Kalibrationsbereiches. Da eine Normierung der Proben untereinander, etwa durch Aufkonzentrierung, mit einer weiteren thermischen Beanspruchung verbunden wäre, wurde hierauf verzichtet. Statt dessen wurde ein mittlerer Volumenbereich

von 300 bis 500 µl für die Aufarbeitung ausgewählt. Außerdem wurden die derivatisierten Proben zur gaschromatographischen Analyse im halben Lösungsmittelvolumen der Bestimmung in Lebensmitteln aufgenommen. Trotzdem lag der überwiegende Teil der untersuchten Proben im unteren Bereich der Kalibrationsgerade.

In Abbildung 4.2-9 sind die Chromatogramme des Totalionenstroms und die extrahierten Massenspuren des internen Standards ( $m/z$  (CMO) = 351) und des Analyten ( $m/z$  (CML) = 392) in einer Urinprobe des Tages 1 der Ernährungsstudie dargestellt. Die Signale eluieren auch hier als basisliniengetrennte Peaks.

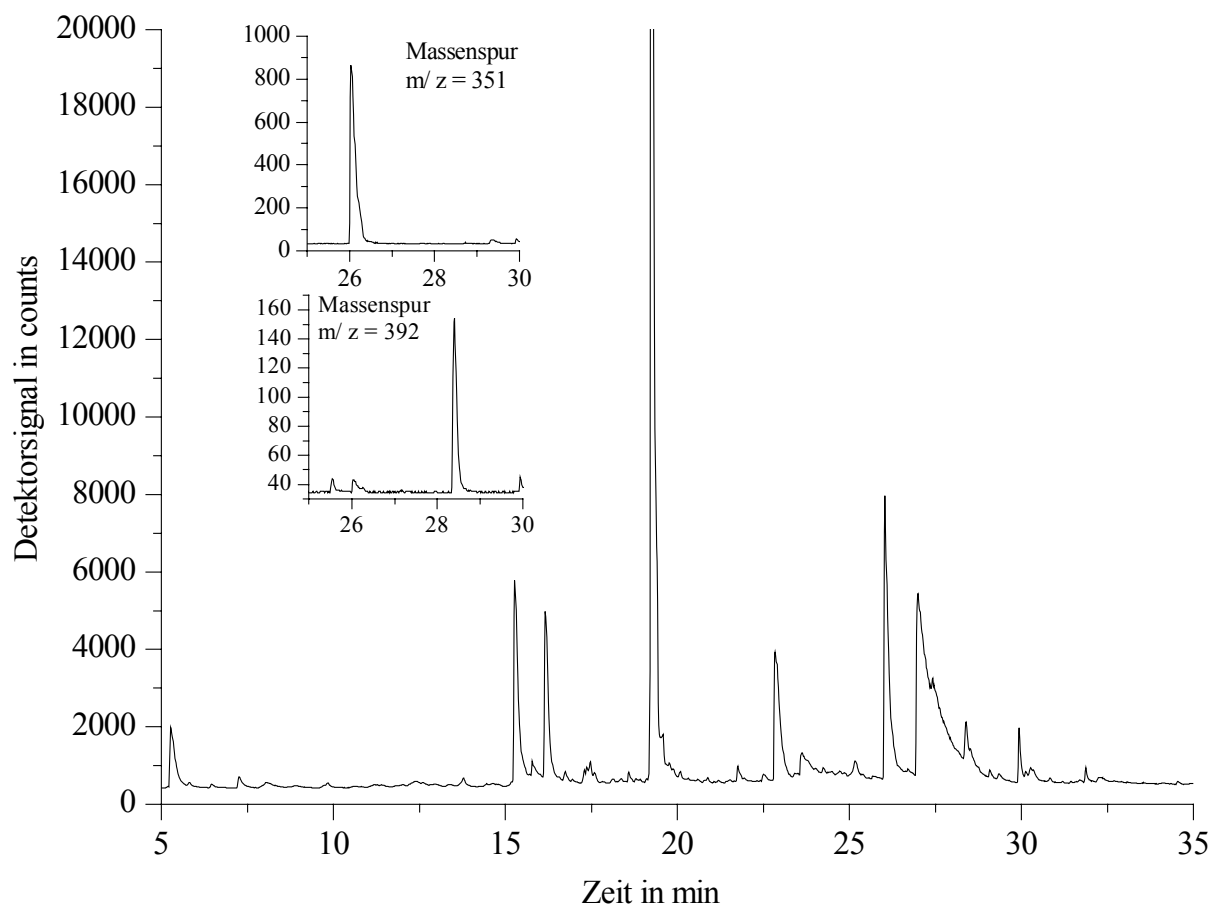


Abbildung 4.2-9: CML-Bestimmung in einer Urinprobe des ersten Tages der Ernährungsstudie, Totalionenstromchromatogramm und extrahierte Massenspuren von CMO- ( $m/z = 351$ ) und CML-TFAME-Derivaten ( $m/z = 392$ )

Die ermittelten CML-Gehalte in den Urinproben liegen zwischen 0,1 und 5,6 mg/ d. Besser mit den Literaturwerten vergleichbar sind die an den Tagen 1 und 9 bestimmten Werte von  $1,6 \pm 1,5$  mg/ d, da sich die Teilnehmer hier „gewöhnlich“ ernährten. *Knecht et al. (1991)*

kamen mit einer vergleichbaren GC-MS-Methode zu Werten von  $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$  Kreatinin, entsprechend  $0,6$  bis  $2,5 \text{ mg}/\text{d}^*$ . Zu berücksichtigen ist hier, dass die Bestimmung nach saurer Hydrolyse durchgeführt wurde und so der Gesamt-CML-Gehalt und nicht der Gehalt der freien Carboxymethylaminosäure in der Urinproben resultierte. *Wagner et al. (2001)* bestimmten unter Nutzung einer ELISA-Methode mit  $1,76 \pm 0,62 \text{ mg}/\text{d}$  ähnliche Werte. *Friess et al. (2003)* unterschieden zwischen der Ausscheidung von freiem und Gesamt-CML. Zur Bestimmung des freien Derivates wurde die Proteinfraction durch Fällung mit Acetonitril abgetrennt. Sie fanden Ausscheidungen von  $0,18 \pm 0,13 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin für das freie Derivat und  $0,45 \pm 0,14 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  Kreatinin für Gesamt-CML, entsprechend  $0,1$  bis  $1,1 \text{ mg}/\text{d}$  bzw.  $0,5$  bis  $2,1 \text{ mg}/\text{d}^*$ . Die im vorliegenden Fall ermittelten Ausscheidungsdaten liegen somit im Bereich der Literaturdaten.

#### 4.2.6 Einfluss der Ernährung auf die renale Exkretion ausgewählter freier MRPs

Neben der Erfassung der durchschnittlichen renalen Ausscheidung individueller freier Maillard-Reaktions-Produkte war es Ziel der vorliegenden Arbeit, Aussagen über den Einfluss der Ernährung auf deren renale Exkretion zu treffen. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der Frage nach dem Einfluss exogener MRP-Quellen auf die *in vivo* zirkulierenden AGE-Mengen von Interesse.

Der grundsätzliche Einfluss der Ernährung auf die renale Exkretion von freien MRPs lässt sich an den ersten 4 Tagen der Ernährungsstudie für das gesamte Panel ( $n = 18$ ) und im folgenden am Beispiel der Kontrollgruppe ( $n = 5$ ) diskutieren. Für das frühe Maillard-Produkt Fructoselysin sowie für das Produkt der fortgeschrittenen Reaktion Pyrralin ist, wie in Abbildung 4.2-10 dargestellt, eine deutliche Abnahme der Exkretion in Folge der Diät zu erkennen. Für Fructoselysin ergibt sich eine schnelle Verringerung der Ausscheidung innerhalb der ersten 48 h der Diät um ca. 70 % von  $7,2 \pm 4,7 \text{ mg}/\text{d}$  am ersten Tag auf  $2,2 \pm 1,4 \text{ mg}/\text{d}$  am Tag 3. Ein weiteres Absinken der Gehalte auf ein Minimum von  $0,9 \pm 0,2 \text{ mg}/\text{d}$  Tag 8 schließt sich an. Insgesamt sind damit mehr als 85 % des über den Harn ausgeschiedenen Fructoselysins ernährungsbedingt und somit exogenen Ursprungs. Es verbleibt eine Grundausscheidung von ca.  $1 \text{ mg}/\text{d}$ .

---

\*Umrechnung auf Basis einer Kreatininausscheidung von 8 bis 17 mmol/ d nach *Löffler und Petrides, (2003)*;  $M(\text{Kreatinin}) = 113,12 \text{ g}/\text{mol}$

Mit Abschluss der eingeschränkten Ernährung steigen die Werte erneut auf  $3,4 \pm 2,0$  mg/ d am neunten Tag an. Zu dem beobachteten Basislevel der Exkretion kann neben der endogenen Bildung des Analyten und dessen Freisetzung im Zuge des regulären Protein-turnovers auch der Verzehr des einen Liters pasteurisierter Milch, als Ausnahme von den Restriktionen der Diät, mit  $0,2$  mg/ d beitragen. Dies entspricht der Standardabweichung des ermittelten Basislevels und liegt damit im Schwankungsbereich der gemessenen Werte.

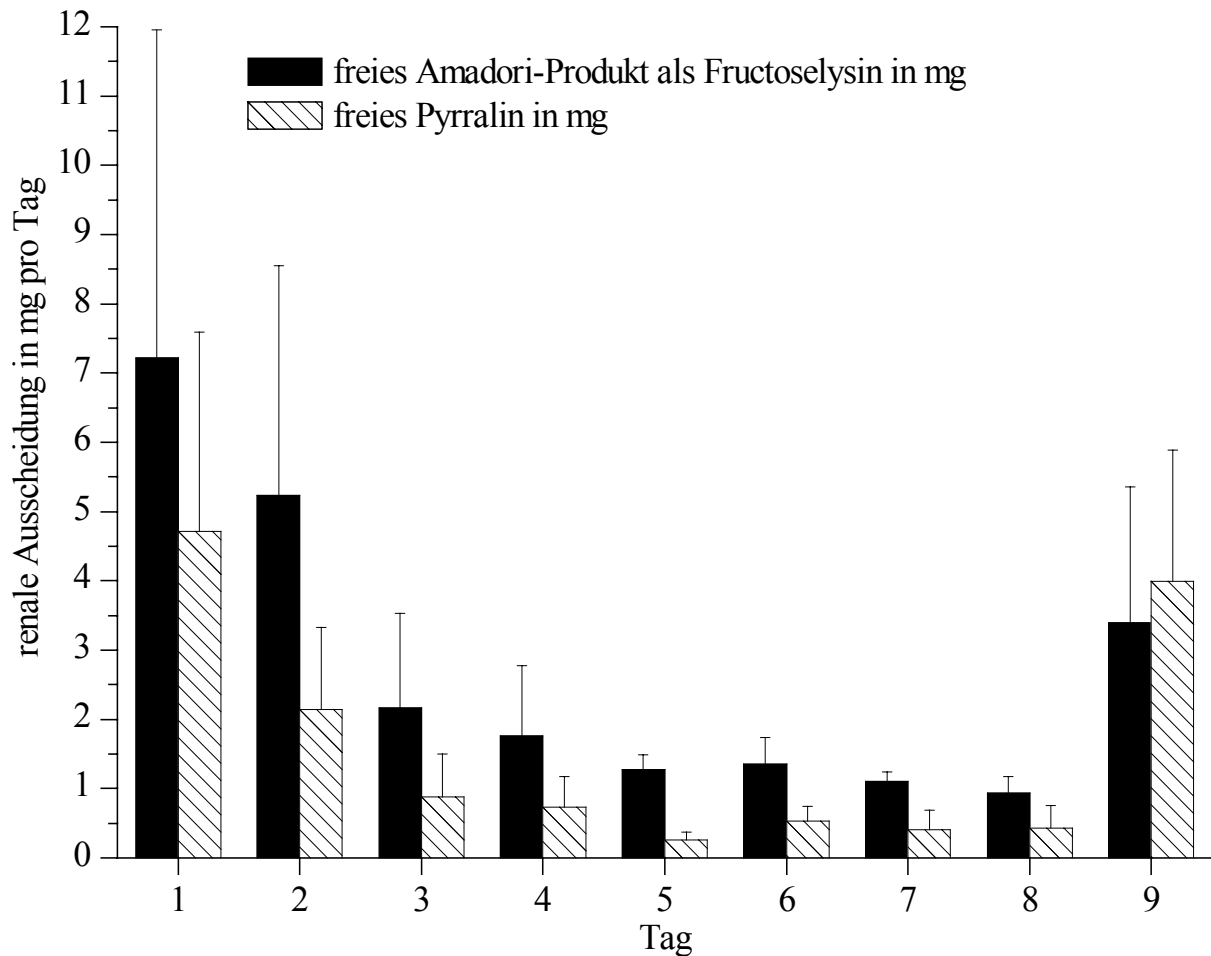


Abbildung 4.2-10: Renale Exkretion von freiem Amadori-Produkt (als Fructoselysin) und Pyrralin in mg/ Tag im Verlauf der MRP-freien Ernährung; Tage 1 bis 4: gesamtes Panel (n = 18); Tage 5 bis 9: Kontrollgruppe (n = 5)

Die Exkretion von freiem Pyrralin sinkt im gleichen Zeitraum um 80 % von  $4,7 \pm 2,9$  mg/ d am Tag 1 auf  $0,9 \pm 0,6$  mg/ d am Tag 3. Auch hier schließt sich eine weitere Verringerung der messbaren Werte auf ein Minimum von  $0,3 \pm 0,1$  mg/ d am Tag 5 an. An den darauffolgenden Tagen sind jedoch wieder höhere Gehalte zu verzeichnen. Im Mittel bewegen sich die Gehalte an den Tagen 5 bis 8 um  $0,4 \pm 0,2$  mg/ d. Damit stammen insgesamt ca. 90 % des im Urin messbaren freien Pyrralins aus der täglichen Nahrung.



Beim Vergleich der Absolutwerte der Ausscheidung von Fructoselysin und Pyrralin fällt auf, dass sich die über den Urin ausgeschiedenen Gehalte nur wenig unterscheiden, während das Amadori-Produkt bei der Zufuhr stark überwiegt (vgl. Kapitel 2.2.1). Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig.

Während zahlreiche Studien über eine vergleichsweise schlechte Resorption von Fructoselysin berichteten (*Erbersdobler et al., 2001*), scheint Pyrralin deutlich besser aufgenommen zu werden. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Amadori-Produkt in stärkerem Ausmaß nach erfolgter Resorption metabolisiert wird und somit nicht mehr im Urin nachweisbar ist. Ein möglicher Metabolit ist Carboxymethyllysin, dessen Ausscheidung dann sowohl vom Verzehr CML- als auch Fructoselysin-haltiger Nahrung beeinflusst würde. Eine solche Abhängigkeit der CML-Gehalte im Urin konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.2.7.4). Denkbar ist auch ein enzymatischer Abbau der Fructosylaminosäure sowie ein Weiterreagieren im Sinne der Maillard-Reaktion.

Anders stellte sich der Verlauf der freien Pentosidin- und Carboxymethyllysinausscheidung dar (Abbildung 4.2-11). Wie für das Amadori-Produkt und Pyrralin beobachtet, verringern sich die Werte auch für das freie Pentosidin zunächst von  $5,8 \pm 2,9 \mu\text{g/ d}$  am Tag 1 innerhalb der ersten 48 Stunden der MRP-freien Diät über  $4,8 \pm 2,9 \mu\text{g/ d}$  um 43 % auf  $3,3 \pm 1,5 \mu\text{g/ d}$  am Tag 3. An den folgenden Tagen steigen die Werte wieder bis auf  $4,7 \pm 1,4 \mu\text{g/ d}$  an (Tag 5), sinken bis zum Tag 8 allerdings wieder auf  $3,4 \pm 1,1 \mu\text{g/ d}$  ab. Mit Abschluss der Diät steigt die Exkretion am Tag 9 erneut auf  $5,1 \pm 1,8 \mu\text{g/ d}$  an. Aus dem Mittelwert der Tage 2 bis 8 ergibt sich eine Grundausscheidung des freien Derivates von  $4,1 \pm 2,0 \mu\text{g/ d}$  an den Studientagen mit eingeschränkter Ernährung. Dies entspricht einer Verminderung um 29 % bezogen auf die Ausscheidung am ersten Tag. Offenbar sind die durch die tägliche Ernährung zugeführten Maillard-Produkte für die Ausscheidung von freiem Pentosidin von deutlich geringerem Einfluss als für Fructoselysin und Pyrralin, bei denen 75 % bzw. 85 % der ausgeschiedenen Menge durch die Ernährung bedingt sind. Damit einher geht eine vergleichsweise hohe Grundausscheidung, als deren offenbar endogene Quelle bislang nur der reguläre Protein-turnover nach endogener Bildung des proteingebundenen Derivates in Betracht kommt.

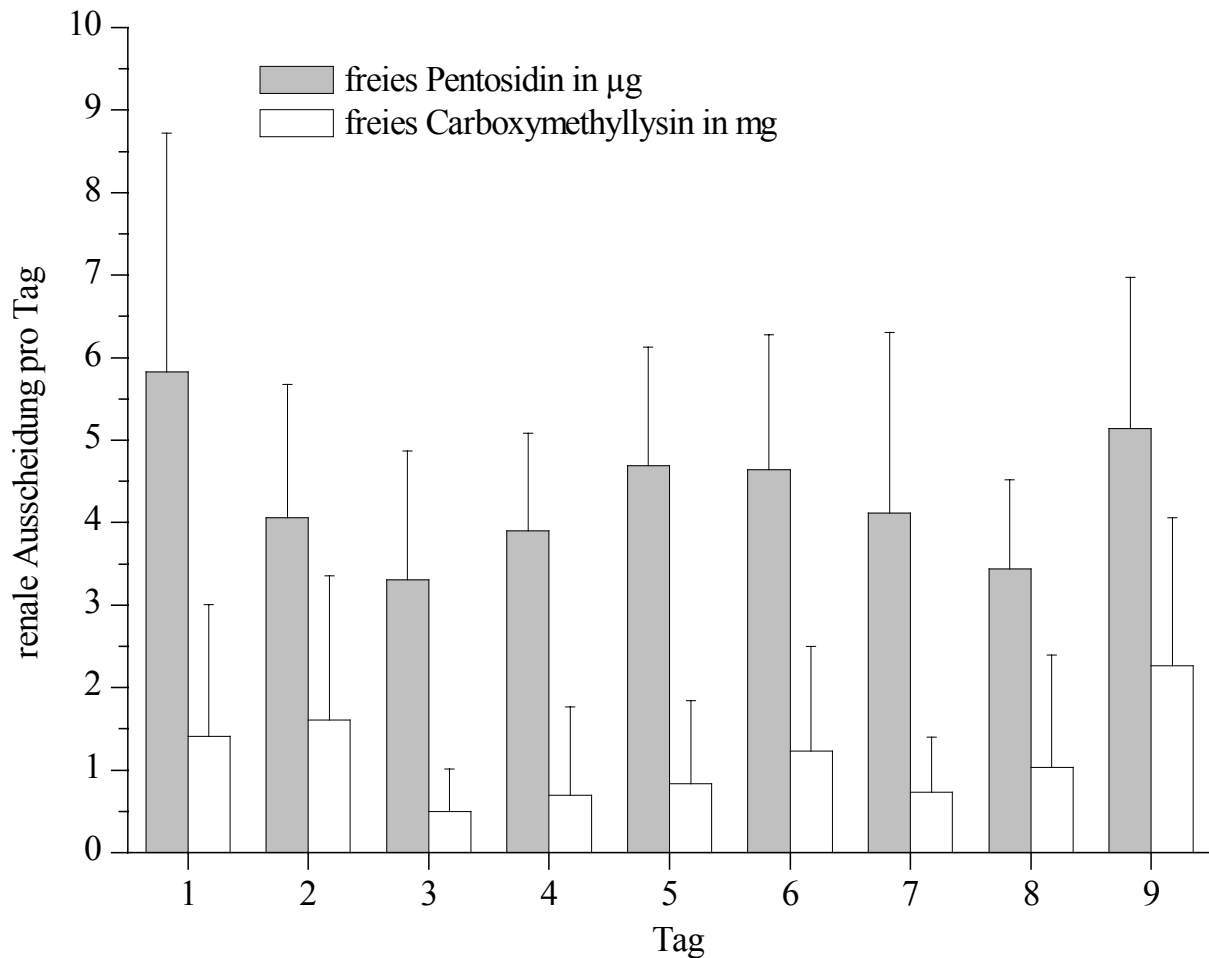


Abbildung 4.2-11: Renale Exkretion von freiem Pentosidin und CML in  $\mu\text{g}$  bzw. mg/ Tag im Verlauf der MRP-freien Ernährung; Tage 1 bis 4: gesamtes Panel ( $n = 18$ ); Tage 5 bis 9: Kontrollgruppe ( $n = 5$ )

Für freies Carboxymethyllysin ist im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Maillard-Reaktions-Produkten anstelle eines Rückgangs der täglichen Exkretion zunächst eine geringfügige Zunahme von  $1,4 \pm 1,6$  mg/ d am Tag 1 auf  $1,6 \pm 1,8$  mg/ d am Tag 2 zu verzeichnen (Abbildung 4.2-11). An den darauffolgenden Tagen schwanken die Werte zwischen  $0,5 \pm 0,5$  mg/ d am dritten Tag und  $2,3 \pm 1,8$  mg/ d am Tag 9. Ein Trend ist nicht erkennbar. Unter Berücksichtigung aller Studientage ergibt sich eine durchschnittliche Ausscheidung der freien Carboxymethylaminosäure von  $1,0 \pm 1,3$  mg/ d. Die Ernährungsumstellung hat offenbar keinen Einfluss auf die im Urin messbaren Mengen.

Aus der Verringerung der im Harn ermittelten Gehalte an Amadori-Produkt, Pyrralin und Pentosidin ergibt sich, dass die im Lebensmittel proteingebunden vorliegenden Aminosäurederivate zumindest teilweise freigesetzt und resorbiert werden. Pentosidin und vor allem CML sind entweder schlechter resorbierbar oder die renale Exkretion erfolgt zu einem niedrigeren Grad, was mit Akkumulation einhergehen oder auf andere Eliminationswege wie über die Leber hindeuten würde.

#### **4.2.7 Renale Exkretion ausgewählter freier MRPs in Abhängigkeit des Verzehrs verschiedener Lebensmittel**

Neben der allgemeinen Betrachtung des Einflusses der Ernährung auf die renale Ausscheidung freier MRPs sollte der Effekt einzelner Lebensmittel mit bekannten MRP-Gehalten untersucht werden. Ausgehend von der Absenkung der Exkretion auf ein Basislevel und der Zufuhr konkreter Mengen an CML, Pentosidin, Pyrralin und Fructoselysin an Tag 5 der Studie waren so quantitative Daten im Sinne einer Wiederfindung der verzehrten Mengen zugänglich. Unterschiedliche Lebensmittel stellen unterschiedliche Matrices dar, die Auswirkungen auf Hydrolysierbarkeit, Resorption und Exkretion haben können. Hinzu kommen unterschiedliche Mengen und Bindungszustände wie am Beispiel des Pentosidins, das im Kaffee im Gegensatz zu den anderen eingesetzten Lebensmitteln hauptsächlich frei vorliegt, deutlich zu sehen.

Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt nach Derivaten getrennt. Für die Tage 1 bis 4, an denen sich alle Probanden Maillard-Produkt-frei ernährten, wurden wie oben die Daten des gesamten Panels (n = 18) herangezogen, während an den folgenden Tagen nach Lebensmittelgruppen unterschieden wurde. Die Probandenanzahl betrug für „Kontroll“- und „Puddinggruppe“ je 5 Personen und für die „Kaffee“- und „Salzstangengruppe“ je 4 Personen.

##### **4.2.7.1 Amadori-Produkt**

Die Zufuhr des Amadori-Produktes über die verzehrten Lebensmittel betrug für die Puddinggruppe 342 mg und für die Salzstangengruppe 132 mg Fructoselysin. Im Kaffee war das Amadori-Produkt nicht nachweisbar. Betrachtet man den in Abbildung 4.2-12 dargestellten Verlauf der Ausscheidung über den Urin, so fällt zunächst auf, dass sich Pudding- und Kontrollgruppe ab Tag 3 annähernd gleich verhalten. Dies ist insofern überraschend, als dass durch den Verzehr des Puddings die größte Menge an Fructoselysin zugeführt wurde, während sich die Kontrollgruppe weiter MRP-frei ernährte.

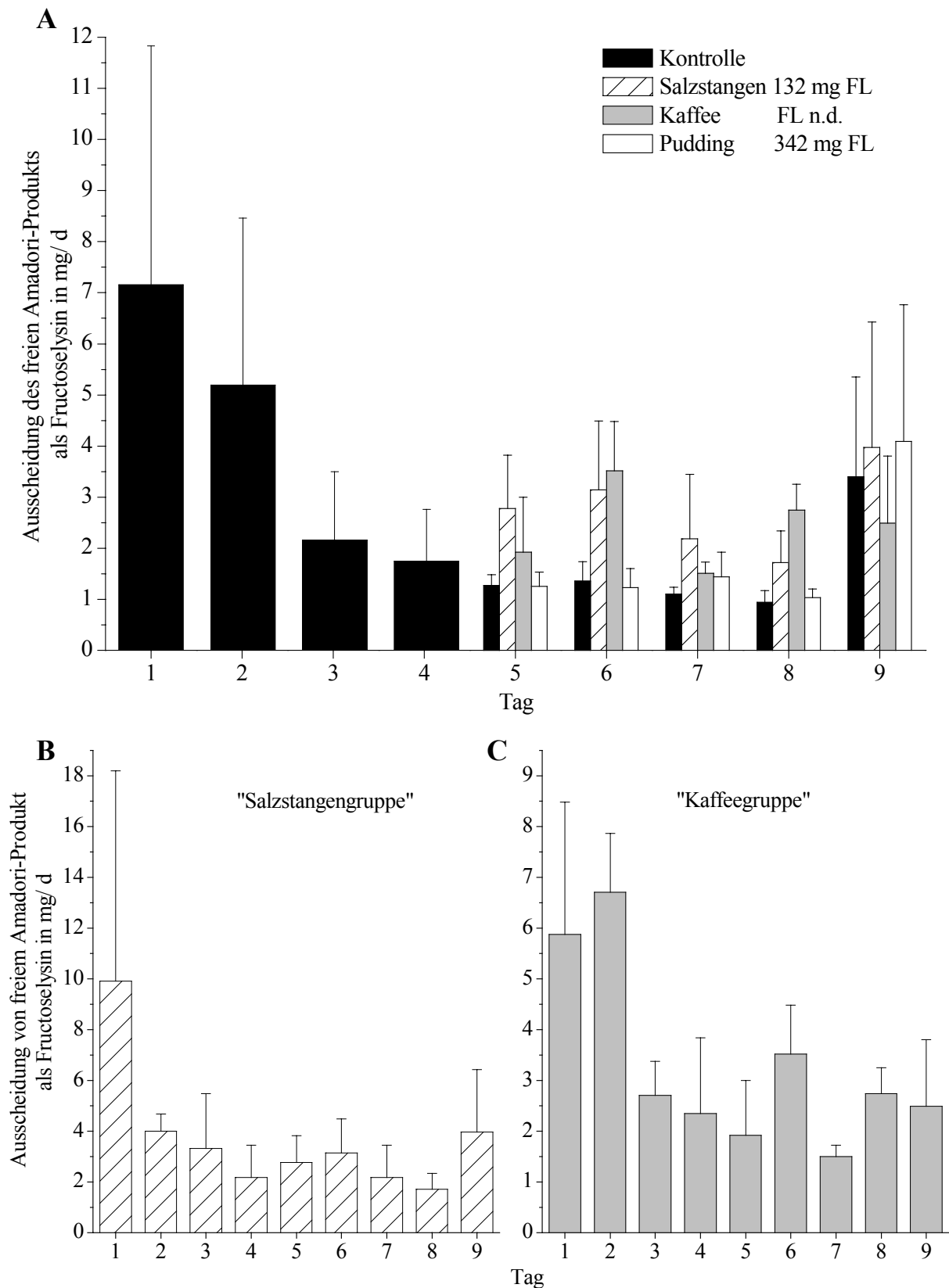


Abbildung 4.2-12: Renale Exkretion von freiem Amadori-Produkt als Fructoselysin in mg/ d im Verlauf der Ernährungsstudie; A) gesamtes Panel (Tage 1 bis 4: n = 18; Tage 5 bis 9: Kontrolle, n = 5, Salzstangen, n = 4; Kaffee, n = 4; Pudding, n = 5); B und C) Darstellung der „Salzstangen-“, bzw. „Kaffeegruppe“ über die gesamte Studiendauer

Leichte Erhöhungen der Ausscheidung zeigen sich für Salzstangen- und Kaffeegruppe an den Tagen 5 und 6. Diese relativieren sich jedoch, wenn man die Tage 1 bis 4 nicht als Gesamtheit sondern nach Gruppen getrennt betrachtet, zumal Fructoselysin im Kaffee nicht nachgewiesen wurde. Es wird deutlich, dass Salzstangen- und Kaffeegruppe sich im Vergleich zu den entsprechenden Werten am Tag 4 kaum verändern.

Ein Einfluss der an Tag 5 verzehrten Lebensmittel konnte somit für keine der Gruppen nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu der in Kapitel 4.2.6 beobachteten Abnahme der Ausscheidung des freien Amadori-Produktes um 85 % nach 7-tägiger Diät. In einer ähnlichen Studien beobachteten *Henle et al. (2000)*, dass nach einer 2-tägigen Maillard-Produkt-freien Diät die Gabe von ca. 2,5 g Lactoselysin zu einer Erhöhung der im Urin messbaren Furosingehalte entsprechend 2 % des verzehrten Amadori-Produktes führte. *Erbersdobler et al. (1991)* ermittelten Wiederfindungen von 2 % bis 3 % nach Gabe von mit Fructoselysin angereicherten (2,9 g) Lebensmitteln. Gemessen an diesen Daten wären bei den hier eingesetzten Testmahlzeiten Zunahmen der Exkretion um ca. 3 mg nach Verzehr der Salzstangen bzw. ca. 7 mg nach dem Pudding zu erwarten gewesen. Diese Mengen liegen im Bereich der Streuung der Einzelwerte und wurden so möglicherweise nicht erkannt. Nachdem auch über die Fäzes nur etwa 1 % des proteingebundenen Derivates ausgeschieden werden (*Lee et al., 1994*) ist der Verbleib von über 90 % des über die Nahrung zugeführten Amadori-Produktes nach wie vor unbekannt. Als Hauptursache werden eine schlechte Verdaubarkeit des proteingebundenen Produktes in Verbindung mit einer im Vergleich zu Lysin verlangsamten Resorption des freien Derivates sowie der mikrobielle Abbau der Fructosylaminosäure im Dickdarm diskutiert. Auf Verdau und Resorption als Schlüsselprozesse weisen auch Beobachtungen von *Niederweiser et al. (1975)* hin, die belegen, dass die Wiederfindung der verzehrten Amadori-Produkte bei Kleinkindern, deren Organismus in größerem Ausmaß in der Lage ist Peptide zu resorbieren, mit bis zu 55 % weit höher ist.

Hinzu kommt, dass im Tierversuch nach intravenöser Injektion von freiem Fructoselysin mehr als 80 % der applizierten Dosis über die Niere ausgeschieden wurden (*Erbersdobler et al., 2001*). Auch eine Metabolisierung *in vivo* kann nicht ausgeschlossen werden. *Zyzak et al. (1995)* beschreiben den Abbau von Kollagen-gebundenem Fructoselysin und freiem Formyl-Fructoselysin durch Umkehrung oder Fortschreiten der frühen Maillard-Reaktion durch Oxidations- oder Umlagerungsreaktionen des Amadori-Produktes unter physiologischen

Bedingungen *in vitro*. Die dabei ermittelten Halbwertszeiten liegen bei mehreren Tagen, während die renale Ausscheidung des Amadori-Produktes wie unter 4.2.6 gezeigt innerhalb von 48 h größtenteils abgeschlossen ist. *Henle et al. (2000)* und *Erbersdobler et al. (1991)* gehen von einer noch schnelleren Exkretion innerhalb von 24 h bzw. 12 h aus. Die Ausscheidung des Derivates ist damit offenbar kinetisch gegenüber dem Abbau bevorzugt. Letzterer sollte demnach für die Metabolisierung alimentärer Amadori-Produkte von untergeordneter Bedeutung sein. Zu bedenken ist dabei allerdings die nur bedingte Übertragbarkeit *in vitro* ermittelter Halbwertszeiten auf das *in vivo* Geschehen. Auf die Umsetzung von Fructoselysin zu CML schlossen *Dunn et al. (1989)* aus der Beobachtung, dass das Verhältnis von CML zu Fructoselysin in humanem Linsenprotein eine altersabhängige Zunahme aufweist. Sie errechneten eine Bildungsrate von 0,1 mol CML/ mol Fructoselysin und Jahr. Somit handelt es sich auch hier um einen im Vergleich zur Elimination stark verlangsamten Prozess, der auf die Exkretion der alimentären Verbindung keinen Einfluss haben sollte.

### 4.2.7.2 Pyrrolin

Die Pyrrolinzufuhr am Tag 5 betrug 8,4 mg für die Salzstangen und 0,4 mg für den Pudding. Im Kaffee war das Pyrrollderivat nicht nachweisbar. Der Einfluss des Verzehrs der Testmahlzeiten auf die Ausscheidung von freiem Pyrrolin ist in Abbildung 4.2-13 dargestellt. Entsprechend der Gehalte an Pyrrolin in den jeweiligen Lebensmitteln zeigen sich nach Verzehr von Kaffee und Pudding keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Für die verzehrte Menge an Pudding wurde zwar eine Zufuhr von 0,4 mg Pyrrolin bestimmt, im Vergleich zu der unter 4.2.6 abgeschätzten Grundausscheidung von  $0,4 \pm 0,2$  mg/ d ist dieser Wert jedoch offenbar zu gering um sich, selbst bei 100 %iger Wiederfindung im Urin, maßgeblich vom Basislevel zu unterscheiden.

Anders stellt sich die Ausscheidung nach Verzehr der Salzstangen dar. Hier zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Exkretion von  $0,7 \pm 0,5$  mg/ d am Tag 4 für das gesamte Panel auf  $4,1 \pm 1,7$  mg für die Salzstangengruppe am Tag 5. Mit  $2,1 \pm 1,3$  mg/ d und  $1,2 \pm 0,6$  mg/ d sind auch die Ausscheidungen an den Tagen 6 und 7 noch erhöht. Bezogen auf die durchschnittliche Exkretion des gesamten Panels am Tag 4 ( $0,7 \pm 0,5$  mg/ d) ergibt sich aus den Mittelwerten der Salzstangengruppe an den Tagen 5 bis 7 eine „Mehrausscheidung“ von 5,3 mg. Dies entspricht einer Wiederfindung von 63 % des in den Salzstangen bestimmten Derivates.

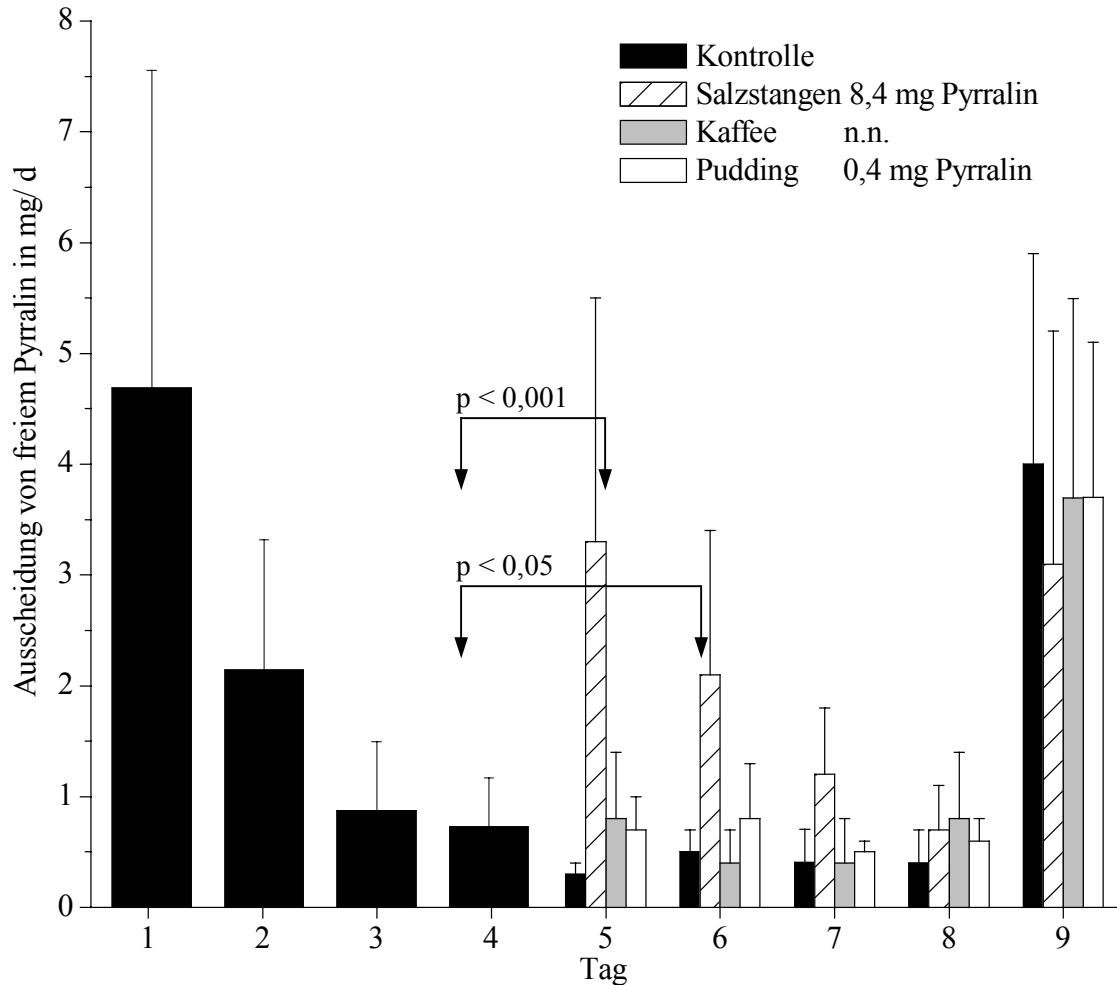


Abbildung 4.2-13: Renale Exkretion von freiem Pyrrolin in mg/d im Verlauf der Ernährungsstudie; gesamtes Panel (Tage 1 bis 4: n = 18; Tage 5 bis 9: Kontrolle, n = 5, Salzstangen, n = 4; Kaffee, n = 4; Pudding, n = 5); Signifikanzniveaus berechnet über ungepaarten t-Test, vgl. Kapitel 3.5

Betrachtet man die Ausscheidung der Salzstangengruppe nach Probanden getrennt, ergibt sich das in Abbildung 4.2-14 dargestellte Bild. Es sind unterschiedliche Exkretionsverläufe erkennbar. Die Probanden 3 und 9 zeigen eine auf die Tage 5 bis 7 verteilte Erhöhung der Pyrrolingehalte. Proband 10 zeigt am Tag 5 eine Abnahme der im Urin messbaren Gehalte. An den anderen Studientagen zeigt sich ein den übrigen Teilnehmern ähnliches Exkretionsmuster. Der am Tag 5 gemessene Wert wurde daher für die durchgeführten Berechnungen nicht berücksichtigt.

Teilnehmer 16 weist nur am Tag 5 einen höheren Wert auf. Für alle Probanden erreicht die Exkretion am Tag 8 wieder ein Grundlevel und steigt am Tag 9 mit Wiederaufnahme der gewohnten Ernährung wieder an.

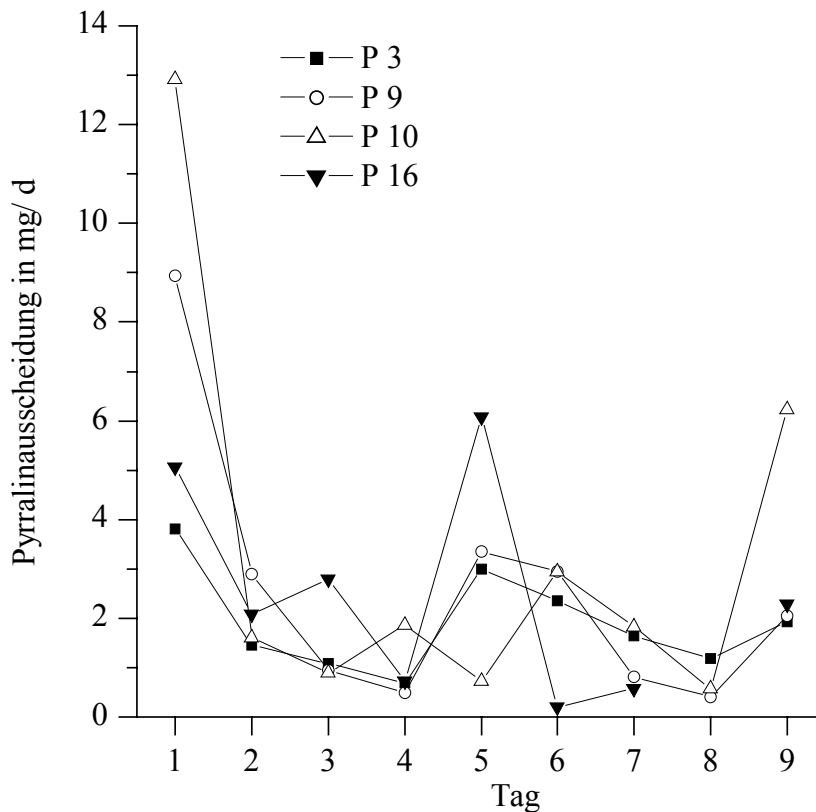


Abbildung 4.2-14: Renale Ausscheidung von freiem Pyrrolin in mg/ d; Probanden P 3, P 9, P 10 und P 16 der „Salzstangengruppe“

Ursache für die unterschiedlichen Ausscheidungsmuster ist möglicherweise der Zeitraum über den die Salzstangen gegessen wurden. Ein zügiger Verzehr könnte zu einer konzentrierten Ausscheidung führen, während bei Verteilung der Mahlzeit auf mehrere Portionen sich auch die Exkretion über einen größeren Zeitraum erstrecken könnte.

Trotz der unterschiedlichen Exkretionsmuster werden in der Summe ähnliche Mengen ausgeschieden. Bezieht man die jeweiligen Ausscheidungen der Tage 5 und 6 auf den Wert am Tag 4 ergeben sich die in Tabelle 4.2-2 dargestellten individuellen „Mehrausscheidungen“ und die auf den Verzehr von 8,4 mg bezogenen Wiederfindungen zwischen 58 % und 67 %. Diese Daten stellen Mindestwerte für Verdau und Resorption proteingebundenen Pyrrolins und Maximalwerte für die renale Exkretion des unmodifizierten Derivates dar.

Im Vergleich zum Amadori-Produkt (Wiederfindung < 3 %) ist das Pyrrolderivat demnach wesentlich besser resorbierbar und wird zu einem Großteil als intaktes Molekül über die Niere ausgeschieden.



Tabelle 4.2-2: Exkretionen von freiem Pyrralin; Probanden 3, 9 und 16; Tage 4 bis 7; Werte in Klammern gebe die jeweilige Differenz zum Tag 4 an

	Proband 3	Proband 9	Proband 16
Tag 4 [mg]	0,7	0,5	0,7
Tag 5 [mg]	3,0 (2,3)	3,4 (2,9)	6,1 (5,4)
Tag 6 [mg]	2,4 (1,7)	3,0 (2,5)	0,2
Tag 7 [mg]	1,6 (0,9)	0,8 (0,3)	0,6
Summe der Differenzen zum Tag 4	4,9 mg	5,7 mg	5,4 mg
Wiederfindung bezogen auf 8,4 mg	58 %	67 %	64 %

Über den Verbleib der übrigen ca. 35 % kann hier keine Aussage getroffen werden. Nicht ausgeschlossen werden kann die Metabolisierung des Pyrrols mit anschließender Exkretion der hier nicht erfassten Metaboliten, sowie eine Akkumulation oder die Teilnahme am Reaktionsgeschehen *in vivo*. Entsprechende Mechanismen sind jedoch bislang nicht bekannt.

#### 4.2.7.3 Pentosidin

Die Pentosidinzufuhr am Tag 5 betrug über die Salzstangen 257 µg, über den Pudding 5 µg und über den Kaffee 12 µg. Im Falle der Salzstangen und des Kaffees waren davon 2 µg (< 1 %) bzw. 9 µg (75 %) als freies Derivat im Lebensmittel enthalten. Im Pudding war dieses nicht nachweisbar. Die Ausscheidung des ungebundenen Quervernetzungsproduktes im Studienverlauf ist in Abbildung 4.2-15 dargestellt. Wie für Pyrralin beobachtet, unterscheiden sich die Exkretionsmuster von Pudding- und Kontrollgruppe nicht. Die Werte der Puddinggruppe unterschreiten die der Kontrollgruppe sogar. Offenbar ist auch hier die verzehrte Menge an Derivat zu gering um einen sichtbaren Effekt auf die Exkretion auszuüben. Die deutlichste Steigerung der Ausscheidungsmengen im Vergleich zum durchschnittlichen Basislevel nach MRP-freier Diät ist infolge des Kaffeekonsums zu erkennen. Während die mittlere Pentosidinexkretion ohne Zufuhr von Maillard-Produkten wie unter 4.2.6 bestimmt bei  $4,1 \pm 2,0$  µg/ d liegt, steigt sie für die Probanden der Kaffeegruppe auf  $10,1 \pm 3,0$  µg/ d am Tag 5 an und hält dieses Level am Tag 6 mit  $10,2 \pm 4,0$  µg/ d. An den folgenden Tagen liegen die gemessenen Gehalte mit  $4,9 \pm 1,8$  µg/ d und  $4,6 \pm 1,5$  µg/ d nur noch vergleichsweise gering über dem Grundlevel nach MRP-freier Diät. Aus der Summe der für die Tage 5 bis 7 ermittelten Differenzen zur Grundausscheidung ergibt sich eine Erhöhung der eliminierten Mengen um 13,4 µg, entsprechend einer Wiederfindung von 112 %.

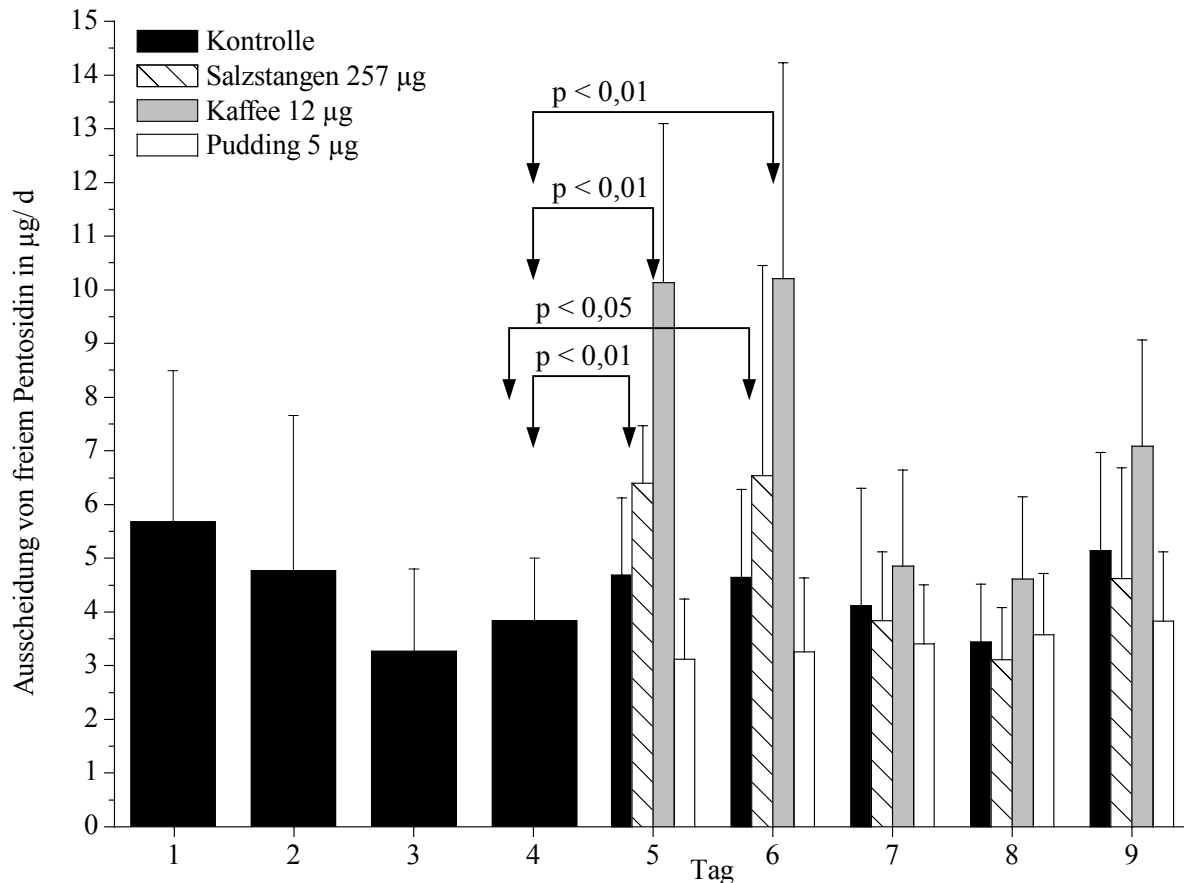


Abbildung 4.2-15: Renale Exkretion von freiem Pentosidin in  $\mu\text{g}/\text{d}$  im Verlauf der Ernährungsstudie; gesamtes Panel (Tage 1 bis 4:  $n = 18$ ; Tage 5 bis 9: Kontrolle,  $n = 5$ , Salzstangen,  $n = 4$ ; Kaffee,  $n = 4$ ; Pudding,  $n = 5$ ); Signifikanzniveaus berechnet über ungepaarten t-Test, vgl. Kapitel 3.5

Betrachtet man die Verläufe der Exkretion nach Probanden getrennt zeigt sich das in Abbildung 4.2-16 dargestellte Muster. Für Teilnehmer 17 (P17) zeigt sich zu Beginn der Studie an den Tagen 1 bis 4 eine extreme Steigerung der gemessenen Werte. Die für die Tage 3 und 4 bestimmten Gehalte wurden dabei als Ausreißer identifiziert und flossen nicht in die Berechnungen mit ein. Auch Teilnehmer 18 blieb für die Berechnung der Wiederfindung unberücksichtigt, da die Exkretionen an den Tagen 4, 6 und 7 unterhalb der Nachweisgrenze lagen, ein Bezugswert für die Exkretionssteigerung somit nicht ermittelt werden konnte. Die Probanden 4 und 7 zeigten das von der Pyrralinausscheidung nach Salzstangenverzehr bekannte Muster mit einer Abnahme der Exkretion in den ersten Tagen, einem deutlichen Anstieg nach Verzehr der Testmahlzeit und einem erneuten Absinken der Werte an den darauffolgenden Tagen. Die maximalen Werte werden dabei für Proband 7 unmittelbar am Tag des Kaffeekonsums gemessen.

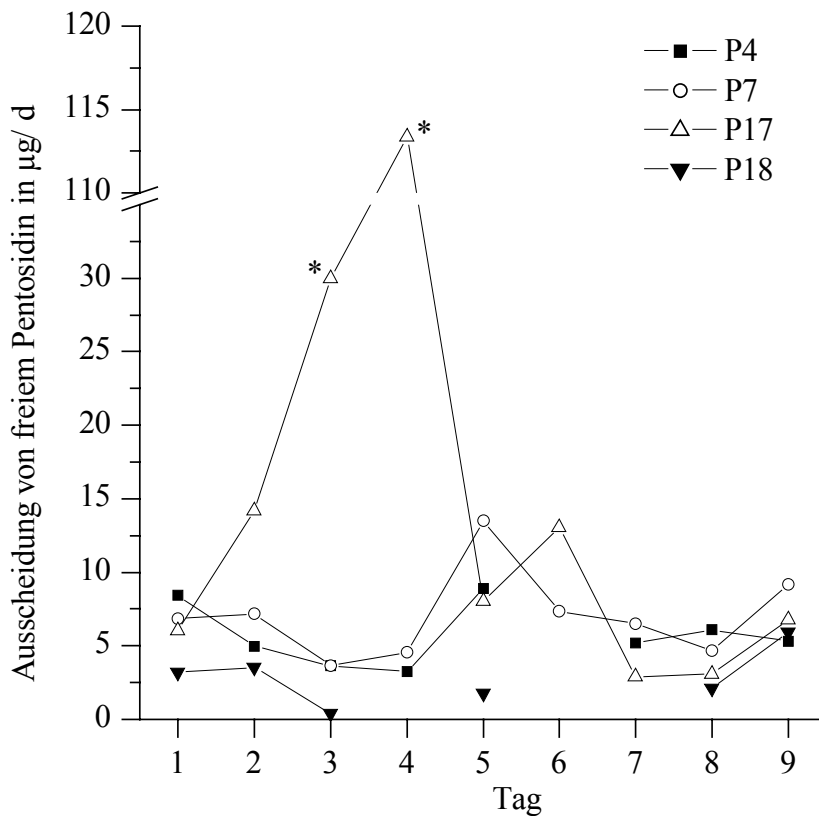


Abbildung 4.2-16: Pentosidinxkretion im Studienverlauf nach Probanden getrennt; „Kaffeegruppe“; \*: Ausreißer, getestet nach Dean und Dixon, vgl. Kapitel 3.5

Für Proband 4 kann keine Aussage über den Zeitpunkt der Hauptausscheidung getroffen werden, da keine Probe für den 6. Tag vorlag. Möglicherweise tritt diese aber erst am Tag 6 ein, wie es für Teilnehmer 17 zu beobachten ist, der am Tag 5 eine dem Teilnehmer 4 ähnliche Ausscheidung aufweist. Die individuellen Pentosidengehalte im Urin der Probanden 4, 7 und 17 an den Tagen 4 bis 7 sind in Tabelle 4.2-3 wiedergegeben.

Tabelle 4.2-3: Exkretionen von freiem Pentosidin; Kaffeegruppe: Probanden 4, 7 und 17; Tage 4 bis 7; Werte in Klammern geben die jeweilige Differenz zum Tag 4 an

	Proband 4	Proband 7	Proband 17
Tag 4 [µg]	3,3	4,6	4,1*
Tag 5 [µg]	8,9 (5,6)	13,5 (8,9)	8,0 (3,9)
Tag 6 [µg]	-	7,4 (2,8)	13,1 (9,0)
Tag 7 [µg]	5,2 (1,9)	6,5 (1,9)	2,9
Summe der Differenzen zum Tag 4	>7,5 µg	13,6 µg	12,9 µg
Wiederfindung bezogen auf 12 µg	>63 %	113 %	108 %

-: Probe lag nicht vor; \* unter 4.2.6 bestimmter Mittelwert aller Probanden am Tag 4

Aus den Differenzen der Ausscheidungen am Tag 5 zum jeweiligen Tag 4 ergeben sich Exkretionserhöhungen um 5,6 µg (P4), 8,9 µg (P7) und 3,9 µg (P17) am Tag des

Kaffeeverzehr. Für den Probanden 17 wurde zur Berechnung der Differenzen die mittlere Pentosidinexkretion des gesamten Panels am Tag 4 zugrunde gelegt.

Die Exkretionserhöhungen entsprechen Ausscheidungsraten von 47 %, 74 % und 33 % innerhalb von weniger als 24 h nach Verzehr des Kaffees. Bezogen auf das freie Derivat werden Ausscheidungsraten von 43 % bis 99 % erreicht. Unter Berücksichtigung der an den Tagen 6 und 7 gemessenen Werte ergeben sich die in Tabelle 4.2-3 dargestellten Gesamtexkretionsraten von 63 % (P4) bis 113 % (P7), wobei der untere Wert als zu niedrig angesehen werden kann, da hier eine mögliche „Mehrexkretion“ am Tag 6 wegen des fehlenden Messwertes unberücksichtigt blieb.

Die Auswirkung des Verzehrs von Salzstangen ist trotz der etwa um den Faktor 20 höheren Pentosidinzufuhr (257 µg) kleiner als nach der Kaffeeaufnahme (12 µg). Die Ausscheidung von freiem Pentosidin steigt vom Grundlevel ( $4,1 \pm 2,0$  µg/ d) auf  $6,4 \pm 1,1$  µg/ d am Tag 5 an und hält diesen Wert mit  $6,5 \pm 3,9$  µg/ d auch am Tag 6. An den darauffolgenden Tagen sinkt die Ausscheidung über  $3,8 \pm 1,3$  µg/ d am Tag 7 auf  $3,1 \pm 1,0$  µg/ d am Tag 8 ab. Am letzten Tag der Studie steigt die Exkretion mit Wiederaufnahme der uneingeschränkten Ernährung wieder auf  $4,6 \pm 2,1$  µg/ d an. Dies entspricht einer „Mehrexkretion“ von 4,7 µg, bzw. 2 %, bezogen auf den Verzehr an den Tagen 5 und 6. Deutlicher wird dies bei Betrachtung der Exkretionsverläufe der einzelnen Probanden (siehe Abbildung 4.2-17).

Gut zu erkennen sind die Exkretionszunahmen für alle Probanden mit einem Maximum am Tag 5 oder 6 und das Wiederabsinken an den darauffolgenden Tagen. Im Vergleich zur jeweiligen Exkretion am Tag 4 ergeben sich die in Tabelle 4.2-4 dargestellten Werte. Als Bezugswert für Proband 10 wurde der Mittelwert aller Probanden angenommen, da der tatsächlich ermittelte Wert unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Tabelle 4.2-4: Exkretionen von freiem Pentosidin; Salzstangengruppe: Probanden 3, 9, 10 und 16; Tage 4 bis 7; Werte in Klammern gebe die jeweilige Differenz zum Tag 4 an

	Proband 3	Proband 9	Proband 10	Proband 16
Tag 4 [µg]	3,9	5,4	4,1*	2,4
Tag 5 [µg]	6,1 (2,2)	7,1 (1,7)	5,0 (0,9)	7,3 (4,9)
Tag 6 [µg]	4,7 (0,8)	12,0 (6,6)	6,4 (2,3)	3,1 (0,7)
Tag 7 [µg]	4,0 (0,1)	5,5 (0,1)	3,5	2,4
Summe der Differenzen zum Tag 4	3,1 µg	8,4 µg	3,2 µg	5,6 µg
Wiederfindung bezogen auf 257 µg	1 %	3 %	1 %	2 %

\* unter 4.2.6 ermittelter Mittelwert aller Probanden am Tag 4

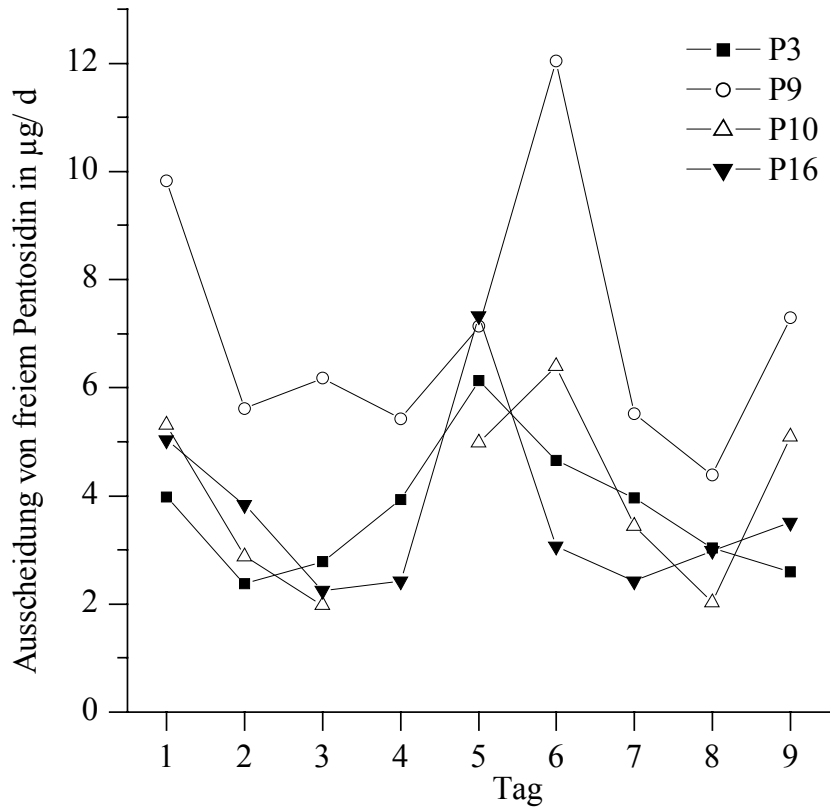


Abbildung 4.2-17: Pentosidinoxkretion im Studienverlauf nach Probanden getrennt; „Salzstangengruppe“

Die Wiederfindungen der verzehrten Mengen im Urin liegen zwischen 1 % und 3 %, die Absolutwerte zwischen 3 µg und 8 µg. Damit sind nicht nur die Wiederfindung um ein Vielfaches kleiner als für die Kaffeegruppe beobachtet (< 63 %), sondern auch die Absolutwerte (Kaffeegruppe: > 7,5 µg). Ursache für die höhere Wiederfindung nach Kaffeekonsum im Vergleich zum Verzehr von Salzstangen kann zum einen der höhere Anteil an freiem Pentosidin im Kaffee (9 µg entsprechend 75 % im Kaffee vs. 2 µg entsprechend 1 % in den Salzstangen) aber auch eine bessere Auswaschung der Verbindungen durch den diuretischen Effekt von Kaffee sein. Dies wäre mit einer höheren Wasserausscheidung und damit einhergehend mit einem größeren Gesamturinvolumen verbunden. In Tabelle 4.2-5 dargestellten sind die Urinvolumina der Probanden von Kaffee- und Kontrollgruppe über den Studienzeitraum. Beim Vergleich der Tage 4 und 5 zeigt sich, dass die am Tag des Kaffeekonsums gemessenen Volumina zwar für drei von vier Probanden der Kaffeegruppe um 0,4 bis 2,3 l steigen, ähnliche Schwankungen aber in der gleichen Gruppe auch unabhängig vom Kaffeeverzehr (P 18: + 1,9 l von Tag 1 auf 2) und in der Kontrollgruppe auftreten (P 14: + 1,5 l von Tag 3 auf 4; P 2: + 3,0 l von Tag 1 auf Tag 2).

Tabelle 4.2-5: Urinausscheidung der Probanden in ml; Kaffee- und Kontrollgruppe

	Tag Proband	1	2	3	4	5 Testmahlzeit	6	7	8	9
Kontrollgruppe	1	1550	2540	2280	2510	1450	2160	2090	2930	1070
	2	1450	4640	2040	2390	2510	2120	2130	2290	1400
	6	3460	3420	3600	2400	2250	3300	2520	2800	2220
	13	2610	1990	2180	2780	1920	3090	2760	2000	1830
	14	2810	3780	3190	4730	2820	2500	2620	3190	1700
Kaffeegruppe	4	1940	1950	2320	2680	2520	1170	1300	2850	1770
	7	5290	6510	4030	4300	6580	5870	4880	5180	4770
	17	3000	3660	2580	2510	2920	3140	2760	2620	1790
	18	1310	3210	2440	1680	2350	1590	1570	1760	990

Ein Rückschluss auf eine erhöhte Pentosidinausscheidung aufgrund einer durch den Kaffee hervorgerufenen Diurese ist auf Basis der vorliegenden Daten somit nicht möglich. Hinweise könnten Versuche mit entkoffeiniertem Kaffee geben, da das Koffein die eigentliche diuretisch wirksame Substanz im Getränk ist.

Für eine leichtere Resorbierbarkeit der freien Verbindung sprechen aktuelle Untersuchungen, nach denen mit dem in dieser Arbeit angewandten enzymatischen Hydrolysesystem, bestehend aus verschiedenen Endo- und Exopeptidasen, nur ca. 15 % des proteingebundenen Pentosidins freigesetzt werden (*Henle, 2005, persönliche Mitteilung*).

Im Gegensatz zu der hier beobachteten nahezu vollständigen Eliminierung des über den Kaffee aufgenommenen unmodifizierten Pentosidins über den Harn stehen Untersuchungen von *Miyata et al. (1998)*. Nach intravenöser Applikation des freien isotope-markierten Derivates bei gesunden Mäusen konnten die Autoren nach 72 h nur 17 % des Pentosidins als intakte Verbindung im Urin nachweisen. Weitere 63 % der Strahlung wurden als nicht näher charakterisierte Metaboliten renal ausgeschieden. Immunohistochemisch wiesen die Autoren eine schnelle Anreicherung des Quervernetzungsproduktes im proximalen Tubulus der Niere nach, die nach 24 h wieder abgebaut war. Offenbar verfügen Ratten über einen Mechanismus zur Modifizierung von Pentosidin nach glomerulärer Filtration und Reabsorption. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten nicht auf das Vorhandensein eines solchen Mechanismus im menschlichen Organismus hin. Es konnte vielmehr eine kontinuierliche Ausscheidung des intakten freien Derivates auch ohne Zufuhr durch die Nahrung nachgewiesen werden.

4.2.7.4 N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin

Die Zufuhr von CML am Tag 5 betrug über die Salzstangen 23,0 mg, über den Pudding 2,3 mg und über den Kaffee 0,03 mg. Die Ausscheidung der freien Carboxymethylaminosäure im Studienverlauf ist in Abbildung 4.2-18 dargestellt.

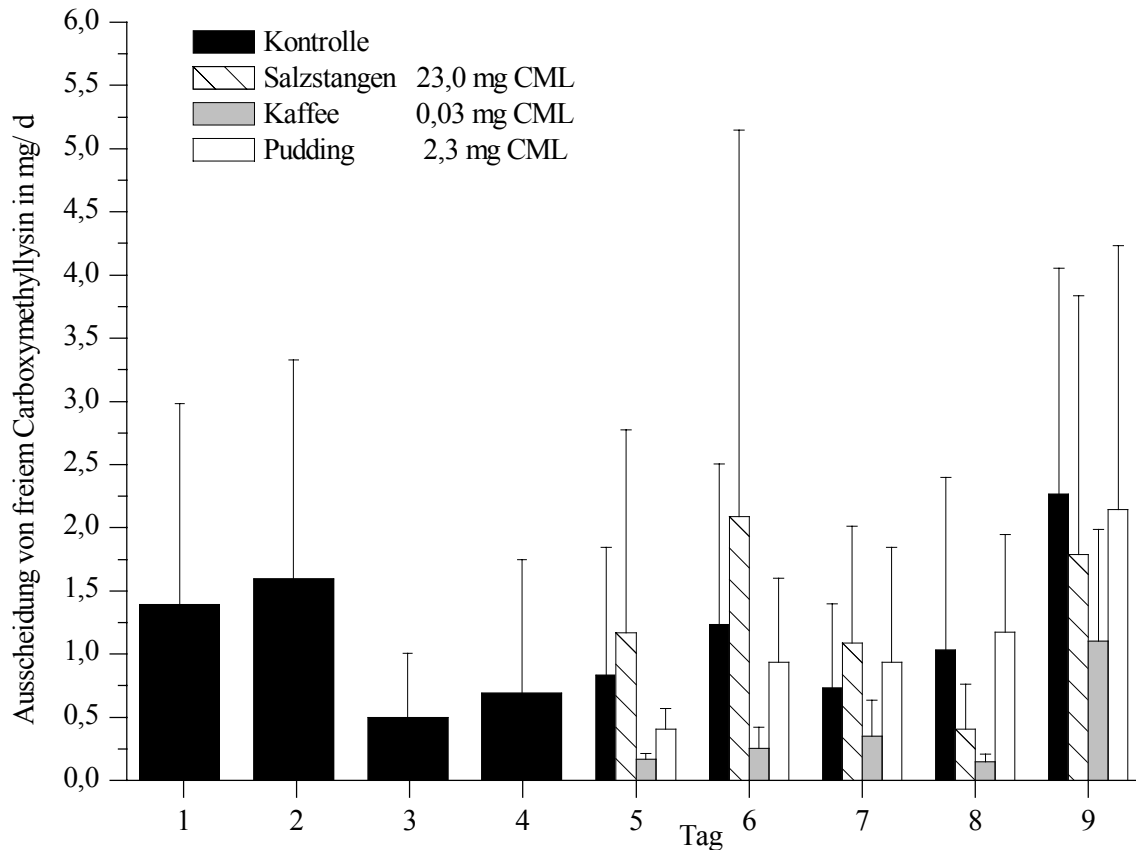


Abbildung 4.2-18: Renale Exkretion von freiem N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin in mg/ d im Verlauf der Ernährungsstudie; gesamtes Panel (Tage 1 bis 4: n = 18; Tage 5 bis 9: Kontrolle, n = 5, Salzstangen, n = 4; Kaffee, n = 4; Pudding, n = 5)

Die Werte der Kaffeegruppe bleiben nach der Testmahlzeit über die gesamte Studiendauer sowohl unterhalb der für das gesamte Panel am Tag 4 bestimmten  $0,7 \pm 1,1$  mg/ d als auch unter den jeweiligen Gehalten der Kontrollgruppe an den folgenden Tagen. Der Verzehr von 600 ml Kaffee hat somit entsprechend der geringen Zufuhr von nur 30  $\mu$ g im Vergleich zu einer Grundausscheidung von  $1,0 \pm 1,3$  mg/ d (vgl. Kapitel 4.2.6) keine Auswirkung auf die freien CML-Gehalte im Urin. Der Mittelwert der Puddinggruppe steigt zwar am Tag nach der Testmahlzeit von  $0,4 \pm 0,2$  mg/ g am Tag 5 auf  $0,9 \pm 0,7$  mg/ d am Tag 6 an und hält dieses Level mit  $0,9 \pm 0,9$  mg/ d am Tag 7 und  $1,2 \pm 0,8$  mg/ d am Tag 8, die Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe (Tag 5:  $0,8 \pm 1,0$  mg/ d; Tag 6:  $1,2 \pm 1,3$  mg/ d; Tag 7:  $0,7 \pm 0,7$  mg/ d; Tag 8:  $1,0 \pm 1,4$  mg/ d). Lediglich die Salzstangengruppe

weist gegenüber der Kontrollgruppe gesteigerte Exkretionen an den Tagen 5 bis 7 auf (Tag 5:  $1,2 \pm 1,6$  mg/ d; Tag 6:  $2,1 \pm 3,1$  mg/ d; Tag 7:  $1,1 \pm 0,9$  mg/ d). Diese sind allerdings auch hier laut t-Test nicht signifikant ( $p > 0,01$ ; vgl. Kapitel 3.5).

Auch aus der Betrachtung der Entwicklung der Ausscheidung einzelner Teilnehmer der Salzstangengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wird deutlich, dass die Steigerung der Exkretion nicht auf den Verzehr des Lebensmittels zurück geführt werden kann (vgl. Abbildung 4.2-19).

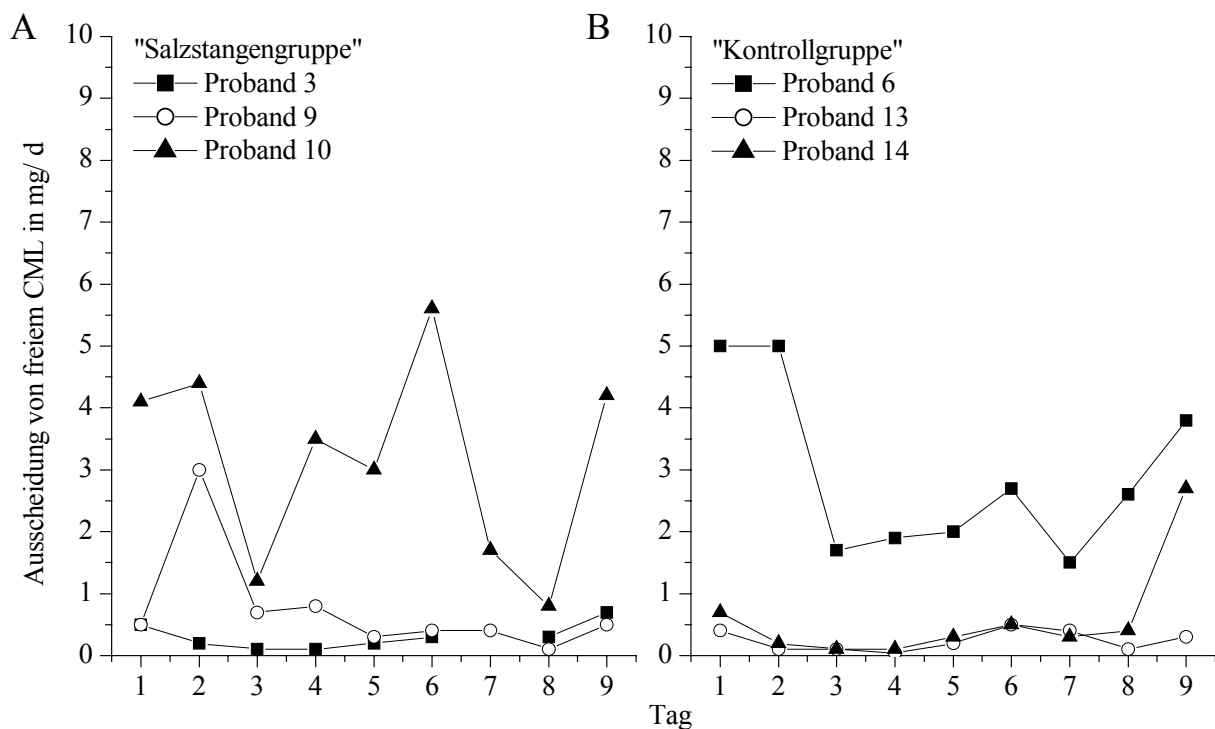


Abbildung 4.2-19: Renale Exkretion von freiem N<sup>6</sup>-Carboxymethyllysin in mg/ d im Verlauf der Ernährungsstudie; Darstellung einzelner Probanden; A: Salzstangengruppe (Probanden 3, 9 und 10); B: Kontrollgruppe (Probanden 6, 13 und 14)

Zwar nimmt die Exkretion für Proband 10 von Tag 5 ( $3,0$  mg/ d) bis Tag 6 ( $5,6$  mg/ d) zu, der Anstieg beginnt jedoch bereits am Tag 4 und damit noch vor dem Verzehr der Testmahlzeit. Hinzu kommt, dass für die anderen Teilnehmer der Salzstangengruppe keine Veränderung der im Urin messbaren Gehalte zu verzeichnen ist und dass auch Proband 6 der Kontrollgruppe eine Steigerung der Exkretion von Tag 5 ( $2,0$  mg/ d) auf Tag 6 ( $2,7$  mg/ d) aufweist.

Während in der vorliegenden Arbeit somit weder durch den Verzicht auf CML-haltige noch durch den Verzehr definierte Mengen des Lysinderivates eine Beeinflussung der im Urin messbaren Gehalte an freiem Carboxymethyllysin festgestellt werden konnte, beschrieben



*Liardon et al. (1987)* bei Ratten die Exkretion von 4 bis 19 % des über die Nahrung zugeführten Derivates. Dies entspräche im vorliegenden Fall einer Exkretionssteigerung von 0,9 mg bis 4,4 mg für die Salzstangengruppe und 0,1 mg bis 0,4 mg für die Puddinggruppe. Aufgrund der großen Standardabweichungen wäre ein Nachweis dieser „Mehrexkretion“ nur für die Salzstangengruppe zu erwarten. Als Ursache für die starken Abweichungen zwischen den einzelnen Probanden ist neben methodischen Aspekten auch die zum Teil erheblich differente körperliche Konstitution der Probanden zu berücksichtigen, wohingegen Versuchstiere eine homogenere Gruppe bilden.

#### 4.2.8 Physiologische Bedeutung alimentärer MRPs

Voraussetzung für die Teilnahme über die Nahrung aufgenommener, hauptsächlich proteingebundener Maillard-Reaktions-Produkte am Reaktionsgeschehen *in vivo* sind die Freisetzung aus dem Proteinverband, die Resorption der Aminosäurederivate und deren Verbleib im Körper.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, sind sowohl das Amadori-Produkt als frühes MRP, als auch Pyrralin, N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin und Pentosidin als Produkte der fortgeschrittenen Reaktion in humanem Urin nachweisbar. Somit müssen für alle vier untersuchten Lysinderivate Mechanismen zur renalen Eliminierung existieren. Der menschliche Körper ist demnach grundsätzlich in der Lage, sich dieser von *Koschinsky et al. (1997)* als „Glycotoxine“ eingeschätzten Verbindungen zu entledigen. Entscheidend für die Bedeutung aus der Nahrung stammender MRPs sind somit deren Resorption und die Effektivität der Ausscheidung. Beim Vergleich der definierten Zufuhr mit der Exkretion über den Harn zeigten sich zum Teil große Unterschiede zwischen den einzelnen Derivaten. Während für Pyrralin und freies Pentosidin ein Großteil der zugeführten Mengen nach Verzehr über den Urin ausgeschieden wurde (58 % bis 67 % des Pyrralins und ca. 100 % des Pentosidins), zeigten sich für proteingebundenes Pentosidin und das Amadori-Produkt deutlich niedrigere Wiederfindungen von weniger als 3 % (vgl. Kapitel 4.2.7). Der Verzehr von CML-haltigen Lebensmitteln zeigte keinen Effekt auf die im Urin messbaren Gehalte. Individuelle Maillard-Reaktions-Produkte weisen demnach unterschiedliche Resorptions- und/ oder Eliminationsraten auf. Von besonderem Interesse bezüglich der Diskussion um mögliche pathophysiologische Eigenschaften von AGEs ist in diesem Zusammenhang der metabolische Transit von Amadori-Produkt und Carboxymethyllysin, die in großem Umfang

in Lebensmitteln enthalten sind, aber nur zu einem sehr geringen Teil über den Urin ausgeschieden werden. Unter der Maßgabe einer vollständigen Resorption stünden diese Derivate, wie auch im Lebensmittel proteingebundenes Pentosidin, nahezu vollständig für mögliche pathophysiologische Mechanismen im Körper zur Verfügung. Literaturdaten aus den Arbeitsgruppen von Erbersdobler (*Erbersdobler et al., 1991 und 2001*) und Finot (*Finot et al., 1981*) deuten dagegen durch Untersuchungen am Beispiel des Amadori-Produkts auf eine nur geringe Resorbierbarkeit der Maillard-Produkte in Verbindung mit einer Verstoffwechslung durch die mikrobielle Darmflora im Intestinaltrakt hin (vgl. Kapitel 2.4.2.). Unter Berücksichtigung von Literaturdaten stellt sich der Verbleib der über die Nahrung aufgenommenen gebundenen Derivate wie im Folgenden diskutiert dar.

### 4.2.8.1 Amadori-Produkt

Daten zum metabolische Transit des Amadori-Produktes stammten zunächst vor allem aus Fütterungsstudien am Tiermodell. *Erbersdobler et al. (2001)* zeigten durch Fütterung von <sup>14</sup>C-makiertem, proteingebundenem Fructoselysin für 16 % des Derivates einen Abbau zu Kohlendioxid durch mikrobielle Aktivität im Dickdarm. Bei Inkubation der Darmflora von Ratten mit Fructoselysin *in vitro* lagen die Umsatzraten mit bis zu 80 % innerhalb von 48 Stunden noch deutlich höher (*Erbersdobler et al. 1970*). In weiteren Studien ermittelten die Autoren fäkale und renale Ausscheidungsraten des proteingebundenen Derivates von 1 bis 3 % bzw. 3 bis 10 % (*Erbersdobler et al., 2001*).

Untersuchungen zum metabolischen Transit von Amadori-Produkten im menschlichen Organismus zeigten ähnlich Exkretionsraten für die Ausscheidung über die Fäzes (ca. 1 %; *Lee et al., 1994*) und niedrigere Werte von weniger als 3 % für die renale Ausscheidung (*Erbersdobler et al., 1986 und 1989*). Ein Vergleich der für Tiermodell und Humanstudien publizierten Daten ist in Abbildung 4.2-20 dargestellt.

Die in der vorliegenden Studie ermittelte Wiederfindung von weniger als 1 % der verzehrten Mengen bestätigt die im Urin gemessenen Daten. Aussagen zum mikrobiellen Abbau des Amadori-Produktes im Intestinaltrakt sind in der Literatur nicht verfügbar. Eine eindeutige Aussage zur tatsächlich aufgenommenen Menge des Derivates kann daher nicht getroffen werden. Befunde aus dem Tiermodell, wonach die renalen Exkretionsrate bei Umgehung der proteolytischen Prozesse durch orale Applikation der freien Fructosylaminosäure mit ca. 60 %

deutlich höher liegen (*Finot und Magenat, 1981*) weisen auf effektive Resorptions- aber auch Eliminationsmechanismen hin.

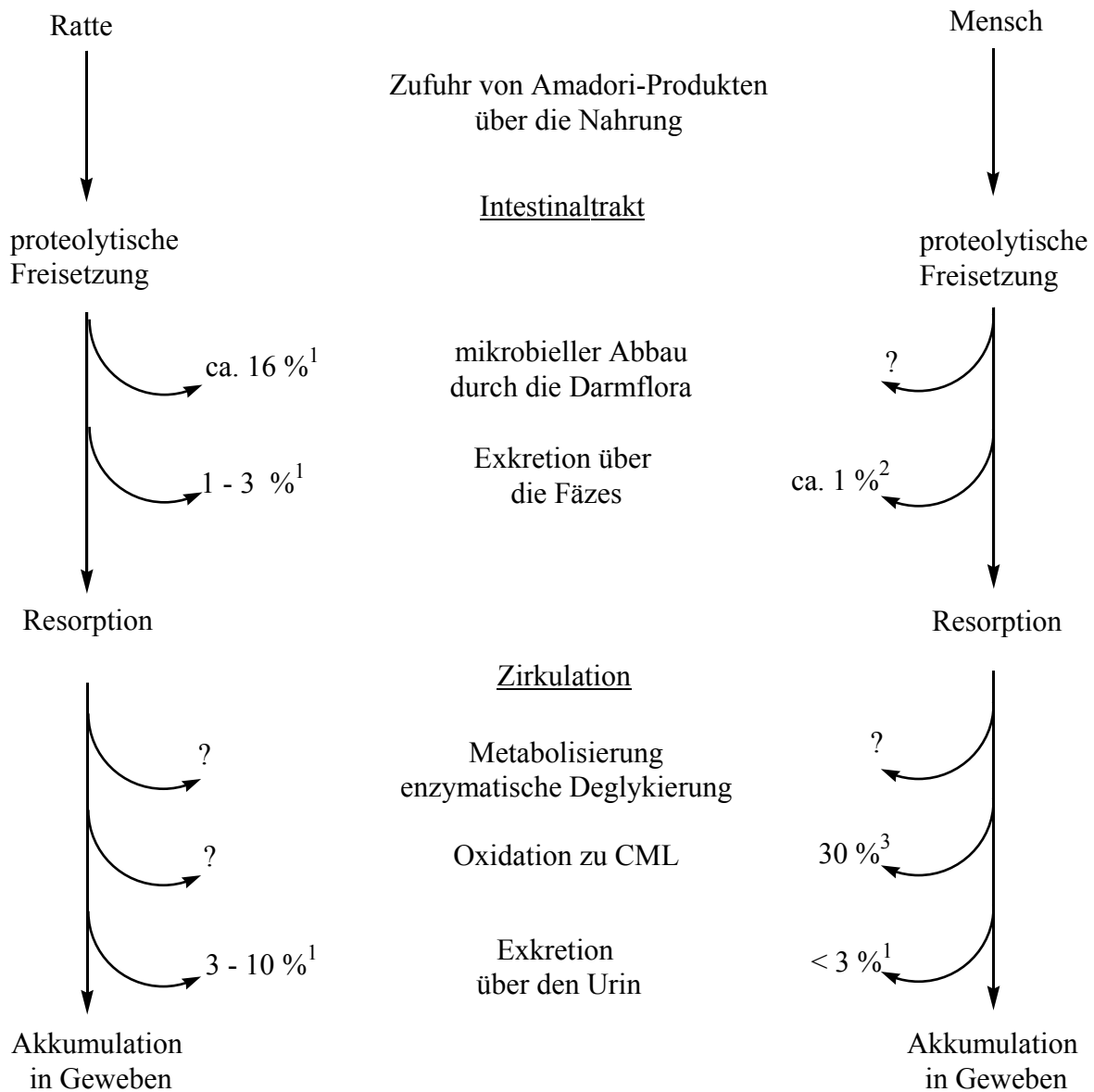


Abbildung 4.2-20: Schematische Darstellung der Metabolisierung von proteingebundenem Fructoselysin nach oraler Aufnahme; <sup>1</sup>*Erbersdobler et al. (2001)*; <sup>2</sup>*Lee et al., 1994*; <sup>3</sup>*Knecht et al. (1991)*

Entscheidend für die Verfügbarkeit des proteingebundenen Amadori-Produktes ist demnach die hydrolytische Freisetzung durch die im Darm vorhandene Enzymausstattung bzw. Darmflora. Die darauffolgende Resorption steht in Konkurrenz zur weiteren Metabolisierung durch intestinale Mikroorganismen. Für eine Nutzung von Maillard-Produkten als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sprechen neben den oben genannten Studien am Tiermodell

Befunde, die das Wachstum von humanen Darmkulturproben und isolierten Bakterienlinien auf entsprechenden Medien belegen (*Borelli et al. 2004 und 2005, Somoza, 2005b*).

Für einzelne Modellmelanoidine und definierte Derivate wie z.B. Pronyllysin wurden darüber hinaus präbiotische, wachstumsfördernde Effekte auf verschiedene gesundheitsfördernde Darmbakterien wie Bifidobakterien und Lactobazillen nachgewiesen, während pathogene Keime wie Clostridien im Wachstum gehemmt wurden (*Borelli et al., 2004 und 2005, Somoza, 2005a*). Als Bestandteile der in Mikroorganismen zur Verwertung von fructosylierten Aminosäuren vorhandenen Enzymausstattung wiesen *Horiuchi et al. (1989)* und *Takahashi et al. (1997a und b)* Fructosaminoxidasen (sogenannte Amadoriasen) in verschiedenen Bakterien und Pilzen nach. *Escherichia coli* verfügt daneben über ein aus einer Fructoselysin-6-Kinase und einer Fructoselysin-6-phosphat-Deglykase bestehendes System zur spezifischen Umsetzung von  $\epsilon$ -Fructoselysin, das die Nutzung der Fructosylaminosäure als alleinige Kohlenstoffquelle ermöglicht (*Wiame et al., 2002*). Möglicherweise stellt die Entwicklung solcher enzymatischer Mechanismen, die die Verwertung von typischen Produkten der thermischen Behandlung von Lebensmitteln erlauben, eine evolutionäre Anpassung der intestinalen Mikroflora an den Verzehr erhitzter Nahrung durch den Menschen dar. Dass die Umsetzung von Maillard-Produkten auch durch die Darmflora der Ratte möglich ist, steht diesem Gedanken nicht entgegen, da diese sich als Zivilisationsbegleiter häufig von Essensresten ernährt.

Die in Abbildung 4.2-20 dargestellten Daten verdeutlichen, dass der Verbleib von weniger als 5 % des über die Nahrung zugeführten Amadori-Produktes bislang belegt wurde. Neben dem bereits diskutierten Verlust durch mikrobiellen Abbau im Dickdarm ist eine Resorption wahrscheinlich und wird durch die Nachweisbarkeit des Derivates im Urin gestützt. Studien zum Transport zeigten kürzlich, dass dieser vorrangig, aber in insgesamt niedrigem Ausmaß, auf Diffusionsprozessen und nicht auf der Aktivität des Peptidtransporters PEPT1 oder Systemen zum Transport neutraler Aminosäuren beruht (*Grunwald et al., 2005*). Daten zum Fructoselysingehalt des Plasmas in Abhängigkeit von der Ernährung, die Aussagen über die Größenordnung der Resorption aus Lebensmitteln erlaubten sind in der Literatur leider nicht verfügbar. Auf eine weiterführende Metabolisierung in der Zirkulation, und damit die renale Exkretion übersteigende Resorptionsraten von  $> 3 \%$ , deuten Beobachtungen hin, die im Tierversuch Diskrepanzen zwischen den Werten aus Furosins- und Strahlungsmessungen im Urin nach Verfütterung entsprechend markierter Produkte beschreiben (*Erbersdobler et al.,*

2001). Die über das Artefakt der Säurehydrolyse ermittelten Daten waren um etwa ein Drittel niedriger als die Isotopenbestimmungen. Ein mögliches Derivat stellt CML dar, dessen Bildung aus Fructoselysin unter physiologischen Bedingungen *in vitro* von Zyzak *et al.* (1995) beschrieben wurde. Knecht *et al.* (1991) beobachteten eine Korrelation zwischen den im Urin messbaren Gehalten an CML und Fructoselysin und schätzten die entsprechende Umwandlung auf 30 % ab. Eine solche Korrelation wurde im vorliegenden Fall nicht beobachtet. Dagegen spricht auch die unter physiologischen Bedingungen *in vitro* für das Amadori-Produkt bestimmte Halbwertszeit von rund 10 Tagen (Zyzak *et al.*, 1995). Die renale Exkretion sollte demnach kinetisch deutlich bevorzugt sein, da diese wie unter 4.2.6 gezeigt innerhalb von 48 h nach Verzehr größtenteils abgeschlossen ist. Der Übertrag der *in vitro* bestimmten Halbwertszeit ist allerdings nur bedingt möglich, da das Reaktionsmedium *in vivo* weit komplexer und reicher an möglichen Reaktionspartnern ist. Die Umwandlung von Fructoselysin in CML *in vivo* kann also nicht völlig ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit des Abbaus von Fructoselysin stellen enzymatische Mechanismen dar. Einen solchen enzymatischen Abbauweg über eine Phosphorylierung, gefolgt von einem spontanen Zerfall in anorganisches Phosphat, Lysin und 3-Desoxyglucosulose beschrieben Szwegold *et al.* (2001) und Delpierre *et al.* (2002). Die daran beteiligten Fructosamin-3-kinasen sind allerdings vor allem intrazellulär lokalisiert und damit für die zirkulierenden Anteile des Derivates von eher untergeordneter Bedeutung.

Wird Fructoselysin weder abgebaut noch eliminiert, so müsste dies durch kontinuierliche Zufuhr über die Nahrung im Laufe des Lebens zu einer Zunahme der im Körper messbaren Gehalte führen. So beziffern Dyer *et al.* (1993) die altersbedingte Zunahme an Fructoselysin im Bindegewebe auf 33 % innerhalb einer Altersspanne vom 20. bis zum 85. Lebensjahr. Allgemein wird die Zunahme der Glykierung von Geweben allerdings der endogenen Maillard-Reaktion zugeschrieben, die auch zu einer Anreicherung von Pentosidin und CML in langlebigen Proteinen *in vivo* führt.

Die Literaturdaten und die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen deuten damit auf eine nur geringe Resorption und proteolytische Freisetzung des Amadori-Produktes aus Lebensmitteln hin. Größere Bedeutung kommt offenbar der Umsetzung des Derivates durch die intestinale Mikroflora zu. Es verbleibt ein relativ geringer Anteil, der nach Resorption über die Nieren ausgeschieden wird. Eine Oxidation von Fructoselysin zu CML konnte auf

Basis der vorliegenden Daten zur ernährungsabhängigen Ausscheidung der beiden Derivate nicht belegt werden.

### 4.2.8.2 Pyrralin

Die in der vorliegenden Studie für alimentäres Pyrralin beobachtete Wiederfindung im Urin war mit 63 % weit größer als für das Amadori-Produkt ermittelt und beschrieben. In der Literatur sind bislang keine weiteren quantitativen Daten zur renalen oder fäkalen Exkretion des Pyrrolderivates verfügbar (vgl. Abbildung 4.2-21). Ebenso verhält es sich mit Aussagen zu Pyrraliningehalten in Serum und Plasma in Abhängigkeit von der Ernährung, die genauere Schlussfolgerungen zur Resorbierbarkeit der Verbindung zuließen, sowie zu einer möglichen Verstoffwechslung durch die Darmflora und zur Vollständigkeit der proteolytischen Freisetzung im Intestinaltrakt. Für eine Hydrolyse durch humane Verdauungsenzyme spricht, der grundsätzliche Einfluss alimentären, vorrangig proteingebundenen Pyrralins auf die im Urin messbaren Gehalte des freien Derivates. Von einer grundsätzlichen Verdaubarkeit des Pyrrols im Intestinaltrakt kann somit ausgegangen werden, wenn auch die Frage der Vollständigkeit offen bleibt.

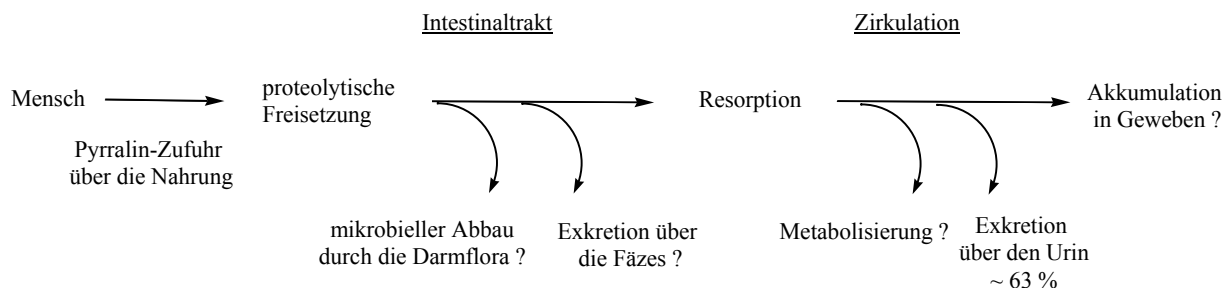


Abbildung 4.2-21: Schematische Darstellung der Metabolisierung von proteingebundenem Pyrralin nach oraler Aufnahme; quantitative Angaben entsprechen den Studienergebnissen.

Als mögliche Metabolisierungsreaktionen stehen derzeit nur die Quervernetzung des Pyrrols über die Aldehyd- oder Hydroxylfunktion in der Diskussion. Eine ernährungsbedingte Steigerung der zirkulierenden Pyrraliningehalte *in vivo* wurde noch nicht beobachtet. Vor allem die Erfassung der Plasmagehalte wäre hilfreich für die Beurteilung des tatsächlichen Potentials von ernährungsbedingtem Pyrralin zur Beeinflussung des *in vivo* Geschehens. Aus den vorliegenden Daten geht allerdings hervor, dass zumindest ein Großteil des alimentären Pyrrols offenbar kaum für die Teilnahme an pathophysiologischen Prozessen zur Verfügung steht, sondern unmetabolisiert über die Niere ausgeschieden wird.

## 4.2.8.3 Pentosidin

Bei der Untersuchung der renalen Exkretion von Pentosidin zeigten sich große Unterschiede bezüglich des freien und proteingebundenen Quervernetzungsproduktes. Während das freie Derivat offenbar annähernd vollständig resorbiert und über den Urin eliminiert wurde, konnten für das gebundene Derivat nur 2 % der konsumierten Menge im Harn wiedergefunden werden. Für die anderen untersuchten Derivate wurde diese Differenzierung nicht vorgenommen. In der Literatur werden aber auch für das Amadori-Produkt deutlich höhere Wiederfindungsraten nach Verzehr des freien im Vergleich zum gebundenen Derivat beschrieben (*Finot et al., 1981*). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die proteolytische Freisetzung im Intestinaltrakt von entscheidender Bedeutung für den Einfluss alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte auf das Reaktionsgeschehen *in vivo* ist.

Die Bilanzierung des über die Nahrung zugeführten Pentosidins ist in Abbildung 4.2-22 dargestellt.

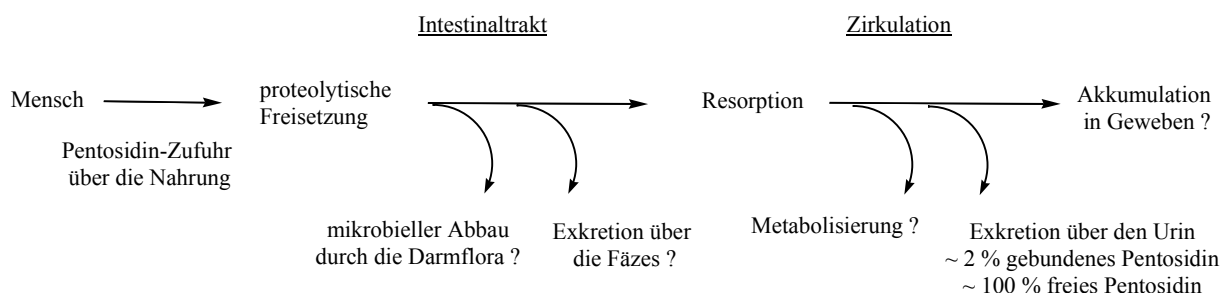


Abbildung 4.2-22: Schematische Darstellung der Metabolisierung von freiem und proteingebundenem Pentosidin nach oraler Aufnahme; quantitative Angaben entsprechen den Studienergebnissen.

Wie schon für Pyrralin diskutiert ist das Ausmaß der fäkalen Pentosidinausscheidung unbekannt. Auch zu einem möglichen mikrobiellen Abbau der Verbindung existieren keine Angaben. Jüngste Untersuchungen deuten auf eine unvollständige enzymatische Freisetzung des Derivates aus dem Proteinverband hin. Metabolisierungsreaktionen im Körper beschrieben *Miyata et al. (1989)* für Ratten. Demnach verfügen diese Tiere über einen renalen Mechanismus zur Reabsorption und Katabolisierung der freien Verbindung. Darüber hinaus konnten die Autoren trotz intravenöser Applikation des isopenmarkierten Derivates einen Teil der Strahlung als Kohlendioxid und in den Fäzes nachweisen. Dies spricht für eine teilweise Verstoffwechslung durch die Leber. Ca. 10 % fanden sie 72 h nach Injektion im Kadaver der Tiere wieder.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten enthalten keine Hinweise auf solche Stoffwechselwege, da das freie Derivat vollständig als intakte Verbindung über den Urin eliminiert wurde.

### 4.2.8.4 N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin

Für CML zeigte sich kein Einfluss der Ernährung auf die renale Exkretion. Die Carboxymethylaminosäure wird demnach entweder kaum resorbiert oder ausschließlich nach Metabolisierung über die Niere eliminiert. Literaturdaten deuten auch hier auf die Resorption als Schlüsselprozess hin. *Bergmann et al. (2001)* beobachteten in PET-Studien nach intravenöser Gabe des [<sup>18</sup>F]-Fluorbenzoyl-Derivates von CML an Ratten eine schnelle renale Ausscheidung von über 90 % der Verbindung. Eine dauerhafte Anreicherung in den Geweben fand nicht statt. Mit der Einschränkung der Vergleichbarkeit der isotopenmarkierten Verbindung mit dem unmarkierten Derivat wird CML demzufolge nach Eintritt in den Systemkreislauf grundsätzlich leicht über die Nieren eliminiert. Als entscheidend für die geringen im Urin nachweisbaren Mengen kann daher zum jetzigen Zeitpunkt eine niedrige Resorptionsrate angesehen werden. Eine Veränderung der über die Nahrung zugeführten Menge wirkt sich dementsprechend wenig auf die renale Exkretion aus. Ähnlich niedrige Wiederfindungen für die alimentäre Carboxymethylaminosäure publizierten *Ahmed et al. (2005)* nach Fütterung CML-haltiger Nahrung an Ratten. Lediglich 2 % der applizierten Dosis waren innerhalb von 24 h im Urin nachweisbar.

Gegen die Theorie einer sehr geringen Resorption sprechen Befunde von *Uribarri et al. (2001)*, die eine Korrelation von CML-Verzehr und mit den Plasmalevels von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion fanden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die quantitativen Daten auf Basis eines ELISA-Tests gewonnen wurden, es damit möglicherweise zu Überschätzungen der Gehalte durch Kreuzreaktivitäten mit anderen aus Lebensmitteln aufgenommenen Verbindungen kommen könnte. Hinzu kommt, dass sich eine Verschlechterung der Nierentätigkeit auch auf die Ausscheidung und damit die Plasmagehalte von ebenfalls über die Nahrung aufgenommenen Prekursoren auswirken kann, womit die Möglichkeit der endogenen Bildung von CML und anderen Maillard-Reaktions-Produkten bestünde.

Auf die Bedeutung der AGE-Bildung *in vivo* verweisen auch Untersuchungen von *Sebekova et al. (2001)* und *Krajcovicova et al. (2002)*, die erhöhte CML-Plasmagehalte bei Vegetariern



im Vergleich zu gesunden Personen auf deren gesteigerten Verzehr an Obst und Honig und der daraus resultierenden Zufuhr von Fructose als reaktiven Prekursor für die Maillard-Reaktion *in vivo* zurückführen.

4.2.8.5 Vergleich der untersuchten alimentären MRPs bezüglich ihrer physiologischen Bedeutung

Entscheidend für die physiologische Relevanz alimentärer MRPs ist deren Verfügbarkeit *in vivo*. Abbildung 4.2-23 gibt eine vergleichende Darstellung zum metabolischen Transit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Derivate wieder.

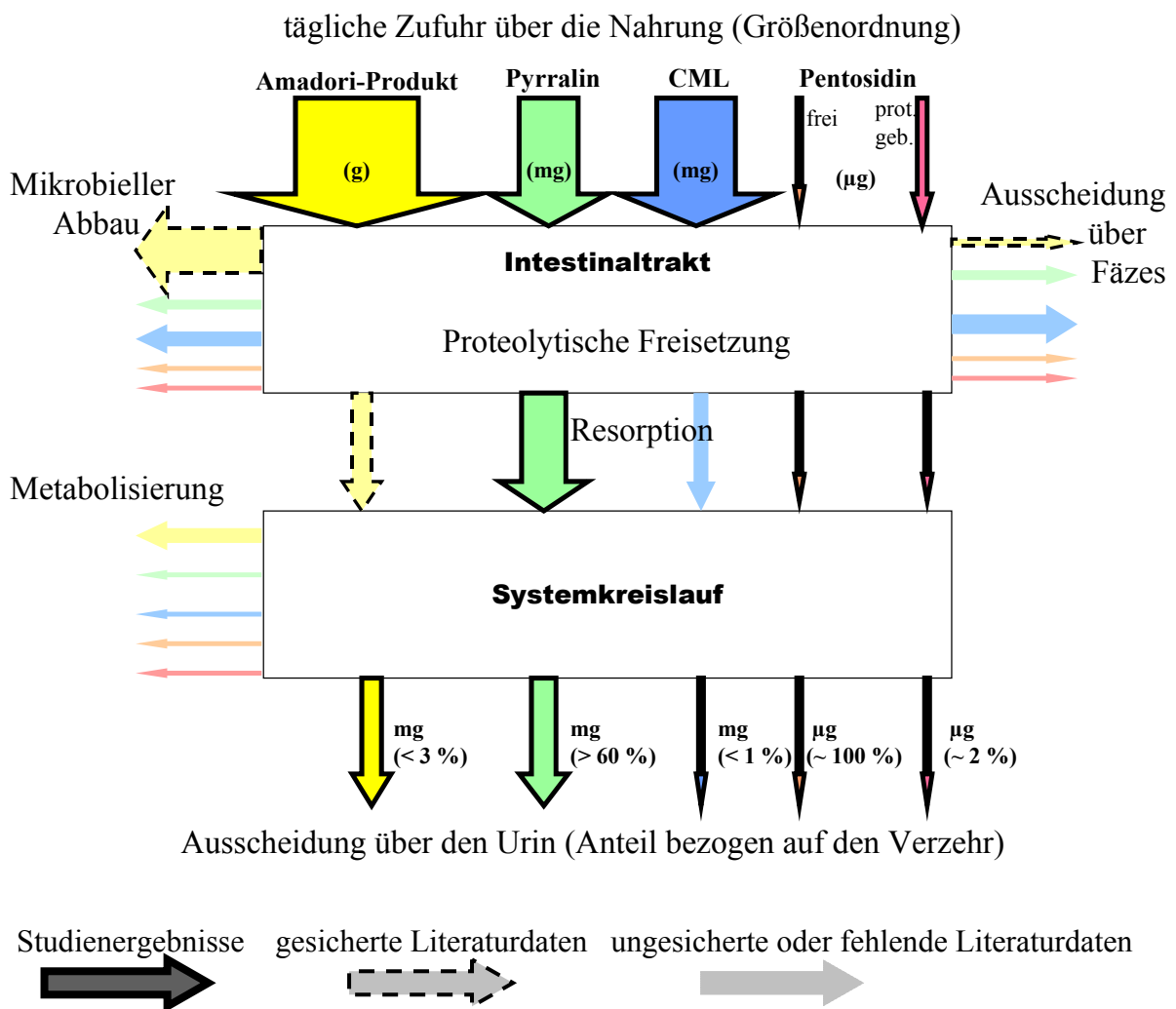


Abbildung 4.2-23: Schematische Übersicht über den metabolischen Transit von alimentärem Amadori-Produkt, Pyrralin, CML und Pentosidin auf Grundlage der aktuellen Studienergebnisse und Literaturdaten; Prot. geb.: proteingebunden

Der Vergleich der ernährungsbedingten Zufuhr der Derivate zeigt, dass das Amadori-Produkt mit einer Zufuhr von mehreren Gramm pro Tag in erheblich größeren Mengen verzehrt wird als die anderen untersuchten Maillard-Reaktions-Produkte. Die tägliche Aufnahme von Pyrralin und CML liegt dagegen im mg-Bereich, wobei CML in weit größerem Maße in der Nahrung enthalten ist als das Pyrrolderivat. Deutlich geringere Mengen im  $\mu\text{g}$ -Maßstab werden täglich vom Quervernetzungsprodukt Pentosidin verzehrt. Im Gegensatz zu dieser Wichtung bei der Zufuhr stehen die über die Nieren ausgeschiedenen Mengen. Es zeigt sich, dass die im Urin messbaren Gehalte von Amadori-Produkt, Pyrralin und CML trotz der großen Unterschiede im Verzehr für alle drei Derivate im Bereich weniger Milligramm liegt. Während dies für Pyrralin näherungsweise der Aufnahme entspricht, ergeben sich für CML und vor allem das Amadori-Produkt bemerkenswerte Differenzen.

Gesicherte Daten zur Erklärung dieser Diskrepanz liegen nur für das Amadori-Produkt vor, das nach wissenschaftlicher Ansicht zum einen in erheblichem Umfang einem mikrobiellen Abbau im Dünndarm unterliegt und darüber hinaus zu einem geringen Anteil von ca. 1 % über die Fäzes ausgeschieden wird. Eine Metabolisierung des Lysinderivates zum Beispiel zu CML oder 3-Desoxyglucosulose bzw. 3-Desoxyfructosulose wird zwar von einigen Autoren vorgeschlagen, der tatsächliche Nachweis eines solchen Abbaus der aus der Nahrung stammenden Verbindung im Systemkreislauf steht jedoch noch aus. Zu berücksichtigen sind im Hinblick auf Metabolisierungsreaktionen im Organismus auch kinetische Aspekte. So steht dem Abbau von Fructoselysin zu CML mit einer Halbwertszeit des Amadori-Produktes von ca. 10 Tagen unter physiologischen Bedingungen *in vitro* (Zyzak *et al.* 1995) die Ausscheidung des ernährungsbedingten Derivates innerhalb von 48 h gegenüber.

Ähnliche Erklärungsansätze bieten sich auch in Bezug auf den metabolischen Transit alimentären Carboxymethyllysins an, wobei hier weder Daten zum mikrobiellen Abbau, noch zur Ausscheidung über die Fäzes oder mögliche Metabolisierungsreaktionen *in vivo* vorliegen. Da wie für das Amadori-Produkt gezeigt werden konnte, dass weder die Carboxymethylaminosäure als solche, noch deren Hippurylderivat, als Modell für die peptidgebundene Verbindung, aktiv über den Peptidtransporter PEPT 1 oder den Transporter für neutrale Aminosäuren resorbiert werden (Grunwaldt *et al.*, 2005), stellt eine niedrige diffusionsbedingte Resorptionsrate eine mögliche Erklärung für die niedrige Ausscheidungsrate über den Urin dar. Darauf deuten auch Studien an Ratten hin, die offenbar über Mechanismen zur Eliminierung von  $\text{N}^{\epsilon}$ -Carboxymethyllysins verfügen (Bergmann *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu CML und Amadori-Produkt konnte im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen für Pyrralin gezeigt werden, dass ein Großteil des mit der Nahrung aufgenommenen Derivates sowohl resorbiert als auch unmetabolisiert über die Nieren ausgeschieden wird. Die relativ große Menge des im Urin nachweisbaren intakten Derivates deutet darauf hin, dass Pyrralin nicht am Reaktionsgeschehen *in vivo* teilnimmt und damit scheinbar inert ist. Um dies mit Sicherheit behaupten zu können, fehlt allerdings der Nachweis, dass die resorbierte der ausgeschiedenen Menge entspricht, die Elimination also vollständig ist. Da in der Literatur bisher weder Aussagen zur fäkalen Exkretion noch zu einem mikrobiellen Abbau oder Metabolisierungsreaktionen im Systemkreislauf existieren lassen sich hierzu keine weiteren Aussagen treffen.

Im Gegensatz zum metabolischen Transit der diskutierten Lysinderivate ist für die physiologische Relevanz alimentären Pentosidins weder das Ausmaß der Resorption noch der Exkretion entscheidend. Ausschlaggebend ist vielmehr die proteolytische Freisetzung der Crosslink-Aminosäure aus dem Proteinverband. Während das in freier Form verzehrte Derivat nahezu vollständig über den Urin ausgeschieden und demnach ebenso effektiv resorbiert wurde, zeigten sich für das proteingebundene Quervernetzungsprodukt nur Wiederfindungen von ca. 2 %. Metabolisierungsreaktionen beschrieben *Miyata et al. (1995)* für Ratten, bei denen rund 15 % des freien, intravenös applizierten Pentosidins als intaktes Aminosäurederivat und ca. 65 % in Form von Stoffwechselprodukten über den Urin ausgeschieden wurden. Die vorliegende Studie enthält aufgrund der vollständigen Ausscheidung des freien, intakten Pentosidins keine Hinweise auf die Existenz solcher Mechanismen im menschlichen Organismus.

Für die physiologische Relevanz der betrachteten Lysinderivate sind demnach unterschiedliche Prozesse entscheidend. Während das proteingebundene Amadori-Produkt, Pyrralin und Carboxymethyllysin zwar hydrolytisch aus dem Proteinverband freigesetzt werden, sich aber deutlich in Bezug auf ihre Resorbierbarkeit unterscheiden, scheint für Pentosidin bereits die Proteolyse der limitierende Faktor zu sein. Diese Inhomogenität bezüglich des metabolischen Transits der in der Literatur meist als Gruppe behandelten Maillard-Reaktions-Produkte oder AGEs zeigt eindeutig die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung und Beurteilung des möglichen pathophysiologischen Potentials individueller Verbindungen. In Hinblick auf das breite Spektrum *in vitro* nachgewiesener Maillard-Reaktions-Produkten und der in Kapitel 4.1.7 aufgezeigten nur unvollständig

erklärbaren Lysinderivatisierung in Milchprodukten ist auch die weitere Aufklärung der Reaktionsmechanismen in Lebensmitteln weiterhin von Interesse. Nicht auszuschließen ist die Existenz bislang in der Nahrung nicht berücksichtigter Komponenten mit hohem pathophysiologischen Potential. Eine abschließende Beurteilung ist letztlich erst mit genauerer Kenntnis des Maillard-Produktspektrum in Lebensmitteln und des jeweiligen metabolischen Transits dieser Verbindungen möglich. Hierzu sind weitere, ergänzende Studien in Lebensmitteln und zu proteolytischer Freisetzung, Resorption, Abbau, renaler und fäkaler Elimination definierter Verbindungen im humanen Organismus notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der Bildung von Maillard-Reaktions-Produkten (MRPs) *in vivo* und der Diskussion möglicher pathophysiologischer Konsequenzen bei Erkrankungen wie Arteriosklerose und Diabetes mellitus stellt sich die Frage bezüglich der Relevanz der täglichen Nahrung als Quelle von MRPs. Zur Klärung dieser Problematik ist es notwendig zu wissen, in welchem Umfang MRPs in Lebensmitteln gebildet werden und in welchem Ausmaß mit weiteren bislang unbekanntem Derivaten zu rechnen ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Lysinderivate der Maillard-Reaktion in Milch und Milchprodukten quantitativ zu erfassen und der messbaren Lysinmodifikation gegenüber zu stellen. So sollten Aussagen zur Bedeutung bekannter individueller Verbindungen getroffen und das Ausmaß der Bildung noch unbekannter Strukturen abgeschätzt werden. Zur Beurteilung der ernährungsphysiologischen Relevanz über die Nahrung zugeführter MRPs sind darüber hinaus deren Verfügbarkeit und Resorbierbarkeit im Intestinaltrakt, sowie Geschwindigkeit und Effektivität der Elimination aus dem Körper von Interesse. Daher sollten anhand der renalen Exkretion definierter Lysinderivate in Abhängigkeit von deren nahrungsbedingter Zufuhr Aussagen zum metabolischen Transit dieser Verbindungen getroffen werden.

1. Lysin, N<sup>ε</sup>-Desoxylactulosyl-1-lysin (N<sup>ε</sup>-Lactoselysin), 2-Amino-6-(2-Formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-hexansäure (Pyrralin), N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML), Glyoxal-Lysin-Dimer (GOLD), Methylglyoxal-Lysin-Dimer (MOLD) und N<sup>ε</sup>-(2-Amino-2-carboxyethyl)-lysin (Lysinoalanin, LAL) wurden in pasteurisierter, ultrahoch erhitzter und Kondensmilch sowie Milchpulver bestimmt. Ergänzend wurden im Trockenschrank erhitzte Proben von pasteurisierter Milch und Magermilchpulver untersucht. Für die Erfassung von Pyrralin wurde eine RP-HPLC-Methode basierend auf Vorarbeiten von *Bachmann (1994)* weiterentwickelt und bezüglich der Probenvorbereitung und Kalibration (enzymatische Hydrolyse, Matrixkalibration) optimiert. Die Bestimmung der übrigen Derivate erfolgte mit Hilfe im Arbeitskreis etablierter Verfahren (Aminosäureanalyse, GC-MS, RP-HPLC nach Säurehydrolyse).

2. Lactoselysin wurde in allen Proben als Hauptprodukt der Lysinderivatisierung identifiziert (80 µmol bis 26 mmol/ 100 g Protein). CML gewann mit zunehmender Erhitzungsdauer an Bedeutung (30 bis 240 µmol/ 100 g Protein). Die Gehalte von Pyrralin (4 bis 70 µmol/ 100 g Protein) waren in den untersuchten Produkten für die Lysinderivatisierung von

untergeordneter Bedeutung. Orientierende Untersuchungen in Backwaren und Kaffee deuten aber darauf hin, dass dem Pyrrolderivat in stärker erhitzten Lebensmitteln ein höherer Stellenwert zukommt (bis zu 670  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  Protein in Backwaren; ca. 300  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  Protein in Braumalz). GOLD und MOLD waren in den untersuchten Proben nicht nachweisbar. Gleiches gilt für LAL in den trockenen Proben, während es in den Milchen in vergleichbaren Mengen wie CML bestimmt werden konnten (46 bis 360  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  Protein). Mit den erfassten Derivaten konnten bei flüssigen Handelsproben etwa 40 bis 50 % und in einstündig bei 80 °C erhitzter pasteurisierter Milch nur noch etwa 15 % der Lysinderivatisierung erklärt werden. Es kommt demnach in erheblichem Maße zur Bildung weiterer bislang in Nahrungsmitteln nicht erfasster Derivate.

3. Ein bisher nur in Modellansätzen, nicht aber in Lebensmitteln bestimmtes Lysinderivat ist 2-Amino-6-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxo-4H-pyridin-1-yl)-hexansäure (Maltosin). Nach Synthese des Pyridonderivates als Referenzsubstanz wurde eine geeignete Bestimmungsmethode auf Basis einer flüssigchromatographischen Trennung an einer Polymer-Umkehrphase mit anschließender UV-Detektion bei 280 nm entwickelt. Die Untersuchung verschiedener Milchprodukte zeigte, dass Maltosin weder in mild noch in stärker thermisch prozessierten Handelsproben wie pasteurisierter und UHT-Milch oder Milchpulver nachweisbar war. Lediglich nach weiterer Erhitzung von handelsüblichem Milch- und Molkenpulver sowie von Kondensmilch für mehrere Stunden bei 100 °C konnte das Pyridonderivat in Mengen von 17 bis 94 mg/ 100 g Protein erfasst werden. Die unter gleichen Bedingungen gebildeten Pyrralinmengen übersteigen diese Werte mit bis zu 1800 mg/ 100 g Protein erheblich. Im Gegensatz zu Pyrralin ist die Bedeutung der Maltosinbildung offenbar auch in stärker erhitzten Lebensmitteln von untergeordneter Bedeutung.

4. Zur Untersuchung des metabolischen Transits definierter MRPs wurde eine neuntägige Ernährungsstudie durchgeführt, in deren Verlauf 18 freiwillige Probanden beginnend mit dem 2. Tag auf den Verzehr MRP-haltiger Lebensmittel verzichteten. Am 5. Tag wurden die Probanden in 4 Gruppen eingeteilt. Die Teilnehmer verzehrten Lebensmittel (Salzstangen, Schokoladenpudding oder Kaffee) deren MRP-Gehalte zuvor bestimmt worden waren. Die vierte Gruppe diente als Kontrollgruppe (MRP-freie Diät). Vom 6. bis 8. Tag ernährten sich alle Gruppen wieder MRP-frei. Am neunten Tag kehrte das gesamte Panel zur gewöhnlichen Ernährung zurück. Alle Teilnehmer sammelten über den kompletten Studienzeitraum ihren

24-h-Urin. Die Urinproben wurden hinsichtlich ihrer Gehalte an nicht protein-gebundenem Amadori-Produkt, Pyrralin, CML und Pentosidin untersucht. Alle Derivate waren im Urin nachweisbar. Die messbaren Gehalte lagen für das Amadori-Produkt bei  $5,4 \pm 4,1$  mg Fructoselysin/ d, für Pyrralin und CML bei  $4,0 \pm 2,4$  mg/ d bzw.  $1,6 \pm 1,5$  mg/ d und für Pentosidin eine Größenordnung darunter bei  $5,4 \pm 2,4$  µg/ d. Auffallend war, dass sich die Ausscheidung des Amadori-Produktes trotz der deutlich höheren Zufuhr über die Nahrung nicht im gleichen Maße von der Exkretion der anderen Derivate unterschied.

5. Der Verzicht auf MRP-haltige Nahrungsmittel führte innerhalb von 48 bis 72 h zu einem Absinken der im Urin messbaren Gehalte an Amadori-Produkt (AP), Pyrralin und Pentosidin auf ein Basislevel. Es zeigte sich, dass mehr als 85 % des AP, ca. 90 % des Pyrralins und 30 bis 40 % des Pentosidins im Urin aus alimentären Quellen stammen. Mit Wiederaufnahme der „gewöhnlichen“ Ernährung stiegen die Gehalte wieder deutlich an. AP, Pyrralin und Pentosidin werden demnach grundsätzlich aus der Nahrung resorbiert und über die Nieren eliminiert. Das Erreichen ernährungsunabhängiger Grundausscheidungslevels zeigt auch, dass insbesondere für Pentosidin weitere (endogene?) Quellen existieren müssen. Im Gegensatz zu Literaturberichten waren die im Urin messbaren CML-Gehalte durch die MRP-freie Diät nicht beeinflussbar, was auf eine geringe oder fehlende proteolytische Freisetzung und/oder schlechtere Resorbierbarkeit der Verbindung hindeutet.

6. Nach dem Verzehr definierter MRP-Mengen durch die einzelnen Teilnehmergruppen konnten nur weniger als 3 % des Amadori-Produktes, aber 60 bis 70 % des in der Nahrung enthaltenen Pyrralins innerhalb von 48 bis 72 h im Urin wiedergefunden werden. Für Pentosidin war aufgrund der verschiedenen Lebensmittel eine Unterscheidung zwischen proteingebundenem und freiem Derivat möglich. Die Beobachtung, dass die freie Crosslinkaminosäure nahezu vollständig über den Urin ausgeschieden wurde, während nur ca. 2 % des gebundenen Derivates nachweisbar waren, deutet auf eine mangelnde enzymatische Freisetzung des Quervernetzungsproduktes aus dem Proteinverband hin.

Die stark unterschiedlichen Wiederfindungen zeigen, dass MRPs keinen einheitlichen metabolischen Transit aufweisen. Während freies Pentosidin und proteingebundenes Pyrralin nahezu vollständig bzw. zum überwiegenden Teil über den Urin eliminiert werden, trifft dies nur auf einen geringen Prozentsatz des in Lebensmitteln enthaltenen proteingebundenen Pentosidins und des in Lebensmitteln als Hauptprodukt der Maillard-Reaktion auftretenden Amadori-Produktes zu. Eine Beurteilung des möglicherweise von der täglichen Ernährung

ausgehenden pathophysiologischen Potentials kann demnach nur nach Kenntnis der im Lebensmittel enthaltenen Derivate und deren individuellen metabolischen Transits erfolgen. Ausgehend von der vorliegenden Arbeit und der aktuellen Datenlage in der Literatur ist das von der Nahrung ausgehende Gefährdungspotential in dieser Hinsicht zunächst als gering anzusehen. Zu berücksichtigen ist dabei allerdings, dass ein bedeutender Teil der im Verlauf der Maillard-Reaktion gebildeten Produkte nach wie vor nicht bekannt ist und die ernährungsphysiologischen Konsequenzen damit nicht abschließend einzuschätzen sind.



## 6 Literatur

- Abe, R., Shimizu, T., Sugawara, H., Watanabe, H., Nakamura, H., Choei, H., Sasaki, N., Yamagishi, S.-I., Takeuchi, M., Shimizu, H. (2004). Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 461-467
- Aeschbacher, H.U. (1990). Anticarcinogenic effect of browning reaction products. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. (Hrsg.: Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F., Liardon, R.), Birkhäuser Verlag, Basel, 245-258
- Agalou, S., Ahmed, N., Dawnay, A., Thornalley, P.J. (2003). Removal of advanced glycation end products in clinical renal failure by peritoneal dialysis and haemodialysis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1394-1396
- Ahmed, M.U., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1986). Identification of N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 4889-4894
- Ahmed, M.U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1997). N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* **324**, 565-570
- Ahmed, N., Argirov, O., Minhas, H.S., Cordeiro, C.A.A., Thornally, P.J. (2002). Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine and N<sup>ε</sup>-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* **364**, 1-14
- Ahmed, N., Thornally, P.J. (2003). Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1417-1422
- Ahmed, N., Thornally, P.J., Lüthen, R., Häussinger, D., Sebekova, K., Schinzel, R., Voelker, W., Heidland, A. (2004). Processing of protein glycation, oxidation and nitrosation adducts in the liver and the effect of cirrhosis. *J. Hepatol.* **41**, 913-919

- Ahmed, N. Mirshekar-Syahkal, B., Kennish, L., Karachalias, N., Babaei-Jaididi, R., Thornalley, P.J. (2005). Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 691-699
- Ames, J.M., Wynne, A., Hofmann, A., Plos, S., Gibson, G.R. (1999). The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vivo. *Br. J. Nutr.* **82**, 489-495
- Aso, Y., Takanashi, K., Sekine, K., Yoshida, N., Takebayashi, K., Yoshihara, K., Inukai, T. (2004). Dissociation between urinary pyrroline and pentosidine concentrations in diabetic patients with advanced nephropathy. *J. Lab. Clin. Med.* **144**, 92-99
- Bachmann, A. (1994). Proteingebundenes Pyrralin – Synthese, Analytik und Bildungsstudien. Diplomarbeit, Technische Universität München-Weihenstephan
- Baynes, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-412
- Belitz, H.-D., Grosch, W. (1992). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage
- Bergmann, R., Helling, R., Heichert, C., Scheunemann, M., Mäding, P., Wittrisch, H., Johannsen, B., Henle, Th. (2001). Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine (CML) and N<sup>ε</sup>-carboxyethyllysine (CEL). *Nahrung/ Food* **45**, 182-188
- Biemel, K.M., Bühler, H.P., Reihl, O., Lederer, M.O. (2001). Identification and quantitative evaluation of the lysine-arginine crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and glucosepan in foods. *Nahrung/ Food* **45**, 210-214
- Biemel, K.M., Friedl, D.A., Lederer, M.O. (2002). Identification and quantification of major Maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. *J. Biol. Chem.* **28**, 24907-24915
- Borelli, R.C., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V. (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silverskin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1338-1343
- Borrelli, R.C., Fogliano, V. (2005). Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 673-678
- Brandt, A., Erbersdobler, H. (1973). Determination of furosine in foods and feeds. *Landwirtsch. Forsch., Sonderheft* **28/II**, 115-119

- Brinkmann, E., Wells-Knecht, K.J., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1995). Characterization of an imidazolium compound formed by the reaction of methylglyoxal and n-alpha-hippuryllysine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 2817-2818
- Brownlee, M., Vlassara, H., Cerami, A. (1980). Measurement of glycosylated amino acids and peptides from urine of diabetic patients using affinity chromatography. *Diabetes* **29**, 1044-1047
- Brownlee, M., Vlassara, H., Cerami, A. (1983). Nonenzymatic glycosylation reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin. *Diabetes* **32**, 680-684
- Büser, W., Erbersdobler, H.F., Liardon, R. (1986a). Identification and determination of N-ε-carboxymethyllysine by gas-liquid chromatography. *Chrom.* **19**, 114-118
- Büser, W., Erbersdobler, H.F. (1986b). Carboxymethyllysine, a new compound of heat damage in milk products. *Milchwiss.* **41**, 781-781
- Bunn, H.F., Haney, D.N., Gabbay, K.H., Gallop, P.M. (1975). Further identification of the nature and the linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **36**, 103-109
- Casetta, B., Romanello, M., Moro, L. (2000). A rapid and simple method for quantitation of urinary hydroxylysyl glycosides, indicators of collagen turnover, using liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 2238-2241
- Cerami, C., Founds, H., Nicholl, I., Mizushima, T., Giordano, D., Vanpatten, S., Lee, A., Al-Abed, Y., Vlassara, H., Bucala, R., Cerami, A. (1997). Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13915-13920
- Chellan, P., Nagaraj, R.H. (1999). Protein crosslinking by the Maillard reaction: Dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 98-104
- Chuyen, N.V., Utsunomiya, N., Hidaka, A., Kato, H. (1990). Antioxidative effect of Maillard reaction products in vivo. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. (Hrsg.: Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F., Liardon, R.), Birkhäuser Verlag, Basel, 285-290
- Chuyen, N.V., Arai, H., Nakanishi, T., Utsunomiya, N. (2005). Are food advanced glycation end products toxic in biological systems? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 467-473
- Clawin-Rädecker, I., Koehn, A., Schlimme, E. (1996). Furosin: Hitzeindikator in Milch und Frischkäse. *Dt. Milchwirtsch.* **47**, 902-905

- Cohen, M.P. (1986). Aldose reductase, glomerular metabolism, and diabetic nephropathy. *Metab., Clin. Exp.* **35**, 55-59
- Degenhardt, T., Grass, L., Reddy, S., Thorpe, S., Diamandis, E., Baynes, J. (1997). The serum concentration of the advanced glycation endproduct N epsilon-(carboxymethyl)-lysine is increased in uremia. *Kidney Int.* **52**, 1064-1067
- Doerffel, K. (1990). Statistik in der analytischen Chemie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 5. erweiterte und überarbeitete Auflage
- Dolhofer-Bliesener, R., Lechner, B., Deppisch, R., Ritz, E., Gerbitz, K.D. (1995). Immunological determination of advanced glycosylation end-products in human blood and urine. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10**, 657-664
- Drusch, S., Faist, V., Erbersdobler, H.F. (1999). Determination of N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.* **65**, 547-553
- Dunn, J.A., Patrick, J.S., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1989). Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochemistry* **28**, 9464-9468
- Dunn, J.A., Ahmed, M.U., Murtiashaw, M.H., Richardson, J.M., Walla, M.D., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1990). Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry* **29**, 10964-70
- Dunn, J.A., McCance, D.R., Thorpe, S.R., Lyons, T.J., Baynes, J.W. (1991). Age-dependent accumulation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine and N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* **30**, 1205-1210
- Dyer, D.G., Dunn, J.A., Thorpe, S.R., Bailie, K.E., Lyons, T.J., McCance, D.R., Baynes, J.W. (1993). Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* **91**, 2463-2469
- Dyer, D.G., Blachledge, J.A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1991). Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. *J. Biol. Chem.* **266**, 11654-11660
- Eble, A.S., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1983). Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J. Biol. Chem.* **258**, 9406-9412
- Erbersdobler, H.F., Gunsser, I., Weber, G. (1970). Degradation of fructoselysine by the intestinal flora. *Zentralblatt der Veterinär Mediziner* **A17**, 573-575

- Erbersdobler, H.F., Weber, G., Gunsser, I. (1972). Analytical and physiological characterisation of amino acid damage. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* **29**, 325-334
- Erbersdobler, H.F., Holstein, A.B. (1980). Untersuchungen über Vorkommen und Bildung von Lysinoalanin in Milchprodukten. *Milchwiss.* **35**, 734-737
- Erbersdobler, H.F., Brandt, A., Scharrer, E., von Wangenheim, B. (1981). Transport and metabolism studies with fructose amino acids. *Prog. Fd. Nutrition Sci.* **5**, 257-263
- Erbersdobler, H.F., Purwing, U., Bossen, M., Trautwein, E. (1986). Urinary excretion of fructoselysine in human volunteers and diabetic patients. *Dev. Food Sci.* **13**, 503-508
- Erbersdobler, H.F., Gross, A., Klusman, U., Schlecht, K. (1989). Absorption and metabolism of heated protein-carbohydrate mixtures in humans. In: *Absorption and Utilisation of amino acids*. (Hrsg.: Friedman, M.), CRC Press, Boca Raton, **Vol III**, 91-95
- Erbersdobler, H.F., Lohmann, M., Buhl, K. (1991). Utilization of early Maillard reaction products by humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* **289**, 363-370
- Erbersdobler, H.F., Faist, V. (2001). Metabolic transit of Amadori products. *Nahrung/Food* **45**, 177-181
- Finot, P.A. (1973). Nonenzymic browning. In: *Proteins in human Nutrition* (Hrsg.: Porter, J.W.G., Rolls, B.A.), Academic Press, London, 501-514
- Finot, P.A., Magnenat, E. (1981). Metabolic transit of early and advanced maillard products. *Prog. Fd. Nutrition Sci.* **5**, 193-207
- Friedlander, M., Wu, Y., Schulak, J., Monnier, V., Hricik, D. (1995). Influence of dialysis modality on plasma and tissue concentrations of pentosidine in patients with end stage renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **25**, 445-451
- Friedlander, M., Wu, Y., Elgawish, A., Monnier, V. (1996). Early and advanced glycosylation end products: Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J. Clin Invest.* **97**, 728-735
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: An overview. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 631-653
- Friess, U., Waldner, M., Wahl, H.-G., Lehmann, R., Haring, H.-U., Voelter, W., Schleicher, E. (2003). Liquid chromatography-based determination of urinary free and total N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine excretion in normal and diabetic subjects. *J. Chromatogr. B* **794**, 273-280
- Frischmann, M., Bidmon, C., Angerer, J., Pischetsrieder, M. (2005). Identification of DNA adducts of methylglyoxal. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1586-1592

- Fritsch, R.J., Klostermeyer, H. (1981). Bestandsaufnahme zum Vorkommen von Lysinalanin in milcheiweißhaltigen Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **172**, 440-445
- Fu, M.-X., Requena, J.R., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W., Thorpe, S.R. (1996). The Advanced glycation end product, N-(Carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **271**, 9982-9986
- Gerdemann, A., Lemke, H., Nothdurft, D., Heidland, A., Münch, G., Bahner, U., Schinzel, R. (2000). Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. *Clin. Nephrol.* **54**, 276-283
- Glomb, M.A., Monnier, V.M. (1995). Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **270**, 10017-10026
- Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B.S., Uribarri, J., Vlassara, H. (2004). Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **104**, 1287-1291
- Grandhee, S.K., Monnier, V.M. (1991). Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. *J. Biol. Chem.* **266**, 11649-11653
- Grunwald, S., Krause, R., Bruch, M., Henle, T., Brandsch, M. (2005). Transepithelial flux of early and advanced glycation compounds across Caco-2-cell monolayers and their interaction with intestinal amino acid and peptide transport systems. *Br. J. Nutr.* (in press)
- Gugliucci, A., Bendayan, M. (1996). Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): Evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* **39**, 149-160
- Hammond, A.C. (1995). Leucaena toxicosis and its control in ruminants. *J. Anim. Sci.* **73**, 1487-1492
- Hartkopf, J. (1993). N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin als Hitzeschädigungsindikator – Modelluntersuchungen zur Bildung in Lebensmitteln. Dissertation, CAU Kiel
- Hartkopf, J., Erbersdobler, H.F. (1994). Modelluntersuchungen zu Bedingungen der Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **198**, 15-19
- Hartkopf, J., Erbersdobler, H.F. (1995). Untersuchungen an Wurstbrätproben zur Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 27-29
- Hayase, F., Nagaraj, R.H., Miyata, S., Njoroge, G., Monnier, V.M. (1989). Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **263**, 3758-3764

- Hayase, F., Hirashima, S., Okamoto, G., Kato, H. (1990). Scavenging of active oxygens by melanoidin. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. (Hrsg.: Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F., Liardon, R.), Birkhäuser Verlag, Basel, 261-266
- Henle, T. (1991a). Studien über das reaktive Verhalten von Milchproteinen bei der Maillard-Reaktion. Dissertation, Technische Universität München-Weihenstephan
- Henle, T., Walter, H., Krause, I., Klostermeyer, H. (1991b). Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* **1**, 125-135
- Henle, T., Klostermeyer, H. (1993a). Determination of protein-bound 2-amino-6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid ("pyrraline") by ion exchange chromatography and photodiode array detection. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **196**, 1-4
- Henle, T., Walter, A.W., Klostermeyer, H. (1993b). Detection and identification of the cross-linking amino acids N<sup>ε</sup>- and N<sup>ε</sup>-(2-amino-2-carboxy-ethyl)-L-histidine ("histidinoalanine", HAL) in heated milk products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **197**, 114-117
- Henle, T., Walter, A.W., Klostermeyer, H. (1994). Simultaneous determination of protein-bound Maillard products by ion exchange chromatography and photodiode array detection. In: *Maillard reactions in chemistry, food and health* (Hrsg.: Labuza, T.P., Reineccius, G.A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 195-200
- Henle, T., Zehetner, G., Klostermeyer, H. (1995). Fast and sensitive determination of furosine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **200**, 235-237
- Henle, T., Bachmann, A. (1996). Synthesis of pyrraline reference material. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **202**, 72-74
- Henle, T., Schwarzenbolz, U., Klostermeyer, H. (1997). Detection and quantification of pentosidine in foods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **204**, 95-98
- Henle, T., Schwenger, V., Ritz, E. (2000). Preliminary studies on the renal handling of lactuloselysine from milk products. *Czech. J. Food Sci.* **18**, 101-102
- Henle, T. (2003). AGEs in foods: Do they play a role in uremia? *Kidney Int.* **63**, S145-S147
- Hodge, J.E. (1953). Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928-943
- Hodge, J.E., Nelson, E.C. (1961). Preparation and properties of galactosylisomaltol and isomaltol. *Cereal Chem.* **38**, 207-221

- Homma, S., Fujimaki, M. (1981). Growth response of rats fed a diet containing nondialyzable melanoidin. *Prog. Fd.Nutr. Sci.* **5**, 209-216
- Horiuchi, K., Shiga, M., Araki, N., Takata, K., Saitoh, M., Morino, Y. (1988). Evidence against in vivo presence of 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazol, a major fluorescent advanced end product generated by nonenzymatic glycosylation. *J. Biol. Chem.* **263**, 18821-18826
- Horiuchi, K., Takata, K., Araki, N., Morino, Y. (1990). Biological recognition of advanced end product of the Maillard reaction. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. (Hrsg.: Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrel, R.F., Liardon, R.), Birkhäuser Verlag, Basel, 454-455
- Horiuchi, T., Kurakawa, T., Saito, N., (1989). Purification and properties of fructosyl-amino acid oxidase from *Corynebacterium* sp. 2-4-1. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 103-110
- Horn, M.J., Lichtenstein, H., Womack, M. (1968). Availability of amino acids. A methionine-fructose compound and its availability to microorganisms and rats. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 741-741
- Iwashige, K., Kouda, K., Kouda, M., Horiuchi, K., Takahashi, M., Nagano, A., Tanaka, T., Takeuchi, H. (2004). Calorie restricted diet and urinary pentosidine in patients with rheumatoid arthritis. *J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.* **23**, 19-24
- Kasper, M., Schieberle, P. (2005). Labeling studies on the formation pathway of N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine in Maillard-type reactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 59-62
- Kato, H., van Chuyen, N., Shinoda, T., Sekiya, F., Hayase, F. (1990). Metabolism of 3-deoxyglucosone, an intermediate compound in the Maillard reaction, administered orally or intravenously to rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1035**, 71-76
- Knecht, K.J., Dunn, J.A., McFarland, K.F., McCance, D.R., Lyons, T.J., Thorpe, S., Baynes, J.W. (1991). Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* **40**, 190-196
- Knecht, K.J., Feather, M.S., Baynes, J.W. (1992). Detection of 3-deoxyfructose and 3-deoxyglucosone in human urine and plasma: evidence for intermediate stages of the Maillard reaction *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 130-137
- Knobloch, A. (1999). Furosin als Qualitätsparameter für Milch und Milchprodukte.  
Diplomarbeit, Technische Universität Dresden
- Kontoghiorghes, G.J., Evans, R.W. (1985). Site specificity of iron removal from transferrin by  $\alpha$ -ketohydroxypyridine. *FEBS Lett.* **189**, 141-144



- Koschinsky, T., He, C.-J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Heitmann, K., Vlassara, H. (1997). Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6474-6479
- Krajcovicova-Kudlackova, M., Sebekova, K., Schinzel, R., Klvanova, J. (2002). Advanced glycation end products and nutrition. *Physiol. Res.* **51**, 313-316
- Krause, R., Knoll, K., Henle, T. (2003). Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *Eur. J. Food Res. Technol.* **216**, 277-283
- Krause, R. (2005). Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen. Dissertation, Technische Universität Dresden
- Kroh, L. (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.* **51**, 373-379
- Lederer, M.O., Bühler, H.P. (1999a). Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from D-glucose. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1081-1088
- Lederer, M.O., Klaiber, R.G. (1999b). Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2499-2507
- Ledl, F., Schleicher, E. (1990). Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **102**, 597-734
- Ledl, F., Osiander, H., Pachmayr, O., Severin, T. (1989). Formation of maltosine, a product of the Maillard reaction with a pyridone structure. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **188**, 207-211
- Lee, A.T., Cerami, A. (1990). Nonenzymatic reaction of reducing sugars with DNA. In: *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*. (Hrsg.: Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F., Liardon, R.), Birkhäuser Verlag, Basel, 415-423
- Lee, K., Erbersdobler, H.F. (1994). Balance experiments on human volunteers with  $\epsilon$ -fructoselysine (FL) and lysinoalanine (LAL). In: *Maillard reactions in chemistry, food and health* (Hrsg.: Labuza, T.P., Reineccius, G.A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 358-363
- Liardon, R., de Weck-Gaudard, D., Philipposian, G., Finot, P.-A. (1987). Identification of N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine: A new Maillard reaction product in rat urine. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 427-431

- Lindenmeier, M., Faist, V., Hofmann, T. (2002). Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6997-7006
- Lingelbach, L.B., Mitchel, A.E., Rucker, R.B., McDonald, R.B. (2000). Accumulation of advanced glycation endproducts in aging male Fischer 344 rats during long-term feeding of various dietary carbohydrates. *J. Nutr.* **130**, 1247-1255
- Liu, Y.L., Liu, D.Z., Lu, S.L., Hider, R.C. (1999). Gradient ion-pair high-performance liquid chromatographic method for analysis of 3-hydroxypyridin-4-one iron chelators. *J. Chromatogr. B* **730**, 135-139
- Maillard, L.C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C.R. Acad. Sci. Ser. 2* **154**, 66-68
- Makita, Z., Vlassara, H., Cerami, A., Bucala, R. (1992). Immunochemical detection of advanced glycosylation end products *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5133-5138
- Makita, Z., Bucala, R., Rayfield, E.J., Freidman, E.A., Kaufman, A.M., Korbet, S.M., Barth, R.H., Winston, J.A., Fuh, H., Manogue, K.R., Cerami, A., Vlassara, H. (1994). Reactive glycosylation endproducts in diabetic uremia and treatment of renal failure. *Lancet* **343**, 1519-1522
- Malone, J.I., Knox, G., Benford, S., Tedesco, T.A. (1980). Red cell sorbitol. An indicator of diabetic control. *Diabetes* **29**, 861-864
- Marko, D., Habermeyer, M., Kemeny, M., Weyand, U., Niederberger, E., Frank, O., Hofmann, T. (2003). Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 48-55
- Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food: a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Fd. Nutr. Sci.* **5**, 5-35
- Mavric, E. (2006). Argininderivatisierung und 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln. Dissertation, Technische Universität Dresden
- McCance, D.R., Dyer, D.G., Dunn, J.A., Bailie, K.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Lyons, T.J. (1993). Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin Invest.* **91**, 2470-2478
- McPherson, J.D., Shilton, B.H., Walton, D.J. (1988). Role of fructose in glycation and cross-linking of proteins. *Biochemistry* **27**, 1901-1907

- Miller, R., Olsson, K., Pernemalm, P.A. (1985). Formation of aromatic compounds from carbohydrates. IX. Reaction of D-glucose and L-lysine in slightly acidic aqueous solution. *Acta Chem. Scand. B* **38**, 689-694
- Miyata, S., Liu, B.-F., Shoda, H., Ohara, T., Yamada, H., Suzuki, K., Kasuga, M. (1997). Accumulation of pyrrolidine-modified albumin in phagocytes due to reduced degradation by lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 4037-4042
- Miyata, T., Ueda, Y., Shinzato, T., Iida, Y., Tanaka, S., Kurokawa, K., van Ypersele de Strihou, C., Maeda, K. (1996a). Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 1198-1206
- Miyata, T., Taneda, S., Kawai, R., Ueda, Y., Horiuchi, S., Hara, M., Maeda, K., Monnier, V.M. (1996b). Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in  $\beta_2$ -microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 2353-2358
- Miyata, T., Ueda, Y., Horie, K., Nangaku, M., Tanaka, S., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K. (1998a). Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int.* **53**, 416-422
- Monnier, V.M., Sell, D.R., Nagaraj, R.H., Miyata, S., Grandhee, S., Odetti, P., Ibrahim, S.A. (1992). Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging and uremia. *Diabetes* **41**, 36-41
- Mori, B., Nakatsuji, H. (1977). Studies on the nutrition of browned protein. Part I. Utilization in rats of  $^{14}\text{C}$ -L-lysine-labeled casein browned by amino-carbonyl reaction. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 345-350
- Münch, G., Keis, R., Wessels, A., Riederer, P., Bahner, U., Schinzel, R. (1997). Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**, 669-677
- Nagai, R., Ikeda, K., Kawasaki, Y., Sano, H., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S., Horiuchi, S. (1998). Conversion of Amadori product of Maillard reaction to  $\text{N}^\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine in alkaline condition. *FEBS Lett.* **425**, 355-360
- Nagaraj, R.H., Portero-Otin, M., Monnier, V.M. (1996). Pyrrolidine ether crosslinks as a basis for protein crosslinking by the advanced Maillard reaction in aging and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**, 152-158

- Nagaraj, R.H., Shipanova, I.N., Faust, F.M. (1996). Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization and *in vivo* detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J. Biol. Chem.* **271**, 19338-19345
- Nakamura, K., Nakazawa, Y., Ienaga, K. (1997). Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: Vesperlysines A, B and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **232**, 227-230
- Nakayama, T., Hayase, F., Kato, H. (1980). Formation of  $\epsilon$ -(2-Formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)-L-norleucin in the Maillard reaction between D-glucose and L-lysine. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1201-1202
- Namiki, M., Hayashi, T., Ohta, Y. (1977). Novel free radicals formed by the amino-carbonyl reactions of sugars with amino acids, amines, and proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **86B**, 471-501
- Namiki, M., Hayashi, T. (1981). Formation of novel free radical products in an early stage of Maillard reaction. *Prog. Fd. Nutr. Sci.* **5**, 81-91
- Niederweiser, A., Giliberti, P., Matasovic, A. (1975). N $\epsilon$ -L-deoxyfructosyl-lysine in urine after ingestion of a lactose-free, glucose-containing milk formula. *Pediatr. Res.* **9**, 867-872
- Niwa, T. (1999). 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J. Chromatogr. B* **731**, 23-36
- Njoroge, F.G., Sayre, L.M., Monnier, V.M. (1987). Detection of D-Glucose-derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydr. Res.* **167**, 211-220
- Odani, H., Shinzato, T., Matsumoto, Y., Takai, I., Nakai, S., Miwa, M., Iwayama, N., Amano, I., Maeda, K. (1996). First evidence for accumulation of protein-bound and protein-free pyrroline in human uremic plasma by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **224**, 237-241
- Odani, H., Shinzato, T., Usami, J., Matsumoto, Y., Frye, E.B., Baynes, J.W., Maeda, K. (1998). Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett.* **427**, 381-385
- Odetti, P., Fogarty, J., Sell, D.R., Monnier, V.M. (1992). Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* **41**, 153-159

- Omura, H., Jahan, N., Shinohara, K., Murakami, H. (1983). Formation of mutagens by the Maillard reaction. In: *The Maillard reaction in foods and nutrition*. (Hrsg.: Waller, G.R., Feather, M.S.) *ACS Symp. Ser* **215**, 537-563
- Öste, R.E., Miller, R., Sjöström, H., Noren, O. (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 938-942
- Papanastasiou, P., Grass, L., Rodela, H., Patrikarea, A., Oreopoulos, D., Diamandis, E.P. (1994). Immunological quantification of advanced glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD. *Kidney Int.* **46**, 216-222
- Pickert, J. (2004). Untersuchungen zur Bindung kontaktallergener Substanzen an nukleophile Aminosäureseitenketten. Dissertation, Technische Universität Dresden
- Pischetsrieder, M., Seidel, W., Münch, G., Schinzel, R. (1999). N<sup>2</sup>-(1-Carboxyethyl)deoxyguanosine, a nonenzymatic glycation adduct of DNA, induces single-strand breaks and increases mutation frequencies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **264**, 544-549
- Pongor, S., Ulrich, P.C., Bencsath, F.A., Cerami, A. (1984). Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 2684-2688
- Portero-Otin, M., Nagaraj, R.H., Monnier, V.M. (1995). Chromatographic evidence for pyrrole formation during protein glycation *in vitro* and *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 74-80
- Portero-Otin, M., Pamplona, R., Bellmunt, M.J., Bergua, M., Prat, J. (1997a). Glycaemic control and *in vivo* non-oxidative Maillard reaction: urinary excretion of pyrrole in diabetes patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 767-773
- Portero-Otin, M., Pamplona, R., Bellmunt, M.J., Bergua, M., Nagaraj, R.H., Prat, J. (1997b). Urinary pyrrole as a biochemical marker of non-oxidative Maillard reactions *in vivo*. *Life Sci.* **60**, 280-287
- Powrie, W.D., Wu, C.H., Molund, V.P. (1986). Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environ. Health Perspect.* **67**, 47-54
- Rättich, S. (2004). Bestimmung von alpha-Dicarbonylen in Milchprodukten. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden.
- Rehner, G., Walter, T. (1991). Wirkung von Maillard-Produkten und Lysinalanin auf die Bioverfügbarkeit von Eisen, Kupfer und Zink. *Z. Ernährungswiss.* **30**, 50-55
- Resmini, P., Pellegrino, L., Batelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci.* **3**, 173-183

- Resmini, P., Pellegrino, L. (1992). Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *Int. Chrom. Lab.* **6**, 7-11
- Richter, S. (2001). Bestimmung von Carboxymethyllysin und anderen Aminosäurederivaten der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion mittels gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden
- Richter, T., Münch, G., Lüth, H.-J., Arendt, T., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., Fengler, D., Kuhla, B. (2005). Immunochemical crossreactivity of antibodies specific for „advanced glycation endproducts“ with „advanced lipoxidation endproducts“. *Neurobiol. Aging* **26**, 465-474
- Robins, S.P. (2003). Collagen turnover in bone diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **6**, 65-71
- RÖMPP Online, [www.roempp.com](http://www.roempp.com), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Version 2.8, 13. Update
- Ruttkat, A. (1996). Untersuchungen neuer Reaktionswege zur Bildung von Carboxymethyllysin und deren Eignung zur Qualitätsbeurteilung hitzegeschädigter Lebensmittel. Dissertation, CAU Kiel
- Sanaka, T., Funaki, T., Tanaka, T., Hoshi, S., Niwayama, J., Taitoh, T., Nishimura, H., Higuchi, C. (2001). Plasma pentosidine levels measured by a newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure. *Nephron* **91**, 64-73
- Sato, K., Inazu, A., Yamaguchi, S., Nakayama, T., Deyashiki, Y., Sawada, H., Hara, A. (1993). Monkey S-deoxyglucosone reductase: tissue distribution and purification of three multiple forms of the kidney enzyme that are identical with dihydrodiol dehydrogenase, aldehyde reductase, and aldose reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 286-294
- Schleicher, E.D., Wieland, O.H. (1981). Specific quantitation by HPLC of protein (lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **19**, 81-87
- Schleicher, E.D., Olgemöller, B., Schon, J., Durst, T., Wieland, O.H. (1985). Limited nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein does not alter its catabolism in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* **846**, 226-233
- Schleicher, E.D., Wagner, E., Nerlich, A.G. (1997). Increased accumulation of the glycoxidation product N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* **99**, 457-468

- Schneider, M., Thoss, G., Hübner-Parajsz, C., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., Pischetsrieder, M. (2004). Determination of glycated nucleobases in human urine by a new monoclonal antibody specific for N<sup>ε</sup>-Carboxyethyl-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1385-1390
- Schüßler, U., Ledl, F. (1989). Direct determination of 2-amino-6-(2-formyl-5-hydroxymethyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid in hydrolyzed protein by reversed-phase HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **189**, 32-35
- Schwarzer, E. (2005). Untersuchungen zur Bildung von Heyns-Produkten in Lebensmitteln. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden
- Schwedler, S.B., Metzger, T., Schinzel, R., Wanner, C. (2002). Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **62**, 301-310
- Sell, D.R., Monnier, V.M. (1989). Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **264**, 21597-21602
- Sell, D.R., Monnier, V.M. (2004). Conversion of arginine into ornithine by advanced glycation in senescent human collagen and lens crystallins. *J. Biol. Chem.* **279**, 54173-54184
- Sell, D.R., Monnier, V.M. (2005). Ornithine is a novel amino acid and a marker of arginine damage by oxoaldehydes in senescent proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 118-128
- Sengl, M. (1988). Identifizierung niedermolekularer, polarer Zuckelumwandlungsprodukte sowie Nachweis eines proteingebundenen Produkts aus der Spätphase der Maillard Reaktion. Dissertation, Universität München
- Sengl, M., Ledl, F., Severin, T. (1989). Maillard-Reaktion von Rinderserumalbumin mit Glucose Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographischer Nachweis des 2-formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrol-1-norleucins nach alkalischer Hydrolyse. *J. Chrom.* **463**, 119-125
- Sgarbieri, V.C., Amaya, J., Tanaka, M., Chichester, C.O. (1973). Nutritional consequences of the Maillard reaction. Aminoacid availability from fructose-leucine and fructose-tryptophan in the rat. *J. Nutr.* **103**, 657-663
- Siegl, T. (2003). Studien zur Quervernetzung von Milchproteinen und zur Bildung individueller Crosslink-Aminosäuren. Dissertation, Technische Universität Dresden
- Skovsted, I.C., Christensen, M., Breinholt, J., Mortensen, S.B. (1998). Characterisation of a novel AGE-compound derived from lysine and 3-deoxyglucosone. *Cell. Mol. Biol.* **44**, 1159-1163

- Smedsrod, B., Melkko, J., Araki, N., Sano, H., Horiuchi, S. (1997). Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem. J.* **322**, 567-573
- Somoza, V., Wenzel, E., Lindenmeier, M., Grothe, D., Erbersdobler, H.F., Hofmann, T. (2005a). Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8176-8182
- Somoza, V. (2005b). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 663-672
- Spacek, P., Hulejova, H., Adam, M. (1999). Some aspects of simultaneous determination of pyridinolines and desmosines as collagen and elastin resorption markers by means of reversed phase HPLC, utilizing fluorescence and/ or UV-absorption monitoring. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **22**, 823-842
- Stevens, V.J., Rouzer, C.A., Monnier, V.M., Cerami, A. (1978). Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 2918-2922
- Sturzbecher, M. (2005). Komplexbildungseigenschaften von lebensmittelchemisch relevanten 3-Hydroxy-4-pyridinonen. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden
- Sugiyama, S., Miyata, T., Ueda, Y., Tanaka, H., Maeda, K., Kawashima, S., van Ypersele de Strihou, C. (1998). Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: an advanced glycation end product. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1681-1688
- Svistounov, D., Smedsrod, B. (2004). Hepatic clearance of advanced glycation end products (AGEs) – myth or truth? *J. Hepatol.* **41**, 138-139
- Takahashi, M., Ohishi, T., Aoshima, H., Kawana, K., Kushida, K., Inoue, T., Horiuchi, K. (1993). The Maillard protein cross-link pentosidine in urine from diabetic patients. *Diabetologia* **36**, 664-667
- Takahashi, M., Lu, Y.B., Myint, T., Fujii, J., Wada, Y., Taniguchi, N. (1995). *In vivo* glycation of aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme: identification of glycation sites. *Biochemistry* **34**, 1433-1438
- Takahashi, M., Pischetsrieder, M., Monnier, V.M. (1997a). Isolation, purification, and characterization of amadoriase isoenzymes (fructosyl amine-oxygen oxidoreductase EC 1.5.3) from aspergillus sp.. *J. Biol. Chem.* **272**, 3437-3443



- Takahashi, M., Pischetsrieder, M., Monnier, V.M. (1997b). Molecular cloning and expression of Amadoriase Isoenzyme (Fructosyl amine: oxygen oxidoreductase, EC 1.5.3) from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **272**, 12505-12507
- Takeuchi, M., Makita, Z., Bucala, R., Suzuki, T., Koike, T., Kameda, Y. (2000). Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds *in vivo*. *Mol. Med.* **6**, 114-125
- Tanaka, M., Lee, T.C., Chichester, C.O. (1975). Nutritional consequences of the Maillard reaction. The absorption of fructose-L-tryptophan in the large intestine of the rat. *J. Nutr.* **103**, 989-994
- Taneda, S., Monnier, V.M. (1994). ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens. *Clin. Chem.* **40**, 1766-1773
- Tessier, F.J., Monnier, V.M., Sayre, L.A., Kornfield, J.A. (2003). Triosidines: Novel Maillard reaction products and crosslinks from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* **369**, 705-719
- Thornalley, P.J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269**, 1-11
- Till, U. (1999). Pathophysiologie/Pathobiochemie systematisch. Uni-Med, Bremen. 1. Auflage
- Tsukahara, H., Sekine, K., Uchiyama, M., Kawakami, H., Hata, I., Todoroki, Y., Hiraoka, M., Kaji, M., Yorifuji, T., Momoi, T., Yoshihara, K., Beppu, M., Mayumi, M. (2003). Formation of advanced glycosylation end products and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Res.* **54**, 419-424
- Tsukushi, S., Kajita, M., Nakamura, S., Niwa, T. (2002). Gas chromatographic-mass spectrometric determination of erythrocyte 3-deoxyglucosone in diabetic patients. *J. Chromatogr. B* **776**, 133-137
- Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppas, M., Goldberg, T., Vlassara, H. (2005). Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 461-466
- Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., Baglia, S., Vassalotti, J.A., Vlassara, H. (2003a). Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am. J. Kidney Dis.* **42**, 532-538

- Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., He, C., Vlassara, H. (2003b). Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 728-731
- Valencia, J.V., Weldon, S.C., Quinn, D., Kiers, G.H., DeGroot, J., TeKoppele, J.M., Hughes, T.E. (2004a). Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal. Biochem.* **324**, 68-78
- Valencia, J.V., Mone, M., Koehne, C., Rediske, J., Hughes, T.E. (2004b). Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia* **47**, 844-852
- Valle-Riestra, J., Barnes, R. (1970). Digestion of heat damaged egg albumen by the rat. *J. Nutr.* **100**, 873-882
- van de Merbel, N.C., Mentink, C.J.A.L., Hendriks, G., Wolffenbuttel, B.H.R. (2004). Liquid chromatographic method for the quantitative determination of N $\epsilon$ -Carboxymethyllysine in human plasma proteins. *J. Chromatogr. B* **808**, 163-168
- Van Renterghem, R., De Block, J. (1996). Furosine in consumption milk and milk powders. *Int. Dairy J.* **6**, 371-382
- Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, N., Lyons, T.J., Bijlsma, W.J., Lafeber, F.P.J.G., Baynes, J.W., TeKoppele, J.M. (2002). Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **275**, 39027-39031
- Vlassara, H. (2005). Advanced glycation in health and disease - role of modern environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 452-460
- Vlassara, H., Cai, W., Crandall, J., Goldberg, T., Oberstein, R., Dardaine, V., Peppas, M., Rayfield, E.J. (2002). Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15596-15601
- Vlassara, H., Brownlee, M., Cerami, A. (1985). High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: A potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 5588-5592
- Vlassara, H., Brownlee, M., Cerami, A. (1984). Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. *J. Exp. Med.* **160**, 197-207

- Vogt, B.W., Schleicher, E.D., Wieland, O.H. (1982). Epsilon-amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained by autopsy. Increase in diabetes mellitus. *Diabetes* **31**, 1123-1127
- Wadman, S.K., DeBree, P.K., Van Sprang, F.J., Kamerling, J.P., Haverkamp, J., Vliegenthart, J.F.G. (1975). N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine, a constituent of human urine. *Clin. Chim. Acta* **59**, 313-320
- Wagner, Z., Wittmann, I., Mazak, I., Schinzel, R., Heidland, A., Kientsch-Engel, R., Nagy, J. (2001). N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, 785-791
- Wautier, J.-L., Guillausseau, P.J. (1998). Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vascular medicine* **3**, 131-137
- Wells-Knecht, K.J., Lyons, T.J., McCance, D.R., Thorpe, S.R., Feather, M.S., Baynes, J.W. (1994). 3-Deoxyfructose concentrations are increased in human plasma and urine in diabetes. *Diabetes* **43**, 1152-1156
- Wells-Knecht, K.J., Brinkmann, E., Baynes, J.W. (1995). Characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and N-hippuryllysine: a model for Maillard reaction crosslinks in proteins. *J. Org.Chem.* **60**, 6246-6247
- Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D.V., Litchfield, J.E., Thorpe, S.R., Baynes, J. (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **34**, 3702-3709
- Wells-Knecht, M.C., Thorpe, S.R., Baynes, J. (1995). Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* **34**, 15134-15141
- Weigel, K.U., Opitz, T., Henle, T. (2004). Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **281**, 147-151
- Wendt, T., Tanji, N., Guo, J., Hudson, B.I., Bierhaus, A., Ramasamy, R., Arnold, B., Nawroth, P.P., Yan, S.F., D'Agati, V., Schmitdt, A.M. (2003). Glucose, glycation, and RAGE: Implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1383-1395
- Wenzel, E., Faist, V., Tasto, S., Erbersdobler, H.F. (2000). Einfluss von freiem und proteingebundenem N<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine auf die NADPH-Cytochrom c-Reduktase und die Glutathion-S-Transferase *in vitro* und *in vivo*. *Proc. Germ. Nutr. Soc.*

- Wenzel, E., Tasto, S., Erbersdobler, H.F., Faist, V. (2002). Effect of heat-treated proteins on selected parameters of the biotransformation system in the rat. *Ann. Nutr. Metab.* **46**, 9-16
- Wiame, E., Delpierre, G., Collard, F., Van Schaftingen, E. (2002). Identification of a pathway for the utilization of the Amadori product fructoselysine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 42523-42529
- Witztum, J.L., Mahoney, E.H., Branks, M.J., Fisher, M., Elam, R., Steinberg, D. (1982). Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* **31**, 283-291
- Wu, X., Takahashi, M., Chen, S.G., Monnier, V.M. (2000). Cloning of amadoriase I isoenzyme from *Aspergillus* sp.: evidence of FAD covalently linked to Cys342. *Biochemistry* **39**, 1515-1521
- Wu, X., Monnier, V.M. (2003). Enzymatic deglycation of proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**, 16-24
- Yamada, H., Miyata, S., Igaki, N., Yatabe, H., Miyauchi, Y., Ohara, T., Sakai, M., Shoda, H., Oimomi, M., Kasuga, M. (1994). Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. *J. Biol. Chem.* **269**, 20275-20280
- Yoshihara, K., Nakamura, K., Kanai, M., Nagayama, Y., Takahashi, S., Saito, N., Nagata, M. (1998). Determination of urinary and serum pentosidine and its application to elder patients. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 1005-1008
- Zyzak, D.V., Richardson, J.M., Thorpe, S.R., Baynes, J.B. (1995). Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 547-554

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde an der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle, Professur für Lebensmittelchemie, angefertigt.

Erfolgreiche Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung erkenne ich in allen Teilen an.

Anke Förster



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Thomas Henle, Professor für Lebensmittelchemie an der TU Dresden, möchte ich neben der Möglichkeit zur Bearbeitung dieser vielseitigen und interessanten Themenstellung für die jederzeit freundliche und hilfsbereite Betreuung sowie die manchmal bemerkenswerte Geduld danken.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée, Professor für Allgemeine Biochemie an der TU Dresden und Herrn Dr. Timo Bütler, Food Safety Scientist am Nestlé Research Center, Lausanne, Schweiz danke ich für die freundliche Übernahme der Korreferate.

Für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten danke ich Frau Annette Pexa, Frau Melanie Martin, Frau Yvonne Kühne und Herrn Oliver Kunder.

Bei Frau Karla Schlosser möchte ich mich für die Durchführung nicht enden wollender Probenserien am Aminosäureanalysator bedanken. In diesem Zusammenhang gilt allen „Urinspendern“, die so manche Entbehrung (Semmeln, Kaffee, Schokolade) auf sich genommen haben ganz besonderer Dank!

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen (auch den ehemaligen) Kollegen in der Lebensmittelchemie bedanken. Schokolade, Kaffee, Musik, ein paar aufmunternde Worte beim Mittagessen, aber auch das passende Werkzeug können Tage retten und unwillige Pumpen und Detektoren ausgleichen!

Nicht vergessen möchte ich auch meine Freunde in Munster, Dresden und anderswo, sowie vor allem meine Familie, die zwar oft nicht so recht wussten, wovon ich eigentlich rede, aber vielleicht gerade deshalb ihren Anteil an dieser Arbeit haben.

Danke